

На правах рукописи

**БРЮСОВА Мария Борисовна**

**РАЗРАБОТКА ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ  
ЭНТЕРОГЕМОРРАГИЧЕСКИХ E.COLI И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ  
E.COLI O157:H7**

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология с микотоксикологией и иммунология

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук



Москва - 2008

Работа выполнена в лаборатории генодиагностики инфекционных болезней животных отдела биотехнологии Федерального государственного учреждения «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ») Россельхознадзора Министерства сельского хозяйства Российской Федерации

**Научный руководитель:** Доктор биологических наук, профессор  
Обухов И. Л.

**Официальные оппоненты:** Доктор ветеринарных наук,  
Скляров О.Д. (ФГУ «ВГНКИ»)  
Доктор ветеринарных наук, профессор  
Белоусов В. И. (ФГУ Центральная научно-методическая ветеринарная лаборатория Россельхознадзора МСХ РФ)

**Ведущая организация:** Государственное научное учреждение  
"Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены экологии Россельхозакадемии"

Защита диссертации состоится «19» февраля 2009 г. в 15<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 220.011.01 в Федеральном государственном учреждении «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГУ «ВГНКИ»)

Адрес: 123022, г. Москва, Звенигородское шоссе, д. 5

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ ВГНКИ.

Автореферат разослан «23» декабря 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат ветеринарных наук, доцент, Заслуженный ветеринарный врач РФ

  
Козырев Ю.А.

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 1.1. Актуальность темы

Впервые энтерогеморрагические кишечные палочки (ЭГКП) идентифицированы в 1982 г., когда штаммы *E. coli* ранее неизвестного серотипа O157:H7, оказались причиной двух крупных вспышек гемморагического колита у детей в США (Schlundt 2001; Clarke et al., 2002).

Основным резервуаром ЭГКП является крупный и мелкий рогатый скот (Beutin L et al., 1993). Однако такие домашние животные, как свиньи, лошади, олени, птицы, собаки и кошки так же могут быть носителями ЭГКП (Johnson R.P. et al. 1996). Выделяя бактерии с фекалиями во внешнюю среду, животные служат основным источником контаминации различных объектов ЭГКП. При проведении мониторинга ЭГКП среди сельскохозяйственных животных в Европе, обнаружено, что в Германии около 20,8% животных и 2,6% исследованных проб мяса крупного рогатого скота (крс) были заражены *E. coli* O157:H7. При исследовании образцов мяса в Финляндии, данный показатель составил 1,4%, а в Бельгии -1,26% (Chapman P.A. et al., 2000). При проведении мониторинга ЭГКП серовара O157:H7 в хозяйствах Рязанской, Воронежской, Тульской и Орловской областей обнаружено, что носительство среди крс составляет 2,6%, среди свиней 0,9% и птиц - 0,8% (Степаншин Ю.Г. и соавт., 2006).

Вспышки инфекции у человека возникают при употреблении пищевых продуктов животного происхождения, контаминированных эшерихиями в процессе убоя, переработки, упаковки, хранения и приготовления пищи, а также фруктов и овощей, обсеменение которых происходит в результате контакта с фекалиями домашних и диких животных на какой-либо стадии их выращивания или обработки. По данным Центра Всемирной Организации Здравоохранения Животных (МЭБ), каждый год на территории США в среднем регистрируется до 72 000 случаев заболеваний людей, вызванных ЭГКП, из них около 60 летальных. В Великобритании в период 1995-2000 гг. зарегистрировано 18 вспышек гемморрагического колита (ГК) у людей, заболеваемость за это время возросла с 6 до 411 случаев на 100 тыс. населения,

а число смертельных исходов составило 2,5% (Paiba G.A. et al., 2006 ).

Наиболее распространенным и значимым для здравоохранения серологическим вариантом ЭГКП является серовар O157:H7, тем не менее, при спорадических случаях и эпизоотиях часто выявляются и другие серогруппы эшерихий: O26, O91, O103, O104, O111, O113, O117, O118, O121, O128, O145 (Johnson R.P. et al. 1996, Karmali M.A. et al., 2004), идентификация которых имеет немаловажное значение.

Сложность определения энтерогеморрагических эшерихий обусловлена тем, что среди множества непатогенных близкородственных представителей необходимо выявлять единичные серогруппы, которые приобретают измененные свойства в результате генетических мутаций, и не имеют фенотипических свойств, прочно коррелирующих с патогенностью.

Разработка новых высокочувствительных и специфичных экспресс методов для идентификации энтерогеморрагических *E. coli* является актуальной задачей. В последние годы широкое распространение во многих странах получил метод выявления факторов патогенности ЭГКП с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Большинство молекулярно-генетических методик, разработанных для идентификации ЭГКП, направлены на прямое выявление генов, кодирующих веротоксины (Cebula et al., 1995; Deng and Fratamico, 1996; Fratamico et al., 1995; Gannon et al., 1997; Nagano et al., 1998; Paton and Paton, 1998; Ziebell K.A. et al. 2002; Wang G. et al., 2002). Метод ПЦР отличается высокой чувствительностью, специфичностью и универсальностью и позволяет выявлять ЭГКП не только в биологическом материале, но и в объектах внешней среды.

## **1.2. Цель и задачи исследований**

Целью настоящей работы являлась разработка тест-системы для идентификации энтерогеморрагических *E. coli* и дифференциации *E. coli* O157:H7 методом ПЦР.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Сконструировать олигонуклеотидные праймеры для идентификации энтерогеморрагических *E. coli* и дифференциации серологического варианта

- O157:H7, разработать оптимальные параметры ПЦР и оценить эффективность различных способов выделения ДНК из патологического материала;
2. Провести оценку аналитических и диагностических характеристик разработанной тест-системы;
  3. Сравнить чувствительность и специфичность разработанной тест-системы с традиционным методом;
  4. Провести комиссионные испытания ПЦР-тест-системы для идентификации *E.coli* O157:H7 и дифференциации веротоксинов энтерогеморрагических *E.coli* методом ПЦР.

### 1.3. Научная новизна

Впервые сконструированы оригинальные праймеры для амплификации ДНК энтерогеморрагических *E. coli* и дифференциации *E.coli* O157:H7 в формате электрофоретической детекции.

