

ВЕТЕРИНАРИЯ И ЗООТЕХНИЯ

DOI: 10.31677/2072-6724-2023-68-3-138-146

УДК 575.222: 57.083.34

ИЗУЧЕНИЕ ИСТОЧНИКОВ ЗАРАЖЕНИЯ ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ САЛЬМОНЕЛЛАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ERIC-ПЦР И РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ С ФЛЮОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНЫМИ АНТИГЕНАМИ (ИРА)

¹А. А. Грицан, аспирант^{1,2}В.С. Черепушкина, магистрант, младший научный сотрудник¹Ю.С. Хоменко, младший научный сотрудник^{1,2,3}В.Н. Афонюшкин, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник²Я. В. Новик, кандидат ветеринарных наук²Л. П. Ермакова, кандидат ветеринарных наук¹Сибирский федеральный научный центр агробιοтехнологий РАН,

р.п. Краснообск, Новосибирской. обл., Россия

²Новосибирский государственный аграрный университет, Новосибирск, Россия³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

E-mail: lisocim@mail.ru

Ключевые слова: ERIC-ПЦР, антиген, сальмонелла, генотип, птица, бактериальные клетки, праймер, противосальмонеллезные мероприятия.

Реферат. Цель исследования — разработать диагностические алгоритмы использования ERIC-ПЦР и ИРА, которые позволят выявлять пути заноса сальмонелл на птицефабрику. Изучали генетические различия 15 изолятов *Salmonella spp.*, выделенных из патологического материала, кормового сырья и смывов из птичников птицефабрик бройлерного направления (родительское стадо и ремонтный молодняк) Западно-Сибирского региона. Видовую принадлежность культур сальмонелл подтверждали методом секвенирования и/или с использованием биохимических тестов и агглютинационных сывороток. ДНК бактерий выделяли стандартным силико-сорбционным методом. Анализ геномной ДНК изучаемой коллекции сальмонелл методом ERIC-ПЦР позволил сгруппировать полученные штаммы и изоляты в три генотипа, отличающиеся друг от друга паттернами ампликонов на электрофорезе в полиакриламидном геле. Сопоставление результатов ИРА с сыворотками крови птицы родительского стада и ремонтного молодняка птицефабрики №1 позволило выявить антитела как к сальмонеллам генотипа 1, так и к сальмонеллам генотипа 2 в большинстве обследованных стад птицы. Анализ корреляции титров антител к антигенам сальмонелл 1-го и 2-го генотипов позволил исключить перекрестную реакцию, так как в отдельных птичниках корреляционная зависимость была отрицательной, в двух птичниках положительной и в одном птичнике отсутствовала. Система реакции иммунофлуоресцентной агглютинации позволяет достаточно специфично различать серопревалентность к разным штаммам сальмонелл на отдельно взятых сельскохозяйственных предприятиях. Совокупность данных серологического анализа позволяет говорить о том, что у части птицы наблюдается повышенная восприимчивость к заражению сальмонеллами обоих генотипов, что позволяет предполагать у данных особей наличие генетических особенностей или особенностей кишечной микрофлоры, связанных с восприимчивостью к заражению сальмонеллами.

STUDYING THE SOURCES OF INFECTION OF BROILER CHICKENS BY SALMONELLA USING ERIC-PCR AND AGGLUTINATION REACTION WITH FLUORESCENCE-LABELED ANTIGENS (FLA)

¹A.A. Gritsan, PhD student^{1,2}V.S. Cherepushkina, Master's student, Junior researcher¹Y.S. Khomenko, Junior researcher^{1,2,3}V.N. Afonyushkin, Ph.D. in Biological Sciences, Senior Researcher

²Ya.V. Novik, Ph.D. in Veterinary Sciences

²L.P. Ermakova, Ph.D. in Veterinary Sciences

¹Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnologies RAS, settlement Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

²Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

³Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

E-mail: lisocim@mail.ru

Keywords: ERIC-PCR, antigen, salmonella, genotype, poultry, bacterial cells, primer, anti-salmonella measures.

