

На правах рукописи

СВЕТЛИЧКИН ОЛЕГ ВЯЧЕСЛАВОВИЧ

**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ И ТЕСТ-СИСТЕМ УСКОРЕННОЙ
ИНДИКАЦИИ YERSINIA ENTEROCOLITICA В КОРМАХ И
МЯСНЫХ ПРОДУКТАХ НА ОСНОВЕ ДНК-ДИАГНОСТИКИ**

16.00.06 - ветеринарная санитария, экология, зоогигиена
и ветеринарно-санитарная экспертиза

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2004

Работа выполнена в Государственном научном учреждении
Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной
санитарии, гигиены и экологии Россельхозакадемии
(ГНУ ВНИИИЗСГЭ РАСХН)

Научный руководитель:

-кандидат биологический наук

А.Б. Кононенко (ГНУ ВНИИВСГЭ)

Официальные оппоненты:

-заслуженный деятель науки РФ
доктор ветеринарных наук, профессор

М.П. Бутко (ГНУ ВНИИВСГЭ)

-кандидат биологических наук

А.М. Лысенко

(Институт микробиологии РАМ)

Ведущая организации: Московский государственный университет
прикладной биотехнологии (МГУПБ)

Защита состоится «_____» _____ 2004 г. в «_____» часов на
заседании диссертационного совета Д 006.008.01 при ГНУ Всероссийском
научно-исследовательском институте ветеринарной санитарии, гигиены и
экологии (123022, г. Москва, Звенигородское ш., д.5).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ Всероссийского
научно-исследовательского института ветеринарной санитарии, гигиены и
экологии.

Автореферат разослан «_____» _____ 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Е.С. Майстренко

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Обеспечение населения высококачественной и безопасной продукцией животноводства является актуальной задачей современности. Эта актуальность обусловлена возрастанием экологического неблагополучия под действием различных факторов, приводящих к контаминации производств и продукции опасными для здоровья человека и животных возбудителями заболеваний.

Получение высококачественной животноводческой продукции тесно связано с созданием эффективной системы ветеринарно-санитарного контроля всей «пищевой цепи» - от кормов до готовой продукции.

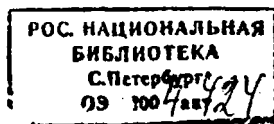
Микробиологические критерии традиционно являются одним из
• главных показателей безопасности животноводческой продукции.

В последнее время все более актуальной проблемой становится индикация возбудителей кишечного иерсиниоза. Это заболевание регистрируется по всей территории Российской Федерации и в других странах. По данным ряда исследователей, кишечный нерсиниш по значимости среди пищевых зоонозов занимает второе место после сальмопеллеза (Ющенко Г.В. и др., 1993; Кононенко А.Б. и др., 2003; Basselt M. L. et al., 1990).

Возбудителем кишечного иерспниоза является *Y. enterocolitica*. Иерсинии выделяют от грызунов, свиней, коров, диких животных и птицы, значительно реже от рыб, моллюсков.

Бактерии *Y. enterocolitica* встречаются в овощах, корнеплодах, зеленых кормах, в молоке.

Мясо может быть контаминировано в процессе убоя и разделки животных-бактерионосителей. В последнее время серьезное значение в инфицировании иерсиниямп приобретает водный фактор. *Y. enterocolitica* часто *выделяют* из открытых и закрытых водоемов, подземных вод, колодцев, питьевой воды, сточных вод.



Прямым следствием распространения перспнии в животноводческих хозяйствах является обсемененность продуктов животноводства: молока (1,0-6,0%), мяса (1,0-6,0%), тушек цыплят (2,0-12,0%), поверхности яиц (0,5-8,0%) (Ющенко Г. 13., Дунаев В. И., 1987).

Существующие методы классического бактериологического анализа предусматривают выделение чистых культур на селективных питательных средах, с последующей их видовой идентификацией, что делает эти анализы длительными и трудоемкими (Скурихип И.М., Тутельян 13А, 1981; Сеитханова Б.Т., 2000; Miller et. al., 1991).

