

РАЗРАБОТКА ПРАЙМЕРНОЙ СИСТЕМЫ И ЗОНДА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* МЕТОДОМ ПЦР-РВ

Сульдина Екатерина Владимировна, ассистент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Ломакин Артем Андреевич, соискатель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

Мастиленко Андрей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»

ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

432017. г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; 89374545651

e-mail: e.suldina2006@yandex.ru

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, птица, бактерии, патоген, полимеразная цепная реакция, ПЦР-РВ, праймер, зонд.

Расширение отечественной птицеводческой отрасли открывает возможности для роста заболеваемости зоонозами. Страфилококки являются одними из ведущих возбудителей бактериальных инфекций птиц, а *Staphylococcus aureus* вызывает широкий спектр болезней кур, в том числе септический артрит, подкожные абсцессы и гангренозный дерматит, поэтому разработка методов своевременного выявления патогенных вариантов золотистого стафилококка является важной задачей продовольственной безопасности. Целью данной работы стала разработка и апробация оригинальной системы праймеров и зонда для идентификации бактерий вида *Staphylococcus aureus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Для разработки системы молекулярно-генетической идентификации был выбран уникальный участок ДНК *Staphylococcus aureus* K39 NODE_3_length_262400_cov_12.378: 113,355..114,623 п.н., кодирующий регулятор транскрипции U32 family peptidase. С помощью ресурса BLAST-primer NCBI, программы UGENA и ресурса Oligoevaluator проведен подбор и дизайн олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда для ПЦР. Оптимизация работы праймерных систем показала, что оптимальная концентрация составляет 3 рМ каждого праймера на реакцию, а увеличение концентрации праймеров не влияет на эффективность реакции. Экспериментально установлено, что оптимальная концентрация флуоресцентного зонда в реакции составляет 0,4 рМ. Подобраны протоколы для проведения ПЦР-РВ как в присутствии интегрирующего красителя SYBR Green, так и с использованием флуоресцентного зонда. Выдоспецифичность подобранных праймерных систем подтверждена экспериментально на 9 штаммах гетерологичных родов бактерий и составила 100%. Чувствительность праймерной системы и зонда составила 10² копий.

Исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2022 году. Регистрационный номер ЕГИСУ НИОКР 122030200366-1.

Введение

По данным Роспотребнадзора в 2022 году Российская Федерация вышла на 4-е место в мире по валовому производству мяса птицы и на 7-е - по производству яиц. Самообеспеченность страны продукцией птицеводства составляет 100,3% [1]. Однако стремление к увеличению экспорта продукции птицеводства влечет за собой не только серьезные изменения в законодательстве, но и расширение отечественной птицеводческой отрасли [1-2].

В то же время быстрое увеличение поголовья цыплят открывает возможности для роста заболеваемости зоонозами. Страфилококки являются одними из ведущих возбудителей бактериальных инфекций птиц [3-8], а *Staphylococcus*

aureus вызывает широкий спектр болезней кур, в том числе септический артрит, подкожные абсцессы и гангренозный дерматит [9-12].

Инфекционные болезни куриного стада - это серьезное экономическое бремя для отрасли, поэтому своевременное выявление патогенных вариантов золотистого стафилококка является важной задачей продовольственной безопасности.

В связи с этим целью данной работы стала разработка системы праймеров и зонда для идентификации бактерий вида *Staphylococcus aureus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Материалы и методы исследований

В работе был использован референсный

штамм бактерий вида *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и 7 полевых штаммов *Staphylococcus aureus*, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ. В опыте использовали культуры, выращенные в условиях терmostата при температуре $35\pm1^{\circ}\text{C}$ в течение 24 часов. Концентрация бактерий в 1 мл суточной культуры составляла $2,0\pm0,2\times10^8$ КОЕ/мл.

При определении специфичности работы праймерной системы использовали ДНК-матрицу, полученную из следующих штаммов: *Pasteurella multocida* D, *Klebsiella pneumoniae* C6, *Salmonella enterica* ATCC 13076, *Bordetella avium* ATCC BAA -1003, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12384, *Salmonella infantis* 3, *Enterococcus faecalis* 517, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 23715, *Yersinia enterocolitica* OR 9.

Выделение ДНК бактерий осуществляли с помощью набора реагентов «РеалБест УниMag» (Вектор Бест, Россия).