Abstract. The study aims to develop diagnostic algorithms for using ERIC-PCR and IRA, which make it possible to identify the routes of Salmonella introduction into a poultry farm. The authors studied the genetic differences of 15 isolates of Salmonella spp., isolated from pathological material, feed raw materials and swabs from poultry houses of broiler poultry farms (parent stock and replacement young animals) in the West Siberian region. The species of Salmonella cultures were confirmed by sequencing and using biochemical tests and agglutination sera. Bacterial DNA was isolated using the standard silicosorption method. Analysis of the genomic DNA of the studied collection of Salmonella using the ERIC-PCR method allowed us to group the resulting strains and isolates into three genotypes that differ in amplicon patterns on polyacrylamide gel electrophoresis. Comparison of IRA results with blood sera of birds from the parent flock and replacement young animals of poultry farm No. 1 made it possible to identify antibodies to both Salmonella genotype one and Salmonella genotype 2 in most of the examined poultry flocks. Analysis of the correlation of antibody titers to Salmonella antigens of the 1st and 2nd genotypes made it possible to exclude a cross-reaction in some poultry houses. The correlation was negative. It was positive in two poultry houses, and there was no correlation in one. The immunofluorescence agglutination reaction system makes it possible to precisely distinguish the seroprevalence of different Salmonella strains at individual agricultural enterprises. The totality of data from serological analysis suggests that some birds have an increased susceptibility to infection with Salmonella of both genotypes, which means that these individuals have genetic characteristics or characteristics of the intestinal microbiota associated with exposure to infection with Salmonella.

Сальмонеллёзы представляют актуальную проблему здравоохранения, санитарно-эпидемиологического и ветеринарного надзора в большинстве стран мира, что связано с высоким уровнем заболеваемости, обусловленным массовым производством и экспортом продуктов питания, появлением устойчивых к антибиотикам штаммов, *S. enteritidis* и *S. Typhimurium*, и отсутствием предпосылок к его снижению. Идентификация возбудителя дает мало информации в ходе эпидемиологического расследования причин заболевания и обуславливает необходимость изучения различий сальмонелл в пределах одного серотипа. Для типирования сальмонелл наиболее перспективным представляется применение молекулярно-генетических методов, которые позволяют получать информацию о распространении тех или иных генетических вариантов [1].

В настоящее время существует значительный арсенал генетических методов, которые могут использоваться для типирования сальмонелл и множества других видов бактерий. Один из них – Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) ПЦР является мощным методом ДНК-фингерпринтинга. В этом методе повторы несовершенного палиндрома размером 127 п.н. используются в качестве мишени

для ПЦР вингерпринтинга, когда нет необходимости в информации о целевой последовательности ДНК, что делает его эффективным и универсальным методом молекулярной эпизоотологии широкого спектра инфекционных агентов. Этот метод быстрее, проще и экономичнее, чем другие методы геномного типирования [2, 3, 4–7]. Количество и расположение в геноме повторяющихся элементов обычно уникально для отдельных штаммов. Использование праймеров, гомологичных этому палиндрому, приводит к получению уникального набора продуктов амплификации. При этом последовательность, характерная для определенной таксономической группы, может присутствовать и в геномах других, неродственных, бактерий [8-10].

Еще один метод молекулярной эпизоотологии – определение антител к сальмонеллам как в контексте оценки серопревалентности в популяциях, так и для сопоставления антигенных различий циркулирующих в стаде штаммов. Для повышения эффективности и универсальности серологических обследований стад птицы, неблагополучных по сальмонеллезам, нами была предложена и запатентована система на основе реакции агглютинации с флуоресцентно-меченым антигеном. Реакция прохо-

дит в лунках 96-луночного микропланшета с V-образным дном [11, 12].

Цель исследования – разработать диагностические алгоритмы использования ERIC-ПЦР и ИРА, которые позволят выявлять пути заноса сальмонелл на птицефабрику.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучали генетические различия 15 изолятов *Salmonella spp.*, выделенных из патологического материала, кормового сырья и смывов из птичников птицефабрик бройлерного направления (родительское стадо и ремонтный молодняк) Западно-Сибирского региона, сопоставляя

их с результатами аналогичных исследований сектора молекулярной биологии за предшествующие периоды. Микробиологические исследования проводили с использованием специфических сред (висмут-сульфит агар и RVS-бульон (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск (Россия)), видовую принадлежность культур сальмонелл подтверждали методом секвенирования и/или с использованием биохимических тестов и агглютинационных сывороток. ДНК бактерий выделяли стандартным силико-сорбционным методом.