Кроме того, влияние различных факторов может, приводить к L- трансформации в популяции микроорганизмов и появлению L-форм, которые трудно быстро выявить с помощью классических бактериологических методов (Прозоровский С.В. и др. 1981; Павлова И.Б. 2001).

Наиболее перспективными- в плане чувствительности и специфичности индикации и идентификации микроорганизмов показали себя методы генной диагностики (ДНК-гибридизация, амплификация генов) (Блохина И.Н., Леванова Г.Ф., 1976; Антонов А. С. и др., 1980; Дрыгин Ю.Ф. и др., 1992; Долгов В.А. и др., 1997; Панин А.Н. и др., 1997; Лысенко А.М.Суходолец В.В., 1999; Обухов И.Л., Яковенко М.В., 2000; Шаров А.Н. и др., 2000; Смирнов А.М. и др., 2001; Palva A.A., 1983; Erlich H.A., 1989; Haschimolo J. et. al.,1995; Loprestia D. et. al., 1997). Они позволяют выявлять микроорганизмы в смешанных культурах, обнаруживать L-формы бактерий и дифференцировать патогенные культуры от непатогенных (Гинцбург А.А., 1998; Воробьев А.А. и др., 2000; Falkow S., Moseley S., 1982; Hill W., Modclen J., 1983; Moseleu S.A., Нуг J., 1989; Rifai S. et. al., 1989; Juk J.M. et. al;1993; Jouie M. et. al., 1994; Chen Shy et. al., 1998).

В настоящее время, несмотря на определенные достижения в этой области., разработка методов и тест-систем ускоренной индикации *Y. enterocolitica*.в продуктах и кормах на основе ДНК-диагностики остается

одной из важных задач ветеринарно-санитарного контроля. Актуальным является адаптация методов к конкретным объектам и дифференциация патогенных форм бактерий.

Цель и задачи исследования. Целью исследований являлась разработки методов и тест-систем ускоренной индикации *Y. enterocolitica* в кормах и мясных продуктах на основе ДНК-диагностики.

В задачи исследований входило:

- разработать тест-систему индикации *Y. enterocolitica* на основе ПЦР; разработать методы и тест-системы индикации *Y. enterocolitica* с использованием ДНК-зондов, меченных биотипом и тритием;
- разработать метод индикации патогенных штаммов *Y. enterocolitica* с использованием плазмидной ДНК;
- провести оценку методов и тест-систем ДНК-диагностики для выявления *Y. enterocolitica* при мониторинге кормов и мясных продуктов.

Научная новизна. Разработаны тест-системы, индикации *Y. enterocolitica* в кормах и мясных продуктах: с использованием ДНК-зондов, меченных биотипом, и ПЦР; разработана методика индикации вирулентных штаммов *Y. enterocolitica* с использованием плазмидной ДНК; разработана методика индикации патогенных и непатогенных штаммов *Y. enterocolitica* на основе амплификации и ДНК-гибридизации.

Практическая ценность. На основании результатов исследований разработаны:

- Методические указания по индикации *Y. enterocolitica* методом полимеразной цепной реакции (утверждены-Департаментом ветеринарии МСХ РФ, 14.09.2000 г. № 13-5-2/196).
- Методические рекомендации по индикации *Y. enterocolitica* в продуктах и кормах на основе ДНК-диагностики (утверждены Отделением ветеринарной медицины РЛСХН 18. 03. 2004 г).

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

- Всероссийской научно-производственной конференции «Разработка и освоение производства нового поколения лекарственных средств для животных и их применение в ветеринарии» (Ставрополь, 2000);
- Международной конференции молодых ученых «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» ВНИИТиБП РЛСХН (Щелково, 2000 г.);
- Международной конференции молодых ученых «Научные основы технологии производства ветеринарных биопрепаратов» ВНИИТиБП. РЛСХН (Щелково, 2001 г.);
- Международной научной конференции «Биотехнология на рубеже двух тысячелетий» (Саранск, 2001 г.);
- заседаниях Ученого совета ВПНВСГЭ (2000-2004 г.);
- межлабораторном совещании ВНИИВСГЭ (2004 г.).

Публикации. Результаты исследований отражены в 7 научных статьях.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, предложений для практики, списка использованной литературы и приложения.