Для постановки ПЦР применяли реакционную смесь «БиоМастер» (Биолампикс, Россия) и стандартный набор лабораторного оборудования и расходных материалов.

Результаты исследований

При разработке праймерных систем для полимеразной цепной реакции первоочередной задачей является анализ генома изучаемого объекта на предмет выявления уникальных областей для подбора последовательностей праймеров и зонда, поэтому при выборе специфического для *Staphylococcus aureus* фрагмента опирались на многочисленные аннотированные в NCBI прокариотические геномы.

Для разработки системы молекулярно-генетической идентификации был выбран участок ДНК *Staphylococcus aureus* K39 NODE_3_length_262400_cov_12.378: 113,355..114,623 п.н., кодирующий регулятор транскрипции *U32 family peptidase*. По данным *in-silico* анализа данный регион является уникальным и соответствует фрагменту генома *Staphylococcus aureus*. Данные получены при использовании программ Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 и UGE-

GenBank

Staphylococcus aureus strain K39 NODE_3_length_262400_cov_12.378, whole genome shotgun sequence

NCBI Reference Sequence: NZ_JAHSUQ010000003.1

FASTA Graphics

Go to:

```

LOCUS      NZ_JAHSUQ010000003      1269 bp    DNA    linear   CON 22-JUL-2022
DEFINITION Staphylococcus aureus strain K39 NODE_3_length_262400_cov_12.378,
whole genome shotgun sequence.
ACCESSION NZ_JAHSUQ010000003.1
VERSION   NZ_JAHSUQ010000003.1
DBLINK    BioProject: PRJNA224116
          BioSample: SAMN19735928
          Assembly: GCF_019149105.1
KEYWORDS  WGS; RefSeq;
SOURCE    Staphylococcus aureus
ORGANISM Staphylococcus aureus
          Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae;
          Staphylococcus.
AUTHORS   1 (bases 1 to 1269)
          Nutthan Lakshmi,V., Nithin Prabhu,K., Raveendra,H., Veeresh,B.H.,
          Deepthi,K., Sivakumar,R., Rajendran,J., Isloor,S. and Hegde,N.R.
TITLE     Staphylococcus aureus K39
JOURNAL  Unpublished
REFERENCE 2 (bases 1 to 1269)
          Nutthan Lakshmi,V., Nithin Prabhu,K., Raveendra,H., Veeresh,B.H.,
          Deepthi,K., Sivakumar,R., Rajendran,J., Isloor,S. and Hegde,N.R.
          DOI: 10.1101/2021.06.17.446238
JOURNAL  Submitted on 17-JUN-2021 Department of Genetics, Madurai Kamaraj
          University, School of Biological Sciences, Madurai, Tamil Nadu
          625001, India
COMMENT REFSPEC INFORMATION: The reference sequence is identical to
          JAHSUQ010000003.1
          The annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation
          Pipeline (PGAP). Information about PGAP can be found here:
          https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/
#Genome-Assembly-Data-START#
Assembly Method :: SPAdes v. 3.11.1
Genome Representation :: Full
Expected Final Version :: Yes
Genome Coverage :: 100.0x
Sequencing Technology :: Illumina
#Genome-Assembly-Data-END#
#Genome-Annotation-Data-START#
Annotation Provider :: NCBI RefSeq
Annotation Date :: 07/22/2022 16:45:23
Annotation Pipeline :: NCBI Prokaryotic Genome
                      Annotation Pipeline (PGAP)
Annotation Method :: Best-placed reference protein
                      set; GeneMarkS-2+
Annotation Software revision :: 6.2
Features Annotated :: Gene; CDS; rRNA; tRNA; ncRNA;
                      repeat_region
Genes (total) :: 2,622
CDSS (total) :: 2,559
Genes (coding) :: 2,386
CDSS (with protein) :: 2,386
Genes (RNA) :: 63
rRNAs :: 2, 1, 1 (5S, 16S, 23S)
complete rRNAs :: 2, 1, 1 (5S, 16S, 23S)
tRNAs :: 55
ncRNAs :: 4
Pseudo Genes (total) :: 173

```

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NZ_JAHSUQ010000003.1?from=113355&to=114623&strand=2

Рис.1 - Основная информация об участке генома 113,355..114,623 п.н. бактерии вида *Staphylococcus aureus* K39

NA 44.0 (рис. 1).