ПЦР проводили по программе температурных режимов, приведенной в табл. 1.

Таблица 1

Программа температурных режимов ERIC-ПЦР
ERIC-PCR temperature program

Этап	Температура, °C	Время	Количество циклов
1	95,0	20 с	38
2	51,4	1 мин	
3	72,0	40 с	

ПЦР проводили в конечном объеме 20 мкл, содержащем 67 мМ трис-НСl (рН 8,9), 16 мМ (NH₄)₂SO₄; 2,4 мМ MgCl₂; 0,01% Твин 20; 0,2 мМ дНТФ; 0,3 мкМ растворы олигонуклеотидных праймеров, 1–2 ед. HotstartTaq-ДНК полимеразы. Результаты ERIC-ПЦР оценивали электрофоретически в 6% ПААГ. Визуализацию гелей осуществляли после окрашивания SYBRGreenI в трансиллюминаторе GelDocXR+ (Bio-Rad). Обработку изображений осуществляли с использованием ПО ImageLab (BioRad) [11].

Для оценки генетической гетерогенности культур бактерий ставили ERIC-ПЦР геномной ДНК со стандартных праймеров [3]:

5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAС-3'ERIC2

5'-AAGTAAGTGAСТGGGGTGAGCG-3'

Серологические исследования проводили с использованием иммунофлуоресцентной реакции агглютинации по следующему протоколу [12–14].

Антигены получали из предварительно убитой (нагреванием до 65°C в течение 3 ч) взвеси бактериальных клеток (суточные культуры ресуспендировали в физиологическом растворе до 2 MFU). Использовали инактивированные культуры сальмонелл «генотип

1» и «генотип 2», которые были выделены из патологического материала и задохликов и предварительно охарактеризованы методами молекулярной эпизоотологии. Для получения флуоресцентно-меченых антигенов к взвеси инактивированных бактериальных клеток добавляли 0,1%-й раствор флуоресцентного красителя – акридиновый оранжевый, после инкубации в течение 1 ч несвязавшийся краситель трехкратно отмывали центрифугированием (3 тыс. об/мин).

Предварительно определили оптимальную концентрацию антигенов. Для этой цели антигены разводили с шагом 1 : 2 и вносили в лунки 96-луночного микропланшета с V-образным дном через 16 ч инкубации. Затем проводили реакцию агглютинации с сыворотками крови, которые раститровали с шагом 1 : 2, вносили антигены и после инкубации в течение 16 ч оценивали светимость антигенов по типу «пуговка/зонтик» с помощью трансиллюминатора GelDocBioRad. Обработку изображений осуществляли с использованием ПО ImageLab (BioRad).

Серопревалентность к антигенам сальмонелл оценивали в сыворотке крови от цыплят и кур 5 птичников в возрасте от 5 до 437 дней (n = 121).

Статистическую обработку данных производили методами вариационной и непараметрической статистики, нормальность распределения оценивали по методу Шапиро-Уилка, коэффициент корреляции анализировали по Пирсону, статистическую значимость различий – по Манну-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ геномной ДНК изучаемой коллекции сальмонелл методом ERIC-PCR позволил сгруппировать полученные штаммы и изоляты в три генотипа, отличающиеся друг от друга паттернами ампликонов на электрофорезе в полиакриламидном геле (рис. 1). Структуры профилей электрофореграмм сальмонелл одного и того же генотипа устойчиво воспроизводились, что позволяет рассуждать в том числе о клональности этих изолятов.