Диссертация изложена на 111 страницах машинописного текста, содержит II таблиц и 7 рисунков. Список литературы включает 142 источников отечественных и зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований. Работа проводилась в период с 1999 по 2004 гг. на основании плана научно-исследовательских работ ВНИИВСГЭ и является частью разделов 05.02.12.1, 05.02.8.2, 05.02.8.12. Экспериментальная часть выполнена в лаборатории санитарной микробиологии и в отделе сертификации ВНИИВСГЭ.

Праймеры получали на базе Центра пренатологии, акушерства и гинекологии РАМН.

Объектами исследования служили образцы кормов и мясной продукции, отобранные для мониторинговых и сертификационных испытаний, а также экспериментальные образцы, искусственно контаминированные микроорганизмами.

В работе использовались непатогенные и патогенные штаммы *Yersinia enterocolitica*, содержащие плазмиду вирулентности, а также культуры *Yersinia pseudotuberculosis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella dublin*, *Salmonella enteritidis*.

Выделение и очистку ДНК, постановку реакции гибридизации проводили по Маниатису Т. (1984). Получение ДНК-зондов и их мечение биотипом или тритием осуществляли в полимеразной цепной реакции, а также в реакции ник-трансляции.

Радиоактивность фильтров с гибридными молекулами определяли в жидкостном сцинтилляционном счетчике «ЛКВ» (Швеция) в НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова.

- Интенсивность окрашивания фильтров с гибридными молекулами определяли визуально.

Выделение иерсиний бактериологическим методом осуществляли согласно руководства «Лабораторная диагностика псевдотуберкулеза и иерсипиоза» (Ценева Г.П., 1997).

Экспериментальные данные подвергали статистической обработке по Стюденту.

2.2 Результаты исследования

2.2.1 Разработка тест-системы индикации *Y. enterocolitica* на основе

ПЦР

На первом этапе исследования была разработана тест-система для индикации перспнп в кормах и мясных продуктах, которая включает этапы элюирования и концентрирования бактерии с помощью дифференциального центрифугирования и этапы индикации на основе реакции амплификации с применением набора для выделения ДНК с лизующим реагентом - гуанидинтиоизоционатом и сорбентом NucleoSTM, набора для постановки ПЦР и реагентов для детектирования амплифицированной ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле. Для индикации искомым микроорганизмов коитампированные иерснниямп образцы кормов и мясopодуктов измельчали, гомогенизировали и бактерии элюировали физиологическим раствором. Очистку от клеточного дебриса и концентрирование бактерий осуществляли дифференциальным центрифугированием.

Гуанидинтиоизоционат способствовал лизису клеток, солюбилизации клеточного дебриса, а также денатурации клеточных нуклеаз. В присутствии гуанидинтиоизоционата ДНК активно связывается с сорбентом NucleoSTM, входящим в состав набора, затем легко отмывается от белков и солен спиртовым раствором. Элюированная из сорбента ЭкстраГеномTM ДНК в дальнейшем была использована пмп в ПЦР.

При разработке тест-системы в качестве праимеров использовали нуклеотидные последовательности ДНК *Y. enterocolitica*:

Kwaga 38 (5'-GAACTCGATGATAACTGGG-3') и

Feng 19 (5'-GGAGTATTCATATGAAGCGTC-3[‰]).

В результате исследований были отработаны параметры полимеразной цепной реакции с использованием данных праимеров. Оптимальные режимы проведения амплификации для соответствующих этапов были следующими:

1) денатурация - 95⁰С; 2) отжиг - 55⁰С; 3) элонгация - 72⁰С. Время проведения каждого этапа равнялось 30 секундам. Число циклов -35.

После проведения ПЦР с выделенными матричными ДНК и указанными праймерами полоса амплификата наблюдалась только в реакционной смеси, содержащей ДНК *Y.enterocolitica*. В системах с ДНК других бактерий амплификация не проходила. Полученные данные свидетельствовали о специфичности выбранных праймеров для индикации *Y.enterocolitica*.

Подобранные праймеры использовали для индикации *Y.enterocolitica* в искусственно контаминированных образцах кормов, мяса и мясных продуктов. Чувствительность индикации *Y.enterocolitica* с помощью разработанной тест-системы составляла 10-100 клеток в пробе без предварительного обогащения (табл.1.)