Разработан положительный контрольный образец (ПКО) ДНК VT1, VT2, H7, являющийся генно-инженерной конструкцией, несущей вставки фрагментов генов *stx1*, *stx2* и *fliC<sub>H7</sub>* *E. coli* O157:H7. ПКО позволяет контролировать работу амплификационной смеси и является маркером длины ПЦР-продуктов.

Впервые в России разработана ПЦР тест-система для идентификации *E. coli* O157:H7 и дифференциации энтерогеморрагических *E. coli*, обладающая 100% специфичностью с пределом аналитической чувствительности 100 мк/мл.

### 1.4. Практическая значимость работы

Впервые в России разработана и внедрена в ветеринарную практику тест-система «КОЛИ-ДИФ» для идентификации *E. coli* O157:H7 и дифференциации энтерогеморрагических *E. coli* методом ПЦР. Использование метода ПЦР в диагностических лабораториях позволит в течение одного рабочего дня проводить анализ биологического материала, продукции животного происхождения, объектов внешней среды на наличие ЭГКП, а также дифференцировать серологический вариант O157:H7, тогда как

идентификация ЭГКП бактериологическим методом занимает от 6 до 7 суток и требует применения дополнительного исследования для определения веротоксинов.

С 2006 года на базе ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора аттестовано производство и налажен серийный выпуск тест-системы «КОЛИ-ДИФ» (Аттестат № 1167 от 01.02.06). Рекламаций на тест-систему в течение трех лет не поступало.

### **1.5. Апробация работы**

Основные положения диссертационной работы доложены и одобрены на заседаниях Ученого совета ФГУ «ВГНКИ» (2004–2007 гг.), а также на научных и практических конференциях:

- Всероссийской научной конференции «Совершенствование методов контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов», посвященной 75-летию ФГУ «ВГНКИ» (Москва, 2006 г.);
- 6-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2007» (Москва, 2007 г.);
- Научно-проблемных методических комиссиях ФГУ «ВГНКИ» (2004–2007 гг.).

### **1.6. Публикации**

По теме диссертации опубликованы 4 научные статьи, одна из которых – в рецензируемом журнале «Ветеринария», рекомендуемом ВАК.

### **1.7. Основные положения диссертационной работы, выносимые на защиту**

1. Выбор праймеров для идентификации энтерогеморрагических *E. coli* и дифференциации *E. coli* O157:H7, оптимизация условий выделения и амплификации ДНК;
2. Определение чувствительности и специфичности разработанной тест-системы;

3. Апробация и регистрация ПЦР-тест-системы для идентификации *E. coli* O157:H7 и дифференциации шигаподобных токсинов энтерогеморрагических *E. coli* методом полимеразной цепной реакции.

### 1.8. Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 104 страницах компьютерного текста (текстовый редактор «Microsoft Word 2003»), и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов исследований, выводы, практические предложения. Диссертация иллюстрирована 11 рисунками и 12 таблицами. Приложение к диссертации содержит разработанную нормативную документацию, подтверждающую результаты исследований, их научно-практическую ценность. Список литературы включает 162 источника, в том числе 127 иностранных.

Приносим искреннюю благодарность за помощь в проведении исследований сотрудникам ФГУ «ВГНКИ»: д.в.н. Тугаринову О.А., д.в.н Пирожкову М.К., Стрельченко С.А., ФГУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора: к.м.н. Подколзину А.Т.

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Поиск нуклеотидных последовательностей проводили по базам данных GeneBank – Национального института здоровья США, EMBL – Европейской молекулярно-биологической лаборатории, DDBJ – Национального института генетики Японии и PDB – базы данных белковых последовательностей при помощи поисковой системы Entrez Национального центра биотехнологической информации США.

Анализ выбранных нуклеотидных последовательностей на вариабельность и поиск консервативных участков, необходимых для выбора праймеров проводили с помощью системы ClustalW Multi Sequence Alignment. Специфичность выбранных праймеров теоретически изучали с помощью компьютерных программы FASTA (Pearson W.G. 2000) и BLAST on-line ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast)).

Выбранные праймеры были синтезированы ЗАО "Синтол" (г.Москва) фосфоамитидным методом на синтезаторе ASM-102 (г. Новосибирск).

Для оценки аналитической чувствительности и специфичности разработанной тест-системы использовали штаммы из коллекции ФГУ «ВГНКИ», любезно предоставленные лабораторией качества и стандартизации лекарственных средств против бактериальных болезней животных, - 40 штаммов *E. coli*, из них 12 серологического варианта O157:H7 и O157:H. (табл. 1), а также культуры других патогенных энтеробактерий: *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni subsp. jejuni*.

Культивирование бактерий проводили на полужидком МПА. Концентрацию микробных клеток определяли по оптическому стандарту мутности. Выделение ДНК из различных образцов проводили методом аффинной сорбции на силикагеле с предшествующим лизированием пробы в гуанидинтиоцианате (Boom R. et al., 1990), а так же методом протеиназной обработки и осаждения этанолом с предварительной фенольной экстракцией (Maniatis T. et al., 1982).

В качестве внутреннего контроля качества выделения ДНК использовали ВКО-СМУ. ПЦР проводили на амплификаторе ТЕРЦИК ("ДНК-технология"), по следующей программе: 95 °С – 2 мин, 1 цикл; 95 °С – 10 с, (57–65) °С – 10 с, 72 °С – 10 с, 40 циклов; 10 °С – хранение. ПЦР проводили в реакционном буфере объемом 25 мкл следующего состава: каждого праймера по (5–15) пмоль, каждого дНТФ по 0,2 мМ, 0,5 ед Таq-полимеразы, трис-НСl 68 мМ, сульфата аммония 17 мМ, сульфата магния от 1 до 3 мМ, твин-20 0,01 %, бычьего сывороточного альбумина 0,1 мг/мл. В качестве матрицы (ДНК-пробы) брали 10 мкл препарата ДНК. Оптимальную концентрацию сульфата магния, концентрацию и температуру отжига праймеров подбирали в ходе работы.