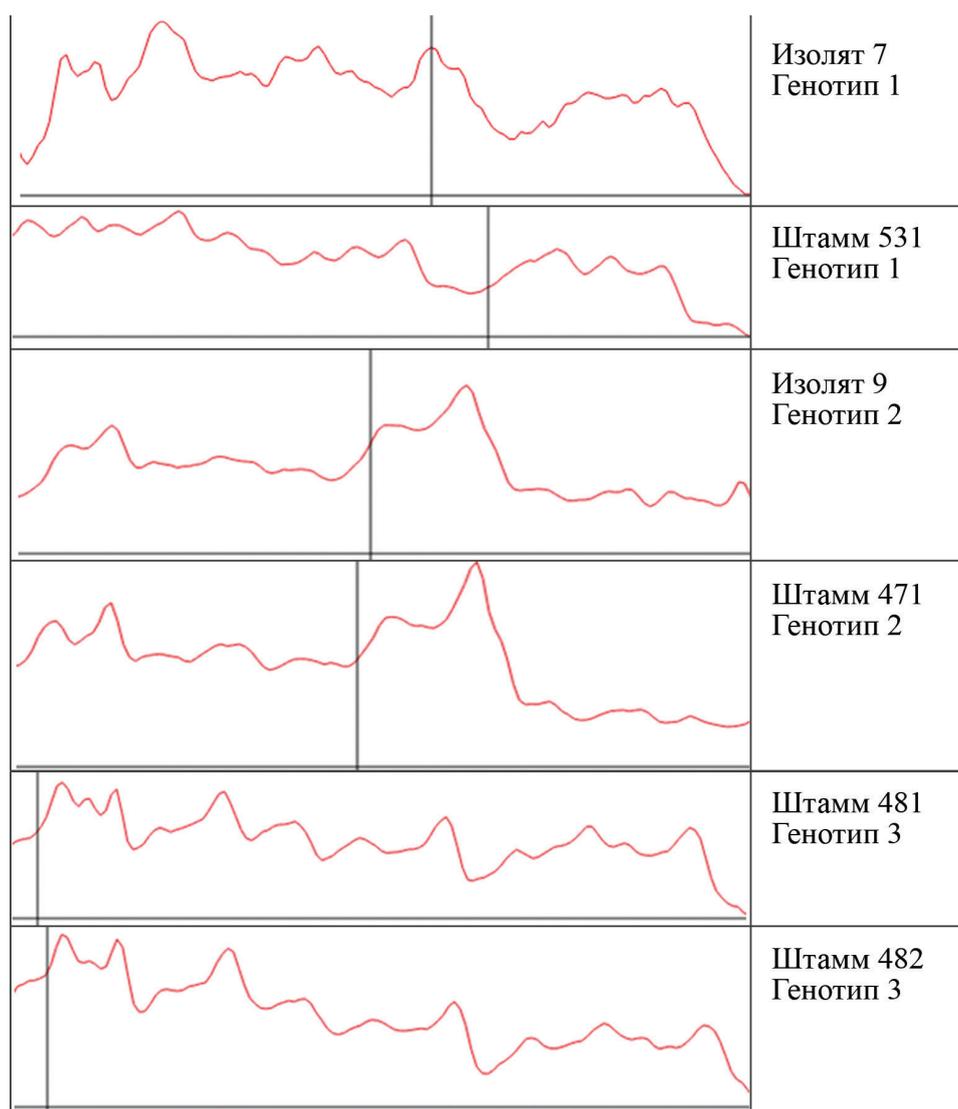


Рис. 1. Денситограммы результатов ERIC-ПЦР различными штаммами и изолятами *Salmonella spp.*
Densitograms of ERIC-PCR results with various strains and isolates of *Salmonella spp.*

Как следует из результатов генетического анализа сальмонелл, наиболее широко распространены на обследуемых птицефабриках сальмонеллы генотипа 1. Выявление их у птицы родительских стад позволило предположить, что широкое распространение сальмонелл указанного генотипа у бройлеров об-

условлено вертикальной передачей данного штамма сальмонелл. Однако эта версия была поставлена под сомнение по причине выявления сальмонелл генотипа 1 на птицефабрике № 3 (из другого региона и с другим источником комплектования птицы). Сальмонеллы, обнаруженные у задохликов (т.е. в выводном

шкафу) не были отнесены к 1–3 му генотипам и, следовательно, не способны накапливаться в стадах бройлеров, т. е. вертикальная передача сальмонелл в принципе на данной птицефабрике происходит, но в форме abortивной инфекции. Свежевыделенные культуры саль-

монелл от 15.04.2022 не отличались от ранее предоставленных культур на птицефабрике №1. Можно говорить о формировании устойчивого эпизоотического очага сальмонеллеза на данном предприятии (табл. 2).