На основании полученной последовательности ДНК вышеуказанного фрагмента с помощью ресурса BLAST-primer NCBI и программы UGENA был проведен подбор и дизайн олигонуклеотидов для ПЦР. Специфичность праймеров была установлена так же при помощи этого сайта (рис. 2).

После синтеза праймерной системы в серии экспериментов был разработан и оптимизирован протокол для проведения ПЦР-РВ с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green.

В качестве матрицы при постановке полимеразной цепной реакции использовали экстрагированную ДНК штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 при следующих показателях:

1. Предварительная денатурация-95 $^{\circ}\text{C}$ - 5 минут
2. Денатурация- 95 $^{\circ}\text{C}$ в течение 5 сек } 30 циклов

Отжиг- 60 $^{\circ}\text{C}$ в течении 15 сек }

Эффективность реакции при выбранных параметрах постановки реакции составила бо-

26.09.2022, 14:21

Primer-Blast results

Input PCR template
none

Specificity of primers
Target templates were found in selected database: Nucleotide collection (nt) (Organism limited to Bacteria)

Other reports
Search Summary

Detailed primer reports +
You can re-search for specific primers by accepting some of the unintended targets, check the box(es) next to the ones you accept and try again to re-search for specific primers

Help

Primer pair 1

Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3'
Forward primer AGGACTCATCGCAAACGGGTAA	23	62.42	47.83	3.00	1.00
Reverse primer GCGATGAAAATCGTGAATG	21	59.15	47.62	2.00	0.00

Products on intended targets

Products on allowed targets

Products on allowed transcript variants

Products on potentially unintended templates

Products on target templates

>CP072116.1 Staphylococcus aureus strain TCH32929 chromosome, complete genome

```
product length = 246
Forward primer 1 AGGACTCATCGCAAACGGGTAA 23
Template 384452 ..... 384430
Reverse primer 1 GCGATGAAAATCGTGAATG 21
Template 384207 ..... 384227
```

>CP103860.1 Staphylococcus aureus strain R3-8 chromosome, complete genome

```
product length = 246
Forward primer 1 AGGACTCATCGCAAACGGGTAA 23
Template 1324315 ..... 1324293
Reverse primer 1 GCGATGAAAATCGTGAATG 21
Template 1324070 ..... 1324090
```

>CP104020.1 Staphylococcus aureus strain 0831 chromosome, complete genome

```
product length = 246
Forward primer 1 AGGACTCATCGCAAACGGGTAA 23
Template 391000 ..... 390978
```

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primerblast.cgi?clg_time=1664190884&job_key=fciKjmSNDoTAKQFqWWAN9N1kQX-bYoY_w&... 3/164

Рис. 2 - Проверка специфичности подобранных праймеров при помощи NCBI BLAST-primer

лее 95%.

Для выявления оптимальной концентрации праймеров были изучены варианты 1 pM, 4 pM, 5 pM, 6 pM, 7 pM каждого праймера на реакцию (рис. 3). В результате подбора оптимальной концентрации праймеров было установлено, что увеличение концентрации праймеров не

влияет на эффективность реакции, поэтому в дальнейших исследованиях была использована концентрация 3 pM каждого праймера на реакцию.

Для экспериментального подтверждения видоспецифичности подобранный праймерной системы были использованы следующие штаммы бактерий: *Pasteurella multocida D*, *Klebsiella pneumoniae C6*, *Salmonella enterica ATCC 13076*, *Bordetella avium ATCC BAA -1003*, *Streptococcus pyogenes ATCC 12384*, *Salmonella infantis 3*, *Enterococcus faecalis 517*, *Escherichia coli O157:H7 ATCC 23715*, *Yersinia enterocolitica OR 9*. Специфичность разработанных праймеров составила 100% (рис. 4).

Для определения чувствительности разработанной системы, с помощью программы UGENE и ресурса Oligoevaluator был подобран олигонуклеотидный зонд. В качестве флуоресцентного красителя был использован HEX, гасителя BHQ-2. После серии экспериментов установлено, что оптимальная концентрация зонда в реакции составляет 0,4 pM.

Проведение ПЦР-РВ с флуоресцентным зондом осуществляли при следующих показателях цикла:

1. Предварительная денатурация-95°C - 5 минут
 2. Денатурация-95°C в течение 5 сек
- Отжиг- 60 °C в течении 15 сек } 50 циклов

В результате проведенных исследований, установлено, что чувствительность праймерной системы и зонда составила 10² копий (рис. 5).