Полученные ПЦР-продукты визуализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

Перечень штаммов *E. coli*, использованных в работе

№ п/п	Номера штаммов <i>E.coli</i>	Серовар	Тип веротоксина	№ п/п	Номера штаммов <i>E.coli</i>	Серовар	Тип веротоксина
1	35150	O157:H7	VT1, VT2	21	F41	O101:F41	-
2	43888	O157:H7	VT1, VT2	22	2005	O141:K99	-
3	43889	O157:H7	VT2	23	ТП85	O115:K88	-
4	43890	O157:H7	VT1	24	430	O8:K8	-
5	43894	O157:H7	VT1, VT2	25	723	O138:K81	-
6	43895	O157:H7	VT1, VT2	26	1308	O26:K60	-
7	51675	O157:H7	VT1, VT2	27	733	O119:K69:H4	-
8	51658	O157:H7	VT1, VT2	28	115/2	O115	-
9	51659	O157:H7	VT1, VT2	29	39/2	O55	-
10	161	O157:H7	VT2	30	660	O41	-
11	904	O157:H7	VT1, VT2	31	1092	O147:K89:K88	-
12	1271	O157:H	VT1, VT2	32	857	O86:K61:H32	-
13	1463	O117:K62:H4	*	33	1407	O101:K99	-
14	1370	O20	-	34	6/н	O145	-
15	1111	O149:K91:K88	-	35	6/н	O125	-
16	1084	O139:K82	-	36	727	O141:K87:K88	-
17	899	O15:K14:H30	-	37	<i>E.coli</i>	O138:K81:K88ac	-
18	1330	O9:K30	-	38	<i>E.coli</i>	O157:K88	-
19	1230	O8:K43	-	39	<i>E.coli</i>	O9:K35:K99 (K30)	-
20	987	O9:K103:987P	-	40	<i>E.coli</i>	O9:K35:K99-F41 (K3)	-

\* - не образуют веротоксины

Секвенирование фрагментов амплификации выполняли методом "cycle sequence" на амплификаторе GeneAmp® PCR System 2400 (Perkin-Elmer, США) с набором «ABI PRISM Big Dye™» Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, включающим ДНК-полимеразу AmpliTaq-FS (Taq-FS, Applied Biosystems, США), согласно инструкции изготовителя с использованием капиллярного

автоматического секвенатора «ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyzer» («Applied Biosystems», США).

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Разработка тест-системы проводилась в несколько этапов: выбор генов-мишеней для идентификации ЭГКП и выбор генов-мишеней для дифференциации *E. coli* O157:H7, выбор олигонуклеотидных праймеров, оптимизация условий мультиплексной ПЦР для выявления ЭГКП и оптимизация условий ПЦР для дополнительной дифференциации серотипа O157:H7, подбор оптимального метода выделения ДНК, разработка контрольных образцов тест-системы, изучение аналитических характеристик и стабильности препарата.

#### 3.1. Выбор олигонуклеотидных праймеров

Основным фактором патогенности ЭГКП является способность образовывать шигаподобные вероцитотоксины. В настоящее время изучено и идентифицированы две их разновидности: веротоксин-1 и веротоксин-2 (VT1, VT2). Гены *stx1* и *stx2*, кодирующие выработку этих веротоксинов, находятся в хромосоме, в районе профага. Штаммы ЭГКП могут экспрессировать либо один из этих токсинов, либо оба (Nataro J. P., 1998; Karmali M.A., 2004). Таким образом в качестве мишеней для специфических праймеров были выбраны фрагменты последовательностей генов *stx1* и *stx2*, кодирующие А субъединицы этих токсинов.

В результате анализа баз данных нуклеотидных последовательностей были выбраны две пары специфических праймеров – «VT1» и «VT2» для дифференциальной амплификации ДНК гена *stx1* и гена *stx2*, соответственно. В одной реакционной смеси праймеры амплифицируют фрагмент ДНК *stx1* длиной 730 п.н. и (или) ДНК *stx2* длиной 310 п.н. Разница длин амплифицируемых продуктов (730 и 310 п.н.) позволяет уверенно дифференцировать их электрофорезом в агарозном геле. Теоретический анализ комплиментарности праймеров генам *stx1* и *stx2*, проведенный при помощи

компьютерных программ, показал максимальную их гомологию с выбранными ДНК-мишенями.

Среди группы ЭГКП наиболее распространенным и значимым для здравоохранения серологическим вариантом является серовар O157:H7. В качестве гена-мишени для дифференциации *E. coli* серологического варианта O157:H7 был выбран ген *fliC*, кодирующий жгутиковый H антиген. У *E. coli* официально зарегистрировано 53 типа H антигенов, H1-H12, H14-H21, H23-H49, H51-H56. H-антигены служат важным дифференциально-диагностическим признаком для идентификации *E. coli*. Жгутиковые антигены эшерихий характеризуются серологической обособленностью и не проявляют антигенных взаимосвязей с H-антигенами других бактерий семейства *Enterobacteriaceae* (F.Orskov, I.Orskov, 1984; Ewing W.H., 1986). Аминокислотная последовательность терминальных участков этого антигена очень консервативна, тогда как центральная часть достаточно вариабельна, что дает возможность их серологического типирования.

Однако, из литературных данных известно, что последовательности гена H7 *E. coli* серовара O157 и серовара O55, который филогенетически считается неверотоксигенным предком O157, имеют отличия от гена H7 других сероваров *E. coli* (Reid S.D. et al., 1998; Wang L. et al., 2000; Ratiner Y.A. et al., 2002). В результате анализа баз данных нуклеотидных последовательностей были выбраны специфические праймеры – «H7» для дифференциальной амплификации ДНК гена *fliC<sub>H7</sub>* *E. coli* O157:H7.

Структура каждого праймера удовлетворяет общепринятым правилам: отсутствие самокомплементарности 3'-концов каждого олигонуклеотида, отсутствие комплементарности 3'-концов прямых и обратных праймеров, отсутствие вторичных структур, отсутствие тугоплавких повторов (более 3-х GC) на 3'-конце каждого праймера, отсутствие многократных AT (или GC)-повторов внутри каждого праймера.