Таблица 2

Анализ генетического разнообразия *Salmonella spp.* по результатам ERIC-ПЦР
Analysis of genetic diversity of *Salmonella spp.* based on ERIC-PCR results

Дата изоляции	Описание изолята	Птицефабрика	Генотип
05.08.2021	Изолят 1. Пат. материал от цыплят-бройлеров, возраст 4 дня, птичник 1	1	1
	Изолят 2. Пат. материал от цыплят-бройлеров, возраст 3 дня, птичник 2	1	1
19.08.2021	Изолят 3. Материал от род. стада № 5 (395дней)	1	-
20.08.2021	Изолят 4. Подстилочный материал. Род. стада № 1 и 2	1	1
07.09.2021	Изолят 5. Материал от род стада № 3 (218 дней)	1	-
	Изолят 6. Материал от род. стада № 4	1	-
9.09.2021	Изолят 7. Клоакальные смывы от род. стада № 4	1	1
	Изолят 8. Пат. материал от цыплят-бройлеров, возраст 3 дня, птичник 2	1	1
	Изолят 9. Пат. материал от цыплят-бройлеров, возраст 3 дня, птичник 2	1	2
15.04.2022	Штамм 537. Пробы печени на убое. Птичник 4. Бройлеры	1	1
10.03.2022	Штамм 531. Тушка птицы охлажденная. Бройлеры	3	1
12.03.2019	Штамм 471. Пат. материал от цыплят-бройлеров, возраст 3 дня, птичник 3	1	2
03.07.2019	Штамм 482. Пат. материал от суточных цыплят	2	3
	Штамм 481. Пат. материал от цыплят-бройлеров на убое	2	3
12.03.2019	Штамм 466. Пат. материал от цыплят-бройлеров на убое	1	2
2020	Штамм. Партия сои экструдированной	1	3

Сальмонелла генотипа 3 встречалась только у птицы (патологический материал) птицефабрики № 2, а также была обнаружена в со-

евом шроте, но поступавшем на птицефабрику № 1. Эффективность противосальмонеллезных мероприятий на птицефабрике № 1, как видим,

весьма высока и позволяет предотвращать массовую циркуляцию по птицефабрике сальмонелл минимум двух генотипов, за исключением сальмонелл генотипа 1.

Низкая эффективность микробиологических методов диагностики ограничивает возможности оценки интенсивности и экстенсивности эпизоотического процесса на птицефабрике, снижая в том числе возможность контроля эффективности противоэпизоотических мероприятий при сальмонеллезе.

Были изготовлены флуоресцентно-меченные антигены из сальмонелл генотипов 1 и 2 для проведения ИРА с целью изучения серопревалентности к этим антигенам сельскохозяйственной птицы на птицефабрике № 1. Особенность новой модификации РА состоит в том, что в ультрафиолетовых лучах пуговка светится в виде точки. Таким образом, мы можем узнать, к какому заболеванию специфичны антитела.

Сопоставление результатов ИРА с сыворотками крови птицы родительского стада и ремонтного молодняка птицефабрики № 1 позволило выявить антитела как к сальмонеллам генотипа 1, так и сальмонеллам генотипа 2 в большинстве обследованных стад птицы. Анализ корреляции титров антител к антигенам сальмонелл 1-го и 2-го генотипов позволил исключить перекрестную реакцию, так как в отдельных птичниках корреляционная зависимость была отрицательной, в двух птичниках – положительной и в одном птичнике отсутствовала (рис. 2). Результаты серологического тестирования сывороток с антигеном 1 и антигеном 2 также не совпадали (конкордантность отсутствовала), что говорит о разной антигенной структуре сальмонелл с генотипом 1 и 2. Таким образом, система реакции иммунофлуоресцентной агглютинации позволяет достаточно специфично различать серопревалентность к разным штаммам сальмонелл на отдельно взятом предприятии.

