

РОЗРОБКА ПЛР ТЕСТ-СИСТЕМИ «*CAMPYLOBACTER SPP.*-ПЛР-ТЕСТ» ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ДНК БАКТЕРІЙ РОДУ *CAMPYLOBACTER*

О. М. Дерябін, Н. А. Пустовіт, Л. М. Виговська

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

Проведення дослідження матеріалів на наявність кампілобактерій мікробіологічним методом потребує значних затрат часу, ресурсів, обладання та наявності певних навиків робочого персоналу. Ефективним сучасним методом швидкої діагностики кампілобактеріозу є полімеразна ланцюгова реакція. За допомогою цього методу можливо не тільки здійснювати швидку ідентифікацію збудників у випадку гострих форм захворювання, але й забезпечити виявлення їх у продуктах тваринного походження та в тварин, які являються природними резервуарами збудника. В даній статті викладені результати розробки та випробувань специфічності ПЛР тест-системи “*Campylobacter spp.*-ПЛР-ТЕСТ” для виявлення та ідентифікації ДНК бактерій роду *Campylobacter* в об’єктах навколишнього середовища та клінічних матеріалах на базі відділу молекулярної біології та імунохімії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів.

Campylobacter spp. — грамнегативна, мікроаерофільна або анаеробна, в основному спіралевидна бактерія, яка викликає харчові токсикоінфекції [1].

Удосконалення методів аналізу харчових продуктів на наявність в них збудників гострих кишкових інфекцій (ГКІ), в тому числі бактерій роду *Campylobacter spp.* — одна з найбільш актуальних задач гігієни харчування. Ця задача диктується необхідністю включення мікробіологічних досліджень в систему профілактики ГКІ, а також проведення моніторингу патогенних мікроорганізмів у харчових продуктах. Такий моніторинг повинен базуватися на використанні високоспецифічних кількісних методів. Особливо це потрібно для контролю ефективності протиепідемічних заходів на підприємствах, що працюють з сирими продуктами, з метою зниження перехресної забрудненості, що особливо важливо в разі виявлення кампілобактерій в харчових продуктах [2].

Оскільки *Campylobacter spp.* дуже чутливий до умов культивування (наявність CO₂ і кисню, наявність крові, селективних домішок), культуральні методи їх аналізу досить трудомісткі і багатоступінчасті. При цьому завжди є ризик втрати кампілобактерій через порушення умов інкубації або присутності великої кількості сторонньої мікрофлори [3].

Ефективним сучасним методом швидкої діагностики кампілобактеріозу є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). За допомогою цього методу можливо не тільки здійснювати швидку ідентифікацію збудників у випадку гострих форм захворювання, але й забезпечити виявлення їх у продуктах тваринного походження та в тварин, які являються природними резервуарами збудника.

Сучасні методи молекулярно-генетичного аналізу, засновані на виявленні специфічних для шуканих мікроорганізмів нуклеотидних послідовностей ДНК, значно розширюють можливості виявлення у харчових продуктах важко культивованих патогенних мікроорганізмів [4].

Метою нашої роботи була розробка ПЛР тест-системи “*Campylobacter spp.*-ПЛР-ТЕСТ” для виявлення та ідентифікації ДНК бактерій роду *Campylobacter* в об’єктах навколишнього середовища та клінічних матеріалах.

Матеріали і методи. Пошук нуклеотидних послідовностей проводили за базами даних GeneBank, EMBL (Європейська молекулярно-біологічна бібліотека), DDBJ (Японська база даних нуклеотидних послідовностей) і Entrez (Національний центр біотехнологічної інформації, США).

Розроблений діагностичний набір на основі ПЛР спрямований на швидке виявлення ДНК мікроорганізмів роду *Campylobacter spp.*, (ампліфікація консервативної ділянки гену (16S-F1; 16S-R2) в біологічних матеріалах.

ПЛР проводили на чотириканальному ампліфікаторі "Терцик" виробництва НВФ "ДНК-Технологія" (Росія, м. Москва). До складу тест-системи для проведення 55 аналізів, включаючи контрольні зразки, входить набір реактивів для виділення ДНК та набір реактивів для проведення ПЛР на виявлення ДНК бактерій роду *Campylobacter spp.*; набір реактивів для проведення електрофоретичного аналізу продуктів ПЛР. Для виділення ДНК був взятий метод лізису клітин гуанідинтіоціанатом з наступною сорбцією ДНК на сорбенті.