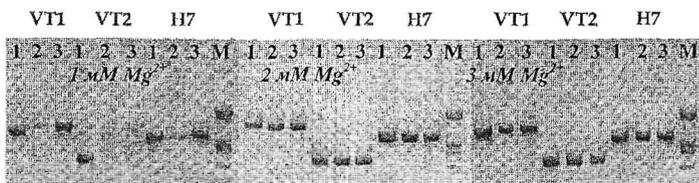
### 3.2. Изучение специфичности выбранных праймеров

С помощью специализированных программ FASTA и BLAST on-line была показана гомология выбранных олигонуклеотидов только с генами *stx1* и *stx2*, а так же *fliC<sub>H7</sub>*, и не обнаружено их значимой гомологии с нуклеотидными последовательностями генов других бактерий, вирусов или эукариот. Таким образом, предложенные праймеры, исходя из теоретических расчетов, должны обладать 100% специфичностью.

### 3.3. Подбор условий ПЦР

Известно, что эффективность ПЦР зависит от температуры отжига праймеров, их концентрации, концентрации ионов  $Mg^{2+}$ , а также от количества циклов амплификации и концентрации ДНК-матрицы. Варьирование этих параметров оказалось достаточным для получения стабильных результатов.

Количество ионов  $Mg^{2+}$  варьировали от 1 мМ до 3 мМ (рис.1). В эксперименте использовались ДНК *E.coli* O157:H7 культур штаммов № 43894, № 43895, № 43888, продуцирующих два веротоксина, с концентрацией  $10^3$  мк/мл в ПЦР-пробе.

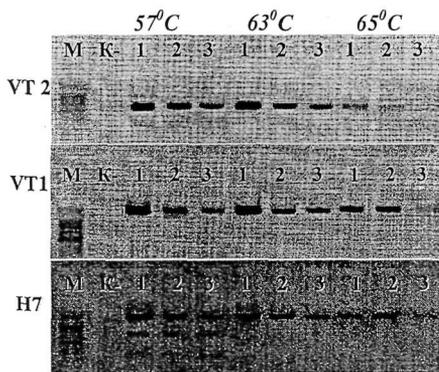


**Рис. 1. Выбор оптимальной концентрации  $Mg^{2+}$**   
1 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43894; 2 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43895; 3 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43888 (концентрация  $10^3$  мк/мл); M - маркер: набор фрагментов ДНК длиной 1200, 550, 450 и 200 п.н.

Во всех случаях неспецифических реакций амплификации на отрицательных контролях замечено не было. При увеличении концентрации  $Mg^{2+}$ , как правило, наблюдается увеличение концентрации специфического продукта реакции, что наблюдается и в данном случае. Оптимальной концентрацией  $Mg^{2+}$  для тестируемых праймеров, которая обеспечивает высокий выход специфического продукта реакции без дополнительных неспецифических фрагментов выбрана концентрация 3мМ.

Эффективность амплификации при разных температурах отжига изучали отдельно для каждой пары праймеров. В качестве ДНК-матрицы использовали последовательные 10-ти кратные разведения ДНК *E.coli* культуры штамма № 43894 с концентрацией от  $10^4$  мк/мл до  $10^2$  мк/мл в ПЦР-пробе (рис. 2).

Варьирование температуры отжига праймеров в диапазоне от 57 до 63°C не оказывало влияние на чувствительность теста, в то время как увеличение температуры отжига до 65°C уменьшало чувствительность амплификации ДНК stx1, stx2 и Н7. Однако, при температуре отжига 57°C, во всех случаях наблюдались неспецифические фрагменты.



**Рис. 2. Выбор оптимальной температуры отжига праймеров**

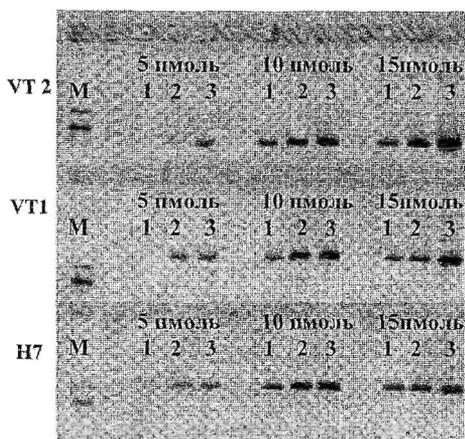
1 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43894 в концентрации  $10^4$  мк/мл; 2 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43894 в концентрации  $10^3$  мк/мл; 3 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43894, в концентрации  $10^2$  мк/мл; М – маркер: набор фрагментов ДНК длиной 100,200,300,400,500,800 п.н.; К- отрицательный контрольный образец

В результате проведенных экспериментов была определена оптимальная температура отжига, равная 63°C, при которой одинаково успешно работают как праймеры «VT1», так и праймеры «VT2», что позволило в дальнейшем объединить их в одной реакционной смеси. Для праймеров «Н7» также оптимальной была выбрана температура 63°C.

С целью снижения себестоимости теста и предотвращения возможных неспецифических реакций была подобрана оптимальная концентрация праймеров.

Количество праймеров в реакционной смеси варьировали от 5 до 15 пмоль. В качестве ДНК-матрицы использовали последовательные 10-ти кратные разведения ДНК *E.coli* культуры штамма № 43894 с концентрацией от  $10^4$  мк/мл до  $10^2$  мк/мл в ПЦР-пробе (рис. 3).

Как видно из рис. 3, оптимальное содержание праймеров «VT1», «VT2» и «H7» в реакционной смеси - 10 пмоль. Снижение количества праймеров в 2 раза уменьшало чувствительность ПЦР в 10 раз, а их увеличение до 15 пмоль не влияло на чувствительность реакции.

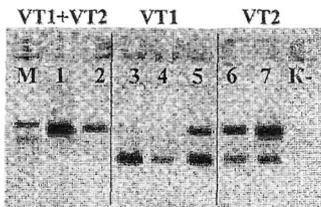


**Рис. 3. Выбор оптимальной концентрации праймеров**

M – маркер: набор фрагментов ДНК длиной 630 и 330 п.н.; 1 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43894 в концентрации  $10^2$  мк/мл; 2 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43894 в концентрации  $10^3$  мк/мл; 3 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43894, в концентрации  $10^2$  мк/мл

Для объединения праймеров «VT1», «VT2» в одной реакционной смеси было необходимо оценить их минимальное количество в общей реакционной смеси (рис. 4). С этой целью были приготовлены разведения ДНК, которые содержали как матрицу ДНК stx1, так и ДНК stx2. В качестве ДНК-матрицы использовали последовательные 10-ти кратные разведения ДНК *E.coli* культур штаммов № 43890, 43889, каждый из которых несет по одному токсину stx1 и stx2 соответственно, с концентрацией от  $10^3$  мк/мл до  $10^2$  мк/мл в ПЦР-пробе. ПЦР ставили в следующих соотношениях:  $10^3$  мк/мл ДНК штамма № 43890 и  $10^2$  мк/мл ДНК штамма 43889,  $10^2$  мк/мл ДНК штамма № 43890 и  $10^2$  мк/мл

ДНК штамма № 43889,  $10^2$  мк/мл ДНК № 43890 и  $10^3$  мк/мл ДНК штамма № 43889 в ПЦР-пробе. Амплификацию проводили в присутствии 10 пмоль каждого праймера.