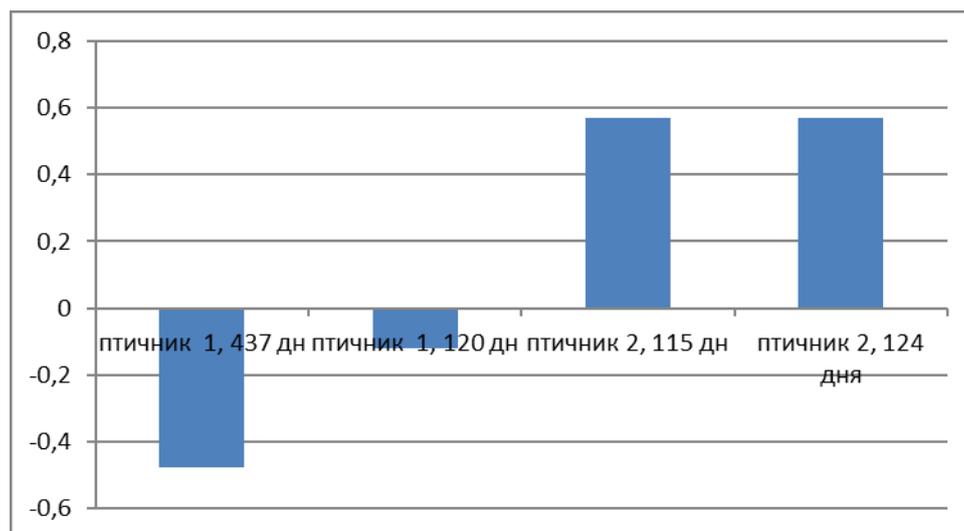


Рис. 2. Коэффициент корреляции титров антител (r_2) в разных стадах цыплят-бройлеров в ИРА к антигенам сальмонелл генотипов 1 и 2, r_2 (по Пирсону)

The correlation coefficient of antibody titers r_2 in different flocks of broiler chickens in IRA to Salmonella antigens of genotypes 1 and 2, r_2 (according to Pearson)

Так как корреляция присутствовала и была положительной у птицы в возрасте 115 и 124 дня, следовательно, у птицы в этом возрасте есть общий фактор, который повышает риск заражения сальмонеллами обоих генотипов.

Как следует из рис. 3, существует общая тенденция к росту инфицированности сельскохозяйственной птицы к возрасту 115–125 дней, при этом серопревалентность достигает значения от 100% (сальмонелла генотипа 1) до 72% (сальмонелла генотипа 2).

Обращает на себя внимание выявление антител к сальмонеллам генотипа 2 у 5-дневного ремонтного молодняка (серопревалентность 18%), что позволяет обосновать вертикальный занос сальмонелл данного генотипа от репродуктора первого порядка. Отсутствие антител к сальмонеллам генотипа 1 у ремонтного молодняка в возрасте до 7 дней позволяет исключить вертикальный занос сальмонелл данного генотипа на птицефабрику и усиливает кормовую версию его распространения.

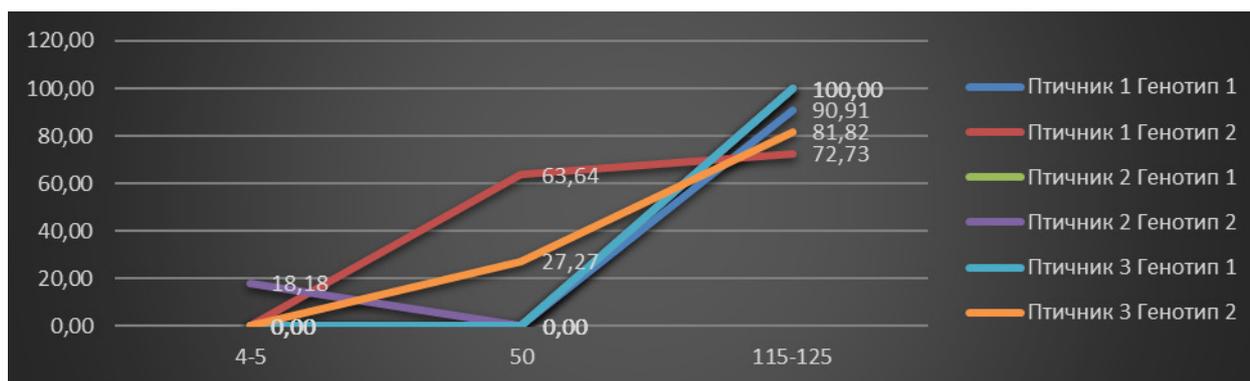


Рис. 3. Динамика изменения серопревалентности в отношении сальмонелл генотипа 1 и генотипа 2. По оси абсцисс – возраст, дней; по оси ординат – серопревалентность, %

Dynamics of changes in seroprevalence about Salmonella genotype one and genotype 2. The x-axis is age and days; The y-axis is seroprevalence, %