Результати й обговорення. Основою для розробки нових методів діагностики кампілобактеріозу стали результати аналізу даних літератури та результатів власних досліджень, які переконливо свідчили про перспективність використання методу на основі ПЛР для визначення наявності або відсутності збудника *Campylobacter spp.* та моніторингу хвороби у патологічному матеріалі, об'єктах зовнішнього середовища та продуктах харчування.

Для виконання ПЛР використовували два синтетичних олігонуклеотидних праймери, які вибирали таким чином, щоб вони були комплементарними двом ланцюгам специфічного фрагменту ДНК. Правильний вибір олігонуклеотидних праймерів визначає ефективність і відтворюваність ПЛР.

Розроблена нами тест-система, призначена для виявлення та ідентифікації ДНК бактерій *Campylobacter* методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) "Campylobacter spp.-ПЛР-ТЕСТ". В основі методу лежить виділення з досліджуваного зразку бактеріальної ДНК, проведення ампліфікації специфічної ділянки ДНК *Campylobacter spp.* при використанні специфічних олігонуклеотидних праймерів і синтезу комплементарних ланцюгів ДНК за допомогою ферменту Таq-полімерази. Детекція продуктів ПЛР здійснюється методом електрофорезу в агарозному гелі. Специфічні олігонуклеотидні праймери з наступною послідовністю нуклеотидів та температурних режимів (табл.). Довжина ампліфікованого специфічного фрагменту ДНК *Campylobacter spp.* — 319 п.н.

Розроблені праймери 16S-F1 та 16S-R2 створювались у відповідності до всіх вимог, теоретично мають високу специфічність для зв'язування із ділянками матричної ДНК, не мають критичної гомології з іншими бактеріями, вірусами.

Чутливість тест-системи визначали на різних розведеннях ДНК контрольного зразка *Campylobacter jejuni*: 10^8 g DNA; 10^9 g DNA; 10^{10} g DNA; 10^{11} g DNA; 10^{12} g DNA.

Таблиця

Температурні режими ампліфікатора

Ампліфікатори з регулюванням температури по матриці (термоблоку)	Ампліфікатори з активним регулюванням температури (у середині реакційної пробірки або по математичному алгоритму)
1 цикл – за температури 95 °С – 4 хвилини	1 цикл – за температури 95 °С – 4 хвилини
2 цикл – за температури 95 °С – 1 хвилина	2 цикл – за температури 95 °С – 30 секунд
за температури 60 °С – 1 хвилина	за температури 60 °С – 30 секунд
за температури 72 °С – 2 хвилини	за температури 72 °С – 30 секунд
Цикл 2 повторюють 35 разів	Цикл 2 повторюють 35 разів
3 цикл - за температури 72 °С – 7 хвилини	3 цикл - за температури 72 °С – 4 хвилини
4 цикл - за температури 10 °С – збереження	4 цикл - за температури 10 °С – зберігання

Чутливість даної тест-систем для детекції *Campylobacter jejuni* становить 10^{11} g DNA.

Для перевірки таксономічної специфічності тест-системи були використані штами бактерій *Salmonella*, *Esheria coli*, *Yersinia entocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*. Ці мікроорганізми представленою тест-системою не виявляються (рис.1). На рисунку дуже яскраво світиться позитивний зразок *Campylobacter spp.* (*Campylobacter jejuni*), довжина фрагменту 319 п.н. Інші зразки не дають свічіння на даній висоті і тому вважаються негативними.

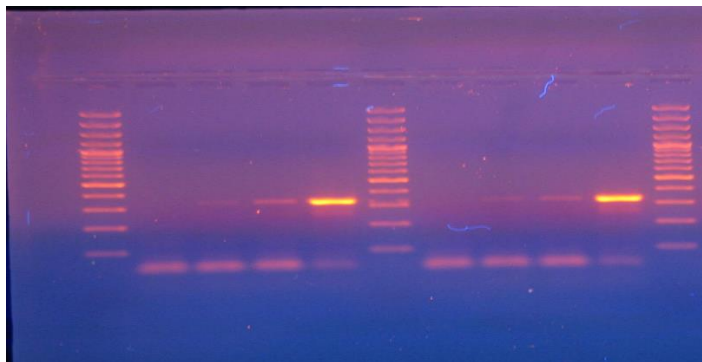


Рис. 1. Електрофореграма перевірки таксономічної специфічності тест-системи

У період з 13.01.2014р. по 08.08.2014р. ДНКІБШМ було проведено дослідження проб (фекалії, підстилка, вода, силос, комбікорм, товстий і тонкий кишківник, змиви з тушок, кліток) для виявлення збудника кампілобактеріозу *Campylobacter spp.* (рис. 2).