**Рис. 4. Выбор оптимальной концентрации праймеров смеси «VT1+ VT2»**

*M* – маркер: набор фрагментов ДНК длиной 300, 400, 500, 800 п.н.; 1 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43889 в концентрации  $10^3$  мк/мл; 2 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43889 в концентрации  $10^2$  мк/мл; 3 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43890 в концентрации  $10^3$  мк/мл; 4 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43889 в концентрации  $10^2$  мк/мл; 5 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43889 в концентрации  $10^2$  мк/мл+ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43890 в концентрации  $10^3$  мк/мл; 6 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43889 в концентрации  $10^2$  мк/мл+ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43890 в концентрации  $10^2$  мк/мл; 7 - ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43889 в концентрации  $10^3$  мк/мл+ДНК *E.coli* O157:H7 штамм № 43890 в концентрации  $10^2$  мк/мл

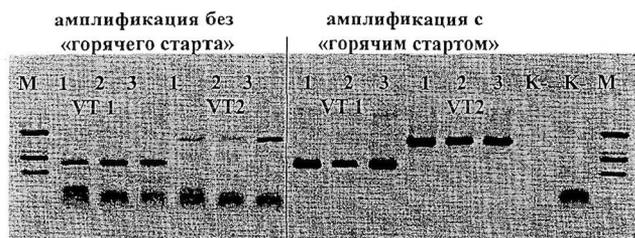
Во всех случаях ПЦР позволила детектировать по  $10^2$  мк/мл каждой ДНК как отдельно, так и в одной пробе.

В результате проведенных экспериментов было подобрано оптимальное количество праймеров, равное 10 пмоль каждого, обеспечивающее максимальную чувствительность при минимальном расходе реактивов.

Для исключения неспецифических реакций и увеличения чувствительности ПЦР была использована методика «горячего старта». В качестве ДНК-матрицы использовали ДНК *E.coli* культуры штамма № 43894 с концентрацией от  $10^3$  мк/мл в ПЦР-пробе.

Амплификация без «горячего старта» давала дополнительные полосы на электрофореграмме отличные от специфических полос. Во всех дорожках геля (включая отрицательный контроль ПЦР – ТЕ-буфер), соответствующих амплификации без «горячего старта» отмечено наличие полосы ниже уровня 200 п.н., что соответствует побочному продукту амплификации – праймер-димерам. Очевидно, взаимодействие Taq-полимеразы с праймерами ниже

температуры отжига привело к их самодеструкции, несмотря на то, что при выборе праймеров они были проверены на отсутствие самокомплиментарности на 3'-концах. Следует отметить, что интенсивность специфических полос, особенно высокомолекулярной полосы ДНК *stx2* (730 п.н.), при амплификации без «горячего старта» уступала таковой при его наличии, что подтверждает преимущественное накопление низкомолекулярного побочного продукта реакции при отсутствии «горячего старта». Таким образом, применение методики «горячего старта» позволяет добиться стабильных результатов и увеличить эффективность накопления специфического ПЦР-продукта.



**Рис. 5.** Влияние «горячего старта» на эффективность амплификации 1, 2, 3 - штамм *E. coli* № 43894, К- отрицательный контроль, М - маркер молекулярных масс ДНК (1200, 550, 450 и 200 п.н.)

### 3.5. Подбор методов выделения (очистки) ДНК

Классическим методом выделения ДНК из биологического материала является фенол-хлороформная экстракция с предварительной обработкой протеиназой К (Maniatis T. et al., 1982). Эта методика позволяет получать высокоочищенную ДНК, однако трудоемка, к тому же включает стадии переноса материала из пробирки в пробирку, что значительно увеличивает риск контаминации от пробы к пробе (Saiki R.K. et al., 1985; Saiki R.K. et al., 1988).

Альтернативой классической методике является метод аффинной сорбции ДНК на силикагеле (Boom R. et al., 1990). В данном случае сорбент вносится в пробирку с лизированным материалом, ДНК связывается с сорбентом, затем отмывается от ингибиторов промывочными растворами и элюируется с сорбента ТЕ-буфером. Так как выделение ДНК происходит в

одной пробирке, это препятствует возникновению перекрестной контаминации и упрощает процесс.

При сравнении вышеописанных методов выделения ДНК было установлено, что метод аффинной сорбции не уступает классическому по качеству выделения ДНК, однако является менее длительным и трудоемким. Поэтому для тест-системы была выбрана методика аффинной сорбции ДНК на силикагеле.

### **3.6. Внутренний контрольный образец (ВКО)**

Для исключения ложноотрицательных результатов связанных с ошибками исследователя при выделении ДНК или постановке ПЦР, использовался внутренний контрольный образец (ВКО). В качестве внутреннего контроля качества выделения ДНК использовали ВКО-СМV. ВКО добавляли в исследуемые образцы на этапе выделения ДНК и подвергали всем этапам выделения ДНК, ПЦР и электрофореза, амплификацию ВКО проводили в отдельной пробирке с праймерами, специфичными для ВКО.

### **3.7. Отрицательные и положительные контрольные образцы**

В связи с многоступенчатостью ПЦР-анализа необходимо контролировать каждую его стадию. Важной задачей является не только исключение ложноотрицательных, но и ложноположительных результатов. Для этого на этапе выделения ДНК использовали отрицательный контрольный образец (ОКО), а на этапе амплификации отрицательный контроль ПЦР (К-).