Для проверки эффективности разработанной системы праймеров и зонда использовали 7 полевых штаммов бактерий, ранее идентифицированных по биологическим свойствам в бактериологических исследованиях как *Staphylococcus aureus*. В качестве положительного кон-

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Cp. Fam	Cp. Hex	Результат
D1	ST 3 (60-40)	16,6		+
D2	K- (60-40)			-
D3	ST 4 (60-40)	16,5		+
D4	K- (60-40)			-
D5	ST 5 (60-40)	16,4		+
D6	K- (60-40)			-
D7	ST 6 (60-40)	16,5		+
D8	K- (60-40)			-
D9	ST 7 (60-40)	16,1		+
D10	K- (60-40)			-

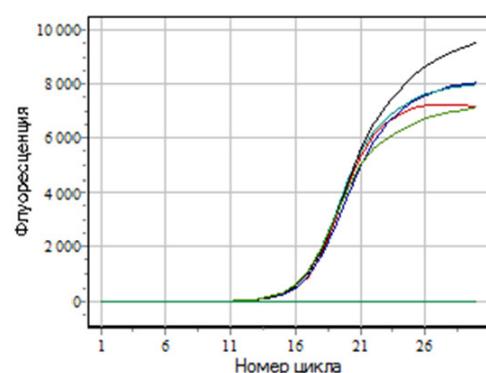


Рис 3. - Подбор оптимальной концентрации разработанных праймеров в режиме реального времени с использованием интеркалирующего красителя SYBR GREEN

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Cp, Fam	Cp, Hex	Результат
F1	<i>Staphylococcus aureus</i>	16,9		+
F2	<i>P. multocida</i> D			-
F3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>			-
F4	<i>Salmonella enterica</i>			-
F5	<i>Bordetella avium</i>			-
F6	<i>Streptococcus pyogenes</i>			-
F7	<i>Salmonella infantis</i>			-
F8	<i>Enterococcus faecalis</i>			-
F9	<i>Escherichia coli</i>			-
F10	<i>Yersinia enterocolitica</i>			-
F11	K(-)			-

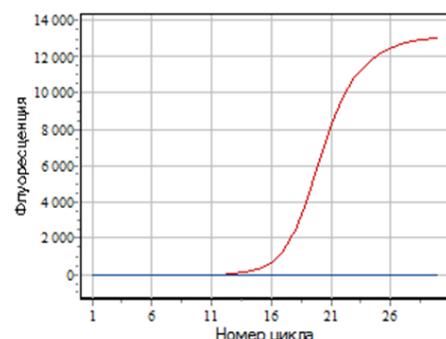
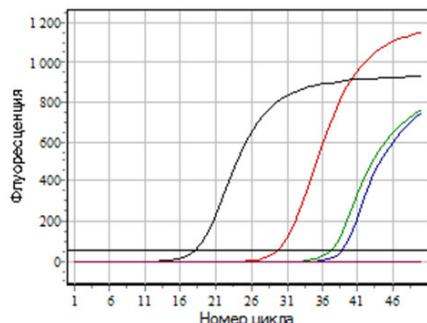


Рис. 4 - Изучение специфичности праймерной системы для идентификации *Staphylococcus aureus*



Номер лунки	Идентификатор пробирки	Cp, Hex	Результат
C1	St aur 3 раз (60-40)	29,7	+
C2	St aur 5 раз (60-40)	37,2	+
C3	St aur 6 раз (60-40)	38,8	+
C4	St aur 7 раз (60-40)		-
C5	St aur 8 раз (60-40)		-
C6	St aur 9 раз (60-40)		-
C7	St aur Исх (60-40)	18,2	+
C8	K- (60-40)		-

Рис. 5 - Результаты изучения чувствительности праймерной системы и зонда для идентификации *St.aureus* методом ПЦР-РВ

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Cp, Hex	Результат
B1	St aur 501 (60-40)	30,1	+
B2	St aur 1 (60-40)	28,5	+
B3	St aur 2K (60-40)	22,4	+
B4	St aur 201 (60-40)	33,7	+
B5	St aur 202 (60-40)	33,4	+
B6	St aur 204 (60-40)	25,6	+
B7	St aur 207 (60-40)	26,1	+
B8	K+ (60-40)	22,3	+
B9	K- (60-40)		-