Таблица 1

Чувствительность индикации *Y.enterocolitica* методом ПЦР

Разведение культуры <i>Y.enterocolitica</i> в физрастворе	Концентрация <i>Y. enterocolitica</i> КОЕ/мл	Результаты ПЦР
Исходное	$1,2 \times 10^8$	+
10^{-1}	$1,0 \times 10^7$	+
10^{-2}	$1,3 \times 10^6$	+
10^{-3}	$1,2 \times 10^5$	+
10^{-4}	$1,1 \times 10^4$	+
10^{-5}	$1,4 \times 10^3$	+
10^{-6}	$1,1 \times 10^2$	+
10^{-7}	10	+
10^{-8}	-	-

(+) - наличие полосы амплификации

(-) - отсутствие полосы амплификации

2.2.2 Разработка методов и тест-систем индикации *Y.enterocolitica* с использованием генных зондов

При разработке методов и тест-систем индикации *Y.enterocolitica* генные зонды получали и метили тритием или биотипом в полимеразной цепной реакции с использованием выбранных праймеров и меченых дезоксипуклосзпдтрифосфатов.

В случае тритиевой метки из проб, искусственно контаминированных *Y.enterocolitica*, выделяли бактериальные клетки, которые обрабатывали лизоцимом и протееиназой. Затем проводили термическую денатурацию ДНК и иммобилизовали на мембранные фильтры с диаметром пор 0,45мкм. После проведения гибридизации с I^3 ДНК - зондом, фильтры отмывали от неспецифической сорбции стандартно-солевым раствором и радиоактивность фильтров определяли на жидкостном сцинтилляционном счетчике. В качестве отрицательных контролен использовали аналогичные образцы продукции, коштаминированные близкородственными микроорганизмами, а также пустые фильтры.

При использовании ДНК-зондов, меченных биотипом, после лизиса клеток проводили депротенинизацию додецилсульфатом натрия и хлороформом. ДНК осаждали этанолом и денатурировали тепловой обработкой. Затем ДНК иммобилизовали в виде точек на мембранные фильтры, проводили гибридизацию и реакции с конъюгатом, субстратом и красителем. Результаты оценивали по интенсивности окрашивания точек с гибридными молекулами ДНК.

Как показали исследования, с помощью ДНК-зондов удается определять *Y. enterocolitica* в исследуемых образцах. При этом специфичность анализа позволяет проводить индикацию *Y.enterocolitica* в бактериальных смесях (табл. 2).

Таблица 2

Результаты определения специфичности индикации *Y. enterocolitica* методом гибридизации с ДНК-зондами, меченными тритием и биотипом

Бактерия – контаминант	Результаты гибридизации	
	С тритиевой меткой	С биотиновой меткой
	Имп/мин контроль сорбции	Интенсивность окрашивания
<i>Y. enterocolitica</i>	253±11	+++
Смесь <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>S.</i> <i>enteritidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> <i>vulgaris</i> (1:1:1:1:1)	262±14	+++
Смесь <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> <i>vulgaris</i> (1:1:1:1)	0	-
<i>S. enteritidis</i>	0	-
<i>Proteus vulgaris</i>	0	-
<i>E. coli</i>	0	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	0	-

В таблице 3 представлены данные о чувствительности ДНК - гибридизации с использованием зондов, меченных биотипом и тритием.

Таблица 3

Результаты определения чувствительности индикации *Y. enterocolitica* методом ДНК - гибридизации

Разведение культуры <i>Y. enterocolitica</i> в физрастворе	Контаминация <i>Y. enterocolitica</i> КОЕ/мл	Результаты гибридизации	
		Зонд с тритиевой меткой	Зонд с биотиновой меткой
		Имп/мин – контроль сорбции	Интенсивность окрашивания
Исходное	$1,3 \times 10^8$	1572±43	++++
10^{-1}	$1,1 \times 10^7$	768±28	++++
10^{-2}	$1,2 \times 10^6$	354±11	+++
10^{-3}	$1,3 \times 10^5$	193±7	++
10^{-4}	$1,2 \times 10^4$	67±3	+
10^{-5}	$1,1 \times 10^3$	62±4	-
10^{-6}	$1,2 \times 10^2$	64±2	-
10^{-7}	10	58±4	-
Контроль		55±3	-

Контроль - культура *E.coli* 10 КОЕ/мл

Чувствительность методики с трпгиевыми ДНК-зондами составляла 10^5 клеток в пробе. Время анализа - 6-8 часов.