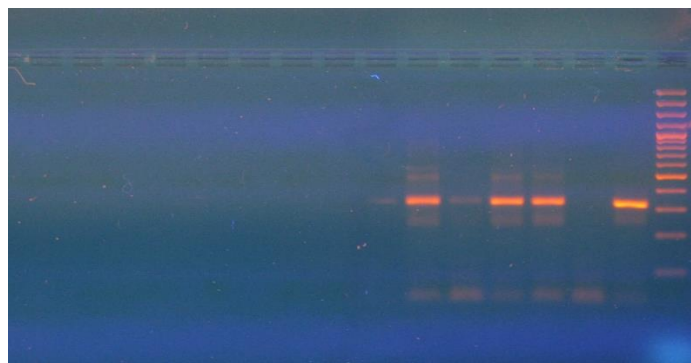


Рис. 2. Електрофореграма дослідження проб на виявлення мікроорганізмів роду *Campylobacter spp.*

На даному рисунку показана позитивна реакція досліджуваних проб, довжина фрагменту відповідає 319 п.н., що свідчить про наявність *Campylobacter spp.* Дослідження проводили паралельно на двох тест-системах: “*Campylobacter spp.*-ПЛР-ТЕСТ” розробки Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів і АмплиСенс® *Campylobacter spp.*-EPH (Москва, Центральний науково-дослідний інститут епідеміології МОЗ РФ). Перевагою нашої тест-системи є безпечність та висока специфічність.

В И С Н О В К И

1. Розроблена нами тест-система є безпечною в використанні, проявляє високу специфічність, що переважає над тест-системами, що нині використовуються.
2. Чутливість тест-системи складає становить 10^{-11} g DNA.

Перспективи подальших досліджень. Розроблена тест-система пропонується для впровадження до застосування у ветеринарній практиці на регіональному рівні (обласні та районні ветеринарні лабораторії) та загальнодержавному рівнях (Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи).

DEVELOPMENT OF PCR TEST SYSTEMS "CAMPYLOBACTER SPP.-PCR TEST" FOR THE DETECTION AND IDENTIFICATION OF BACTERIA OF THE GENUS CAMPYLOBACTER DNA

O. N. Deryabin, N. A. Poustovit, L. N. Vygovskaya

State Scientific-Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms

S U M M A R Y

This article presents the results of development and testing of the specificity of the PCR test system "*Campylobacter spp.*-PCR test" for the detection and identification of bacteria of the genus *Campylobacter* DNA in environmental samples and clinical specimens on the basis of molecular biology and immunochemistry State Scientific Control Institute of Biotechnology and strains of microorganisms.

РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ "CAMPYLOBACTER SPP.-ПЦР-ТЕСТ" ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ДНК БАКТЕРИЙ РОДА CAMPYLOBACTER

О. Н. Дерябин, Н. А. Пустовит, Л. Н. Выговская

Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов микроорганизмов

А Н Н О Т А Ц И Я

В данной статье изложены результаты разработки и испытаний специфичности ПЦР тест-системы "*Campylobacter spp.*-ПЦР-ТЕСТ" для выявления и идентификации ДНК бактерий рода *Campylobacter* в объектах окружающей среды и клинических материалах на базе отдела молекулярной биологии и иммунохимии Государственного научно-контрольного института биотехнологии и штаммов микроорганизмов.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Skirrow, M. B.* 1994. Diseases due to *Campylobacter*, *Helicobacter* and related bacteria. *J. Comp. Pathol.* 111. — P. 113–149.
2. *Nam H. M., Srinivasan V., Murinda S. E.* // *Foodborne Pathog. Dis.* — 2005. — Vol. 2, N 2. — P. 160–168.
3. *Borck B., Stryhn H., Ersboll A. K.* // *J. Appl. Microbiol.*— 2002. — Vol. 92.— P. 574–582.
4. *Humphrey T., O'Brien S., Madsen M.* // *Int. J. Food Microbiol.* — 2007. — Vol. 117. — P. 237–257.