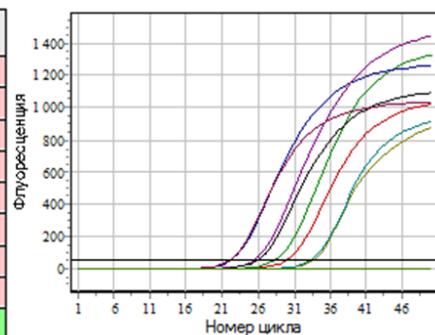


Рис. 6 - Апробация разработанной праймерной системы и зонда для идентификации бактерий вида *Staphylococcus aureus* методом ПЦР

троля использовали референсный штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

В результате проведенного исследования все 7 полевых штаммов *Staphylococcus aureus* успешно идентифицированы (рис.6).

Обсуждение

В настоящее время все больше внимание ученых по всему миру направлено не на выявление стафилококков как зоонозных инфекционных агентов, а на оценку распространенности метициллин-резистентных штаммов *Staphylococcus aureus* (MRSA) и контроль циркуляции этих антибиотикоустойчивых штаммов в объектах ветеринарного надзора [12-21].

Эта тенденция подтверждается и рядом наборов для идентификации бактерий вида

Staphylococcus aureus методом полимеразной цепной реакции, представленным на отечественном рынке:

Тест-система ПЦР на резистентность *Streptococcus aureus* к цефалоспоринам (выявление генов MecA) в режиме реального времени (IDS);

Набор «АмплиСенс® MRSА-скрин-титр-FL» для определения метициллинрезистентности стафилококков (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора);

Набор реагентов для обнаружения ДНК *Staphylococcus aureus* методом полимеразной цепной реакции СТАФИПОЛ (ЛИТЕХ).

Заключение

Таким образом, авторами была разрабо-

тана оригинальная система праймеров для обнаружения бактерий вида *Staphylococcus aureus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени в объектах ветеринарного надзора и патологическом материале. Оптимизированы протоколы для проведения ПЦР-РВ как в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green, так и с использованием флуоресцентного зонда. Специфичность подобраных праймерных систем составила 100%. Чувствительность реакции 10² копий.

Библиографический список

1. Кравченко В. Птицеводство России: курс на экспорт в Китай //Животноводство России. – 2020. – №. 12. – С. 8-11.
2. Буяров А. В., Буяров В. С. Роль отрасли птицеводства в обеспечении продовольственной безопасности России //Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. – №. 7. – С. 84-95.
3. Szafraniec G. M., Szeleszczuk P., Dolka B. A review of current knowledge on staphylococcus agnetis in poultry //Animals. – 2020. – Т. 10. – №. 8. – С. 1421.
4. Szafraniec G. M., Szeleszczuk P., Dolka B. Review on skeletal disorders caused by Staphylococcus spp. in poultry //Veterinary Quarterly. – 2022. – Т. 42. – №. 1. – С. 21-40.
5. Haag A. F., Fitzgerald J. R., Penadés J. R. Staphylococcus aureus in Animals //Microbiology Spectrum. – 2019. – Т. 7. – №. 3. – С. 7.3. 11.
6. Hermans K. et al. Staphylococcus aureus infections in psittacine birds //Avian Pathology. – 2000. – Т. 29. – №. 5. – С. 411-415.
7. Ahmed H. A. et al. Pet birds as potential reservoirs of virulent and antibiotic resistant zoonotic bacteria //Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. – 2021. – Т. 75. – С. 101606.
8. Ruiz-Ripa L. et al. Frequency and characterization of antimicrobial resistance and virulence genes of coagulase-negative staphylococci from wild birds in Spain. Detection of tst-carrying *S. sciuri* isolates //Microorganisms. – 2020. – Т. 8. – №. 9. – С. 1317.
9. Marcon A. V. et al. Bacteriological and histopathological evaluation of articulations of chickens diagnosed with arthritis //Brazilian Journal of Poultry Science. – 2019. – Т. 21.
10. Almousawi A. E., Alhatami A. O. Isolation and molecular characterization of staphylococcus aureus isolated from clinical cases in broilers //Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences. – 2020. – Т. 11. – №. 2. – С. 42-62.
11. Chaudhary S. et al. Prevalence of pododermatitis caused by *Staphylococcus aureus* in poultry birds of Jammu //Intern J Livestock Res. – 2018. – Т. 8. – С. 192-195. DOI 10.5455/ijlr.20170818064853
12. Wang Z. et al. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous and rapid detection of six pathogenic bacteria in poultry //Amb Express. – 2019. – Т. 9. – №. 1. – С. 1-11.
13. Savariraj W. R. et al. Occurrence and enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from retail chicken meat //Food Science and Technology International. – 2021. – Т. 27. – №. 7. – С. 619-625.
14. Galia L. et al. Real-time PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus*, Panton-Valentine Leucocidin and Methicillin Resistance directly from clinical samples //AIMS microbiology. – 2019. – Т. 5. – №. 2. – С. 138.
15. Bogestam K. et al. Introduction of a hydrolysis probe PCR assay for high-throughput screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the ability to include or exclude detection of *Staphylococcus argenteus* //Plos one. – 2018. – Т. 13. – №. 2. – С. e0192782.
16. Assafi M. S., Hado H. A., Abdulrahman I. S. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in broiler and broilers farm workers in Duhok, Iraq by using conventional and PCR techniques //Iraqi Journal of Veterinary Sciences. – 2020. – Т. 34. – №. 1. – С. 15-22.
17. Omoruyi I. M. et al. Virulent gene detection and antibiogramic profile of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from birds of a poultry farm //Ife Journal of Science. – 2020. – Т. 22. – №. 2. – С. 045-055.
18. Syed M. A. et al. Staphylococci in poultry intestines: a comparison between farmed and household chickens //Poultry Science. – 2020. – Т. 99. – №. 9. – С. 4549-4557.
19. Busche T. et al. Comparative secretome analyses of human and zoonotic *Staphylococcus aureus* isolates CC8, CC22, and CC398 //Molecular & Cellular Proteomics. – 2018. – Т. 17. – №. 12. – С. 2412-2433.
20. Shahid A. H. et al. Molecular detection of vancomycin and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from food processing environments //One Health. – 2021. – Т. 13. – С. 100276.
21. Ruiz-Ripa L. et al. Frequency and charac-