ОКО служит для оценки возможной контаминации реактивов для выделения ДНК. В качестве материала для отрицательного контрольного образца тест-системы использовали стандартный ОКО, производства ЦНИИЭ. Отрицательный контроль ПЦР представляет собой реакционную смесь, в которой присутствуют все компоненты (праймеры, нуклеотиды, Taq-полимераза), за исключением ДНК-пробы и служит для контроля амплификационных реактивов. В нашей тест-системе в качестве «К-» использовали TE-буфер для элюции ДНК с сорбента.

Контроль работы амплификационной смеси и работы амплификаторов осуществляли с помощью положительных контрольных образцов (ПКО). Положительным контрольным образцом является генно-инженерная конструкция фага  $\lambda$ gt10 несущая вставки фрагментов генов *stx1*, *stx2* и *fliC<sub>H7</sub>* *E. coli* O157:H7, включающих область праймеров. Амплификат положительного контрольного образца является маркером длины ПЦР-продуктов для последующей электрофоретической детекции, т.е. позволяет контролировать последний этап ПЦР-анализа.

### 3.8. Состав разработанной тест-системы

Разработанная тест-система включает в себя четыре набора реагентов.

Первый – набор для выделения ДНК из исследуемого материала представляющий собой метод сорбции ДНК на силикагеле.

Второй – набор для амплификации выделенной ДНК, включающий смеси для амплификации ДНК *stx1* и *stx2*, для идентификации ЭГКП, и смеси для амплификации гена *fliC<sub>H7</sub>* для дифференциации *E. coli* O157:H7.

Третий – набор для электрофоретической детекции ПЦР-продукта.

Четвёртый – набор контрольных образцов, включающий в себя положительный контрольный образец (ПКО) ДНК VT1, VT2, H7 и отрицательный контрольный образец (ОКО).

Состав тест-системы и методика проведения анализа описаны в Наставлении по применению тест-системы «КОЛИ-ДИФ» для идентификации *E. coli* O157:H7 и дифференциации шигаподобных токсинов энтерогеморрагических *E. coli* методом ПЦР.

### 3.9. Определение чувствительности и специфичности разработанной тест-системы

Для оценки специфичности разработанной тест-системы было протестировано 40 штаммов *E. coli* (табл. 1), культуры других патогенных энтеробактерий: *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter faecalis*, *Streptococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni subsp. jejuni*, а так же суспензии

фекалий здоровых животных. В результате штаммы *E. coli*, не продуцирующие веротоксины, серологического варианта отличного от O157:H7, а так же культуры других энтеробактерий, показали отрицательный результат со всеми тремя парами праймеров. Таким образом, аналитическая специфичность тест-системы составила 100%.

Результаты тестирования штаммов *E. coli* серологического варианта O157:H7 и O157:H- из коллекции ATCC (США) приведены в таблице 2.

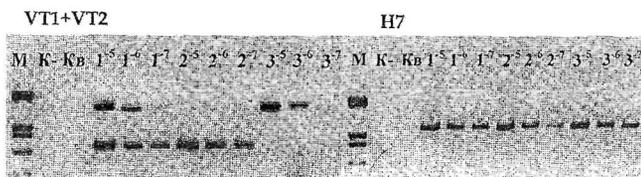
Как видно из таблицы, полученные результаты подтвердили тип продуцируемого веротоксина и наличие гена *fliC<sub>H7</sub>* *E.coli* O157:H7. Однако у штаммов № 43888\* и № 51675\* результат ПЦР показал отсутствие гена, отвечающего за продукцию VT1. Это может быть следствием утраты указанными штаммами данных генов в процессе культивирования.

Таблица 2

**Результаты тестирования штаммов *E. coli* серологического варианта O157:H7 и O157:H**

Штаммы из ATCC (США)				
№ п/п	№ штамма в ATCC	Серовар	Тип продуцируемого токсина	Результат ПЦР
1	43889	O157:H7	VT2	VT2, H7
2	43890	O157:H7	VT1	VT1, H7
3	43888*	O157:H7	VT1, VT2	VT2, H7
4	35150	O157:H7	VT1, VT2	VT1, VT2, H7
5	43894	O157:H7	VT1, VT2	VT1, VT2, H7
6	43895	O157:H7	VT1, VT2	VT1, VT2, H7
7	51675*	O157:H7	VT1, VT2	VT2, H7
8	51658	O157:H7	VT1, VT2	VT1, VT2, H7
9	51659	O157:H7	VT1, VT2	VT1, VT2, H7
10	161	O157:H7	VT2	VT2, H7
11	904	O157:H7	VT1, VT2	VT1, VT2, H7
12	1271	O157:H	VT1, VT2	VT1, VT2

Для определения чувствительности разработанной тест-системы были протестированы 10-кратные разведения культур штаммов № 43894, 43889, 43890 *E. coli* серологического варианта O157:H7 с концентрацией от  $10^4$  мк/мл до  $10^2$  мк/мл в ПЦР-пробе, приготовленных на фосфатном буфере и на пробах фекалий, не содержащих ЭГКП. Каждый образец тестировался в пяти повторах. Результаты тестирования панели образцов в фосфатном буфере представлены на рис. 6. Специфические фрагменты амплификации наблюдались в 100% случаев при тестировании образцов, содержащих от  $10^4$  мк/мл до  $10^2$  мк/мл. Таким образом, аналитическая чувствительность тест-системы на фосфатном буфере составила  $10^2$  мк/мл.



**Рис. 6. Определение чувствительности разработанной тест-системы**

1. – штамм *E. coli* № 43894, 2. – № 43889, 3. – №43890, -5, -6, -7 – разведения культур штаммов, соответствующие 10000, 1000, 100 кл/мл, Кв. – отрицательный контроль, Кв – контроль выделения, М - маркер молекулярных масс ДНК (1419, 517, 396, 214 п.н.)

При тестировании проб фекалий, контаминированных *E. coli* O157:H7, специфический фрагмент амплификации наблюдался в 100% проб с содержанием от  $10^4$  мк/мл до  $10^2$  мк/мл. Таким образом, аналитическая чувствительность тест-системы оставалась той же.

Для сравнения аналитической чувствительности метода ПЦР с микробиологическим методом были протестированы 10-кратные разведения (от -5 до -8) культур штаммов *E. coli* O157:H7 № 43894, 43889, 43890 в пяти повторах. Результаты исследований представлены в табл. 3.