Таблица 3

Наличие статистически значимых различий титров антител в различных стадах птицы разного возраста (по Манну-Уитни)
Statistically significant differences in antibody titers in different flocks of poultry of different ages (Mann-Whitney)

Статистически значимые (p<0,05)	Статистически не значимые, (p>0,05)
Птичник 1, возраст 50 дней	Птичник 4, возраст 437 дней
Птичник 3, возраст 177 дней	Птичник 4, возраст 120 дней
Птичник 2, возраст 225 дней	Птичник 3, возраст 5 дней

Анализ табл. 3 позволяет выявить три птичника с несовпадающими значениями титров антител при тестировании крови птицы в ИРА с антигенами на основе штаммов сальмонелл генотипов 1 и 2. Этот факт позволяет говорить о контакте обследованной птицы с разными штаммами сальмонелл.

Тем не менее 4 птичника (в т.ч. птица разного возраста из одних и тех же птичников) характеризуются отсутствием статистически значимых различий титров антител при тестировании крови с антигенами сальмонелл обоих генотипов.

Совокупность данных серологического анализа позволяет говорить о том, что у части птицы отмечается повышенная восприимчивость к заражению сальмонеллами обоих генотипов, что дает основание предполагать у данных особей наличие генетических особенностей или особенностей кишечной микробиоты, связанных с восприимчивостью к заражению сальмонеллами.

Полученные результаты позволяют обосновать приоритетность мер биологической защиты. Например, в приведенном исследо-

вании именно ограничение горизонтального распространения внутри производственной площадки по выращиванию бройлеров обеспечит снижение зараженности сальмонеллой генотипа 1, но будет менее эффективно для сальмонелл генотипов 2 и 3. Выявленный случай выявления сальмонелл в сое и патологическом материале позволяет рассматривать поставщика сои как глобальный источник заражения сальмонеллами для региона в целом.

ВЫВОДЫ

1. Наиболее представленная на птицефабрике № 1 сальмонелла генотипа 1 стабильно встречается на двух разных птицефабриках, включая родительское стадо, но не обнаруживается в кормах и птице от репродуктора первого порядка. Представленность сальмонелл генотипа 2 меньше как по данным ERIC-ПЦР, так и по результатам оценки серопревалентности в ИРА, однако данные ИРА позволяют утверждать, что путь заноса сальмонелл этого генотипа на птицефабрику №1 – вертикальный.

Ассоциируемость сальмонелл генотипа 3 с кормовым сырьем позволяют рассматривать корма в качестве основного фактора распространения сальмонелл данного серотипа по региону.

2. Анализ сывороток, позитивных на генотипы сальмонелл 1 и 2, встречаемость стад с отрицательной корреляцией между титрами антител к обоим исследуемым антигенам позволяют исключить существенное влияние перекрестных реакций при проведении ИРА,

что дает возможность использовать данный тест для отдельного серологического анализа циркуляции сальмонелл генотипов 1 и 2 (при условии проверки данного факта для каждой отдельной эпизоотической ситуации).