terization of antimicrobial resistance and virulence genes of coagulase-negative staphylococci from wild birds in Spain. Detection of tst-carrying *S. sci-*

uri isolates //Microorganisms. – 2020. – T. 8. – №. 9. – C. 1317.

DEVELOPMENT OF PRIMER SYSTEM AND PROBE FOR IDENTIFICATION OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS BY PCR-RV

Suldina E. V., Feoktistova N. A., Lomakin A. A., Mastilenko A. V.
432017, Ulyanovsk, Novyi Venets boulevard, 1, tel.: 89374545651
e-mail: e.suldina2006@yandex.ru
FSBEI HE Ulyanovsk State Agrarian University

Key words: *Staphylococcus aureus*, bird, bacteria, pathogen, polymerase chain reaction, PCR-RV, primer, probe.

The article presents the results of the development and testing of original system of primers and a probe for the identification of bacteria of the *Staphylococcus aureus* species by polymerase chain reaction in «real time» mode. The extension of domestic poultry industry opens up opportunities for the incidence rate of zoonoses. Staphylococci are one of the leading pathogens of bacterial infections in birds, and *Staphylococcus aureus* causes a wide range of diseases in chickens, including septic arthritis, subcutaneous abscesses and gangrenous dermatitis. Therefore, the development of methods for the timely detection of pathogenic variants of *Staphylococcus aureus* is an important task of food safety. For the development of a molecular genetic identification system, a unique DNA region of *Staphylococcus aureus* K39 NODE_3_length_262400_cov_12.378: 113,355..114,623 bp encoding transcription regulator U32 family peptidase was selected. With the help of the BLAST-primer NCBI resource, the UGENA program and the Oligoevaluator resource, the selection and design of oligonucleotide primers and a fluorescent probe for PCR were carried out. Optimization of primer systems showed that the optimal concentration is 3 pM of each primer per reaction, and an increase in the concentration of primers does not affect the effectiveness of the reaction. It has been experimentally established that the optimal concentration of the fluorescent probe in the reaction is 0.4 pM. Protocols have been selected for PCR-RV both in the presence of intercalating dye SYBR Green and using a fluorescent probe. The species specificity of selected primer systems was confirmed experimentally on 9 strains of heterologous bacterial genera and amounted to 100%. The sensitivity of primer system and probe was 10² copies.