Через сутки учитывали рост на МПА, одновременно разведения культур исследовали с помощью тест-системы «КОЛИ-ДИФ» на наличие генов VT1, VT2, H7. Метод ПЦР давал стабильный положительный результат при в разведениях от -5 до -7, при разведении -8 положительный результат наблюдался в трех повторах из пяти. При исследовании микробиологическим

методом рост бактерий наблюдался только в разведениях -5 и -6. Таким образом, чувствительность метода ПЦР оказалась на порядок выше микробиологического.

Таблица 3

**Результаты сравнения аналитической чувствительности метода ПЦР с микробиологическим методом**

№ /п	№ штамма <i>E. coli</i> O157:H7	Антигенная структура	Концентрация ЭГКП*	Индикация исходных культур в разведении							
				ПЦР (тест-система «КОЛИ-ДИФ»)				Микробиологический метод			
				-5	-6	-7	-8	-5	-6	-7	-8
1	43894	VT1, VT2, H7	1 млрд/см <sup>3</sup>	+	+	+	±	+	+	-	-
				VT1, VT2, H7							
2	43889	VT2, H7	1 млрд/см <sup>3</sup>	+	+	+	±	+	+	-	-
				VT2, H7							
3	43890	VT1, H7	1 млрд/см <sup>3</sup>	+	+	+	±	+	+	-	-
				VT1, H7							

\* по оптическому стандарту мутности

**3.10. Исследование фекалий от животных с помощью тест-системы «КОЛИ-ДИФ»**

Исследование фекалий от животных проводили по следующей схеме:

1. Исследование образцов для выявления ЭГКП, с помощью смеси для амплификации ДНК stx1 и stx2;
2. Тестирование положительных в первой реакции проб для выявления *E. coli* O157:H7, с помощью смеси для амплификации гена *fliC<sub>H7</sub>*.

При исследовании проб фекалий с помощью разработанной тест-системы получены следующие результаты (табл. 4). При исследовании 56 образцов фекалий от крс и мрс, ЭГКП были выявлены в 18 пробах. При исследовании 32 проб фекалий собак, ЭГКП не выявлены, из 28 образцов фекалий от кошек, ЭГКП обнаружены только в одной пробе. Затем положительные пробы были исследованы на наличие H7 антигена *E. coli* O157:H7, и показали отрицательный результат. Для исключения ложноотрицательных реакций использовали ВКО CMV. Специфичность положительных проб подтверждали методом секвенирования.

**Результаты исследования патологического материала от животных с помощью тест-системы «КОЛИ-ДИФ»**

Вид животного	Количество исследованных образцов	Количество положительных проб				
		VT1	VT2	VT1+VT2	H7	Общее количество
крс	42	3 (7,1%)	5 (11,9%)	6 (14,2%)	-	14 (33,2%)
мрс	14	-	3 (21,4%)	1 (7,1%)	-	4 (28,5%)
собаки	32	-	-	-	-	-
кошки	28	1 (12,5%)	-	-	-	1 (12,5%)

### 3.11. Комиссионные испытания ПЦР-тест-системы «КОЛИ-ДИФ»

В период с 2.05.06 г. по 5.05.06 г. в соответствии с приказом Руководителя Россельхознадзора № 53 от 20.03.2006 были проведены комиссионные испытания тест-системы для идентификации *E.coli* O157:H7 и дифференциации шигаподобных токсинов энтерогеморрагических *E.coli* методом ПЦР.

Для комиссионных испытаний была сформирована стандартизованная панель, включающая штаммы *E.coli* O157:H7, штаммы *E.coli* серологического варианта, отличного от O157:H7, и другие патогенные энтеробактерии. Результаты комиссионного испытания обобщены в табл. 5.

Тест-система для идентификации *E.coli* O157:H7 и дифференциации шигаподобных токсинов энтерогеморрагических *E.coli* методом полимеразной цепной реакции обладает высокой чувствительностью ( $10^2$  мк/мл) и 100% специфичностью при испытаниях на стандартизованной панели.

Тест-система «КОЛИ-ДИФ» успешно прошла комиссионные испытания и зарегистрирована в РФ (№ ПВР-1-4.6/01807 от 29.12.06).

### 3.12. Изучение активности и стабильности ПЦР-тест-системы в зависимости от срока хранения

Ежемесячно в течение 15 месяцев тест-систему «КОЛИ-ДИФ» проверяли по параметрам заложенным в ТУ 9388-154-00494189-06.

Все компоненты тест-системы сохраняли высокую активность и стабильность в течение всего срока хранения при температуре (2-8)°С.

Таблица 5

Результаты проведения комиссионных испытаний тест-системы «КОЛИ-ДИФ»

№ п/п	№ шифра	Исследуемый материал	Результат ПЦР					
			ожидаемый			полученный		
			VT1	VT2	H7	VT1	VT2	H7
1	4	<i>E. coli</i> O157:H7 № 43894	+	+	+	+	+	+
2	2	<i>E. coli</i> O157:H7 № 43889	-	+	+	-	+	+
3	8	<i>E. coli</i> O157:H7 № 43890	+	-	+	+	-	+
4	14	Разведение штамма <i>E. coli</i> O157:H7 № 43894, соответствующее 10 <sup>4</sup> мк./мл	+	+	+	+	+	+
5	9	Разведение штамма <i>E. coli</i> O157:H7 № 43894, соответствующее 10 <sup>3</sup> мк/мл	+	+	+	+	+	+
6	12	Разведение штамма <i>E. coli</i> O157:H7 № 43894, соответствующее 10 <sup>2</sup> мк/мл	+	+	+	+	+	+
7	1	<i>E. coli</i> O101:F41 № F41, производственный штамм ВГНКИ	-	-	-	-	-	-
8	6	<i>E. coli</i> O119:K69:H4 № 733 производственный штамм ВГНКИ	-	-	-	-	-	-
9	3	<i>E. coli</i> O147:K89:K88 № 1092 производственный штамм ВГНКИ	-	-	-	-	-	-
10	10	<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-	-	-
11	15	<i>Enterobacter faecalis</i>	-	-	-	-	-	-
12	5	<i>Streptococcus faecalis</i>	-	-	-	-	-	-
13	16	<i>Citrobacter freundidi</i>	-	-	-	-	-	-
14	13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
15	7	<i>Morganella morganii</i>	-	-	-	-	-	-
16	17	<i>Yersinya enterocolitica</i>	-	-	-	-	-	-
17	11	<i>Camp. jejuni subsp. jejuni</i>	-	-	-	-	-	-