3. Сочетание ERIC-ПЦР с ИРА обеспечивает возможность обоснования как вертикального пути заноса сальмонелл на птицефабрику, так и с кормами.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Recent Multistate Outbreaks of Human Salmonella Infections Acquired from Turtles: A Continuing Public Health Challenge* / R. Julie [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 50. – P. 554–559.
2. *Comparison of genotyping methods by application to Salmonella Livingstone strains associated with an outbreak of human salmonellosis.* / J. Eriksson, C. Lofstrom, A. Aspan [et al.] // *Int J Food Microbiol.* – 2005. – Vol. 25. – P. 93–103.
3. *Wilson L.A., Sharp P.M. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in Escherichia coli: Evolution and Implications for ERIC-PCR* // *Mol. Biol. Evol.* – 2006. – Vol. 23. – P. 1156–1168.
4. *McClelland M., Welsh J. DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR* // *Genome Res.* – 1994. – Vol. 4. – P. 59–65.
5. *Population structure, origins and evolution of major Salmonella enterica clones* / R. Lan [et al.] // *Infect Genet Evol.* – 2009. – Vol. 9, N 5. – P. 996–1005.
6. *Rapid outbreak assessment. Unusual increase of Salmonella Mikawasima infections in humans* // European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, 28 November. – 2013. – P. 1–9.
7. *Rapid risk assessment. Multi-country outbreak of Salmonella Stanley infections* // European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, 27 July. – 2012. – P. 1–6.
8. *Comparison of Subtyping Methods for Differentiating Salmonella enterica Serovar Typhimurium Isolates Obtained from Food Animal Sources* / S. L. Foley [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44, N 10. – P. 3569–3577.
9. *Strain differentiation of Indian isolates of Salmonella by ERIC-PCR* / M. K. Saxena [et al.] // *Res Vet Sci.* – 2002. – Vol. 73. – P. 313–314.
10. *The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastro- enteritis* / S. E. Majowicz [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 50, N 6. – P. 882–889.
11. *Изучение эпизоотической значимости Salmonella enterica серотипа Hamburg на птицеводческих предприятиях с использованием серологических исследований* / Ю.С. Хоменко, О.С. Козлова, А.В. Афонюшкин, В.Н. Афонюшкин // *Птицеводство*. – 2022. – № 12. – С. 92–95.
12. *Способ определения антител к бактериальным антигенам: Патент № 2563885 С1* / В.Н. Афонюшкин, М.Л. Филипенко, А.С. Киревичева [и др.]. – Заявл. 03.06.2014, Опубл. 27.09.2015.
13. *Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes* // *Nucleic Acids Res.* 1991. – Vol. 19 – P. 6831–6832.
14. *Шагинян И.А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничных инфекций* // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2000. – Т. 2. – С. 82–95.
15. *Variation in Salmonella enteritidis RAPD-PCR patterns may not be due to genetic differences* / D. L. Mathis [et al.] // *Avian Dis.* – 2011. – Vol. 55. – P. 620–625.

REFERENCES

1. Julie R. [et al.], Recent Multistate Outbreaks of Human Salmonella Infections Acquired from Turtles: A Continuing Public Health Challenge, *Clinical Infectious Diseases*, 2010, Vol. 50, pp. 554–559.
2. Eriksson J., Lofstrom C., Aspan A. [et al.], Comparison of genotyping methods by application to Salmonella Livingstone strains associated with an outbreak of human salmonellosis, *Int J Food Microbiol.*, 2005, Vol. 25, pp. 93–103.
3. Wilson L.A., Sharp P.M., Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR, *Mol Biol Evol.*, 23, 2006, pp. 1156–1168.
4. McClelland M., Welsh J., DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR, *Genome Res*, 1994, Vol. 4, pp. 59–65.
5. Lan R. [et al.], Population structure, origins and evolution of major Salmonella enterica clones, *Infect Genet Evol.*, 2009, Vol. 9, No. 5, pp. 996–1005.
6. Rapid outbreak assessment. Unusual increase of Salmonella Mikawasima infections in humans, European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, 28 November, 2013, pp. 1–9.
7. Rapid risk assessment. Multi-country outbreak of Salmonella Stanley infections, European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm, 27 July, 2012, pp. 1–6.
8. Foley S.L. [et al.], Comparison of Subtyping Methods for Differentiating Salmonella enterica Serovar Typhimurium Isolates Obtained from Food Animal Sources, *J. Clin. Microbiol.*, 2006, Vol. 44, No. 10, pp. 3569–3577.
9. Saxena M.K. [et al.], Strain differentiation of Indian isolates of Salmonella by ERIC-PCR, *Res Vet Sci.*, 2002, Vol. 73, pp. 313–314.
10. Majowicz S.E. [et al.], The Global Burden of Nontyphoidal Salmonella Gastro- enteritis, *Clinical Infectious Diseases*, 2010, Vol. 50, No. 6, pp. 882–889.
11. Homenko YU.S., Kozlova O.S., Afonyushkin A.V., Afonyushkin V.N., *Pticevodstvo*, 2022, No. 12, pp. 92–95. (In Russ.)
12. Afonyushkin V.N., Filipenko M.L., Kirevicheva A.S. [i dr.], Patent № 2563885 C1, Способ определения антител к бактериальным антигенам: заявл. 03.06.2014: опubl. 27.09.2015. (In Russ.)
13. Versalovic J., Koeuth T., Lupski J.R., Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes, *Nucleic Acids Res*, 1991, Vol. 19, pp. 6831–6832.
14. SHaginyan I.A., *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya*, 2000, T. 2, pp. 82–95. (In Russ.)