Bibliography:

1. Kravchenko V. Poultry farming in Russia: export course to China //Animal Husbandry of Russia. – 2020. – №. 12. – P. 8-11.
2. Buyarov A.V., Buyarov V. S. The role of the poultry industry in providing food security in Russia //Vestnik of Kursk state agricultural academy. – 2020. – №. 7. – P. 84-95.
3. Szafraniec G. M., Szeleszczuk P., Dolka B. A review of current knowledge on *staphylococcus agnetis* in poultry //Animals. – 2020. – T. 10. – №. 8. – C. 1421.
4. Szafraniec G. M., Szeleszczuk P., Dolka B. Review on skeletal disorders caused by *Staphylococcus spp.* in poultry //Veterinary Quarterly. – 2022. – T. 42. – №. 1. – C. 21-40.
5. Haag A. F., Fitzgerald J. R., Penadés J. R. *Staphylococcus aureus* in Animals //Microbiology Spectrum. – 2019. – T. 7. – №. 3. – C. 7.3. 11.
6. Hermans K. et al. *Staphylococcus aureus* infections in psittacine birds //Avian Pathology. – 2000. – T. 29. – №. 5. – C. 411-415.
7. Ahmed H. A. et al. Pet birds as potential reservoirs of virulent and antibiotic resistant zoonotic bacteria //Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. – 2021. – T. 75. – C. 101606.
8. Ruiz-Ripa L. et al. Frequency and characterization of antimicrobial resistance and virulence genes of coagulase-negative staphylococci from wild birds in Spain. Detection of tst-carrying *S. sciuri* isolates //Microorganisms. – 2020. – T. 8. – №. 9. – C. 1317.
9. Marcon A. V. et al. Bacteriological and histopathological evaluation of articulations of chickens diagnosed with arthritis //Brazilian Journal of Poultry Science. – 2019. – T. 21.
10. Almousawi A. E., Alhatami A. O. Isolation and molecular characterization of *staphylococcus aureus* isolated from clinical cases in broilers //Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences. – 2020. – T. 11. – №. 2. – C. 42-62.
11. Chaudhary S. et al. Prevalence of pododermatitis caused by *Staphylococcus aureus* in poultry birds of Jammu //Intern J Livestock Res. – 2018. – T. 8. – C. 192-195. DOI 10.5455/ijlr.20170818064853
12. Wang Z. et al. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous and rapid detection of six pathogenic bacteria in poultry //Amb Express. – 2019. – T. 9. – №. 1. – C. 1-11.
13. Savariraj W. R. et al. Occurrence and enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from retail chicken meat //Food Science and Technology International. – 2021. – T. 27. – №. 7. – C. 619-625.
14. Galia L. et al. Real-time PCR assay for detection of *Staphylococcus aureus*, Panton-Valentine Leucocidin and Methicillin Resistance directly from clinical samples //AIMS microbiology. – 2019. – T. 5. – №. 2. – C. 138.
15. Bogestam K. et al. Introduction of a hydrolysis probe PCR assay for high-throughput screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the ability to include or exclude detection of *Staphylococcus argenteus* //Plos one. – 2018. – T. 13. – №. 2. – C. e0192782.
16. Assafi M. S., Hado H. A., Abdulrahman I. S. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in broiler and broilers farm workers in Duhok, Iraq by using conventional and PCR techniques //Iraqi Journal of Veterinary Sciences. – 2020. – T. 34. – №. 1. – C. 15-22.
17. Omoruyi I. M. et al. Virulent gene detection and antibiogramic profile of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from birds of a poultry farm //Ife Journal of Science. – 2020. – T. 22. – №. 2. – C. 045-055.
18. Syed M. A. et al. Staphylococci in poultry intestines: a comparison between farmed and household chickens //Poultry Science. – 2020. – T. 99. – №. 9. – C. 4549-4557.
19. Busche T. et al. Comparative secretome analyses of human and zoonotic *Staphylococcus aureus* isolates CC8, CC22, and CC398 //Molecular & Cellular Proteomics. – 2018. – T. 17. – №. 12. – C. 2412-2433.
20. Shahid A. H. et al. Molecular detection of vancomycin and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from food processing environments //One Health. – 2021. – T. 13. – C. 100276.
21. Ruiz-Ripa L. et al. Frequency and characterization of antimicrobial resistance and virulence genes of coagulase-negative staphylococci from wild birds in Spain. Detection of tst-carrying *S. sciuri* isolates //Microorganisms. – 2020. – T. 8. – №. 9. – C. 1317.