3.14. Использование тест-системы «КОЛИ-ДИФ» для государственного контроля пищевой продукции и кормов

С 2007 г. в лаборатории пищевых инфекций отдела Биотехнологии проводится государственный контроль пищевой продукции и кормов на

показатели качества и безопасности бактериологическими методами. Контроль пищевой продукции проводится согласно требованиям СанПин 2.3.2 1078, утвержденных Главным государственным санитарным врачом РФ 06.11.2001 и введенных в действие 1.09.2002 г. Все образцы мяса, молока, сыра, яиц и рыбопродуктов, поступающие для госконтроля дополнительно исследовались на обсемененность энтерогеморагическими эшерихиями с помощью тест-системы «КОЛИ-ДИФ».

За 2007 г. протестировано 1268 проб мяса, 1120 проб молока, 1600 проб сыра, 1310 проб яйца столового, 1078 проб рыбопродуктов (рыба замороженная, икра солено-мороженная). При бактериологическом исследовании бактерии группы кишечной палочки (БГКП) были обнаружены в 60 (29,44 %) пробах мяса, 36 (30%) пробах молока, в 7 (11,67 %) пробах яйца столового.

Таблица 6

**Результаты исследования пищевой продукции с помощью тест-системы «КОЛИ-ДИФ»**

Вид продукции	Количество исследованных образцов 2007 г	Количество исследованных образцов 2008 г	Результат ПЦР		
			Наличие ЭГКП		Наличие E.coli O157:H7
			VT1	VT2	H7
Мясо	1268	1648	-	-	-
Молоко	1120	1185	-	-	-
Сыр	1600	1600	-	-	-
Яйцо столовое	1310	1365	-	-	-
Рыбопродукты	1078	1125	-	-	-
Итого:	6376	6923	-	-	-

В 2008 году протестировано 1648 проб мяса, 1185 проб молока, 1600 проб сыра, 1365 проб яйца столового, 1125 проб рыбопродуктов. При бактериологическом исследовании БГКП были обнаружены в 53 (29%) пробах мяса, 39 (30%) пробах молока, в 9 (10 %) пробах яйца столового.

Пробы пищевой продукции, в количестве 13 299, в течение двух лет исследовались с помощью тест-системы «КОЛИ-ДИФ» на наличие ЭГКП. Результаты исследований представлены в табл. 6.

#### 4. ВЫВОДЫ

1. На основании компьютерного анализа нуклеотидных последовательностей генов кодирующих шигаподобные токсины энтерогеморрагических *E.coli* (stx1 и stx2) сконструированы оригинальные праймеры и оптимизированы параметры ПЦР для идентификации энтерогеморрагических *E. coli*.
2. Разработан способ дифференциации *E. coli* серологического варианта O157:H7 и положительный контрольный образец ДНК VT1, VT2, H7, являющийся индикатором работы амплификационной смеси и маркером длины ПЦР-продуктов.
3. При сравнении аналитических характеристик разработанной тест-системы с микробиологическим методом, установлено, что тест-система «КОЛИ-ДИФ» обладает 100% специфичностью и имеет предел аналитической чувствительности  $10^2$  мк/мл.
4. Тест-система «КОЛИ-ДИФ» для идентификации *E. coli* O157:H7 и дифференциации энтерогеморрагических *E. coli* методом ПЦР позволяет в течение 4 часов выявлять ЭГКП и дифференцировать серовар O157:H7.

#### 5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для практического использования предлагаются следующие нормативные документы, разработанные в ходе выполнения научных исследований по теме диссертации:

1. Инструкция по применению тест-системы «КОЛИ-ДИФ» для идентификации *E. coli* O157:H7 и дифференциации энтерогеморрагических *E. coli* методом ПЦР (РУ № P077-1-4.6-1332, утв. Россельхознадзором 29.12.2006);
2. Технические условия на тест-систему «КОЛИ-ДИФ» для идентификации *E. coli* O157:H7 и дифференциации энтерогеморрагических *E. coli*

методом ПЦР (ТУ № 9388-154-00494189-06, согл. Россельхознадзором 29.12.2006);

3. Регистрационное удостоверение на тест-систему «КОЛИ-ДИФ» для идентификации *E. coli* O157:H7 и дифференциации энтерогеморрагических *E. coli* методом ПЦР (№ ПВР-1-4.6/01807 от 29.12.06);
4. Сертификат соответствия требованиям нормативных документов тест-системы «КОЛИ-ДИФ» для идентификации *E. coli* O157:H7 и дифференциации энтерогеморрагических *E. coli* методом ПЦР (№ РОСС RU.ФВ01.В16591).

## 6. СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Брюсова М.Б., Обухов И.Л., Тугаринов О.А., Пирожков М.К., Стрельченко С.А. Идентификация и дифференциация энтерогеморрагических *E. coli* и *E. coli* O157:H7 методом полимеразной цепной реакции./ Сборник научных трудов ВГНКИ, 2005.- Т.66. с.161-166.
2. Брюсова М.Б., Обухов И.Л. Разработка ПЦР тест-системы для выявления и дифференциации энтерогеморрагических *E. coli* и *E. coli* O157:H7./ Сборник научных трудов ВГНКИ, 2007.-Т.68.-с.162-168.
3. Брюсова М.Б., Обухов И.Л., Тугаринов О.А., Пирожков М.К. Идентификация и дифференциация энтерогеморрагических *E. coli* и *E. coli* O157:H7 методом полимеразной цепной реакции./ Сборник трудов 6-ой всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика», 2007.- т. 1. – с. 224-226.
4. Брюсова М.Б., Обухов И.Л., Тугаринов О.А., Пирожков М.К., Панин А.Н. Идентификация энтерогеморрагических *E. coli* и дифференциация *E. coli* O157:H7 методом полимеразной цепной реакции./ Ветеринария, 2008.- № 12. - с.42-49.



---

ГНУ ВНИИВСГЭ, 2008 г.  
123022, Москва,  
Звенигородское ш., 5  
Заказ № 302/1, тираж 100 экз.

---