Чувствительность методики с биотинилированными ДНК-зондами равнялась 10^4 клеток в пробе. Время анализа - 8-12 часов.

Чувствительность индикации была на два - три порядка ниже, чем при использовании методики ПЦР.

Предварительное обогащение *Y. enterocolitica* при 4° С в течение 24 часов позволяло повысить чувствительность индикации ДНК- зондами до 10^2 - 10^3 клеток в пробе.

На следующем этапе была разработана тест-система индикации *Y. enterocolitica* с использованием ДНК-зондов, меченных биотипом.

В комплект входят реагенты для выделения, денатурации и иммобилизации ДНК, постановки реакции гибридизации, отмывки от неспецифической сорбции, проведения реакций с конъюгатом, субстратом и красителем, а также положительный и отрицательный контроли, мембранные нитроцеллюлозные фильтры. Набор рассчитан на проведение 80 анализов и имеет срок хранения один год.

Для определения ДНК применяли способ точечной гибридизации (дог-гибридизации) нуклеиновых кислот на твердой фазе с использованием ДНК-зонда, меченного биотипом.

Из исследуемых образцов выделяли суммарную ДНК. Суммарную ДНК, находящуюся в растворе, ДНК контрольного положительного и ДНК контрольного отрицательного образцов денатурировали кипячением и фиксировали на нитроцеллюлозном фильтре. Иммобилизованные ДНК гибридизовали с предварительно денатурированными биотинилированными ДНК-зондами. Не связавшиеся зонды удаляли путем отмывок фильтра. На следующем этапе фильтр обрабатывали конъюгатом стрептавидин-фосфатазой. На заключительном этапе вносили растворы субстрата и красителя. Окрашивание соответствующих точек свидетельствовало о наличии искомой ДНК в исследуемом материале.

2.3.1. Разработка методик индикации патогенных штаммов *Y. enterocolitica* с использованием плазмидной ДНК

Значительная биохимическая, антигенная и экологическая неоднородность этой группы микроорганизмов, их антигенные связи с другими энтеробактериями и различия в патогенности существенно осложняют оценку этиологического и эпидемиологического значения выделяемых штаммов иерсинии.

Известно, что патогенные свойства иерсинии частично контролируются генами плазмиды pY V (Grant T. et al., 1998; Koornhof H.J., 1999).

У большинства патогенных штаммов содержится плаزمида вирулентности pYV (ГШ). Создана отечественная коллекция ПВ+ и ПЗ-штаммов возбудителя, перспиноза основных сероваров (03,09 и др.). Разработан диагностический препарат-агглютинирующие, сыворотки СВИ для серологической идентификации патогенных иерсинии (Смирнов И.В., 1992).

При разработке метода дифференциации патогенных и непатогенных штаммов *Y. enterocolitica* плазмидную ДНК выделяли щелочным методом, после подращивания культуры. Плазмидную ДНК метили биотипом или тритием в реакции ник-трансляции.

При использовании тритиевой метки дифференциацию штаммов проводили на основе методики гибридизации колоний. Исследуемые пробы переносили на нитроцеллюлозные фильтры, которые помещали на питательную среду и инкубировали до образования отдельных колоний, как предусмотрено методикой бактериологического анализа. Далее фильтры помещали на стопку фильтровальной бумаги, смоченной растворами для лизиса клеток, депротенинизации, щелочной денатурации и иммобилизации ДНК. Гибридизацию проводили с меченой плазмидной ДНК в присутствии декстрансульфата в течение 8-12 часов.

После гибридизации осуществляли отмывку от неспецифической сорбции. Радиоактивность гибридных молекул ДНК на фильтрах определяли в жидкостном сцинтилляционном счетчике.

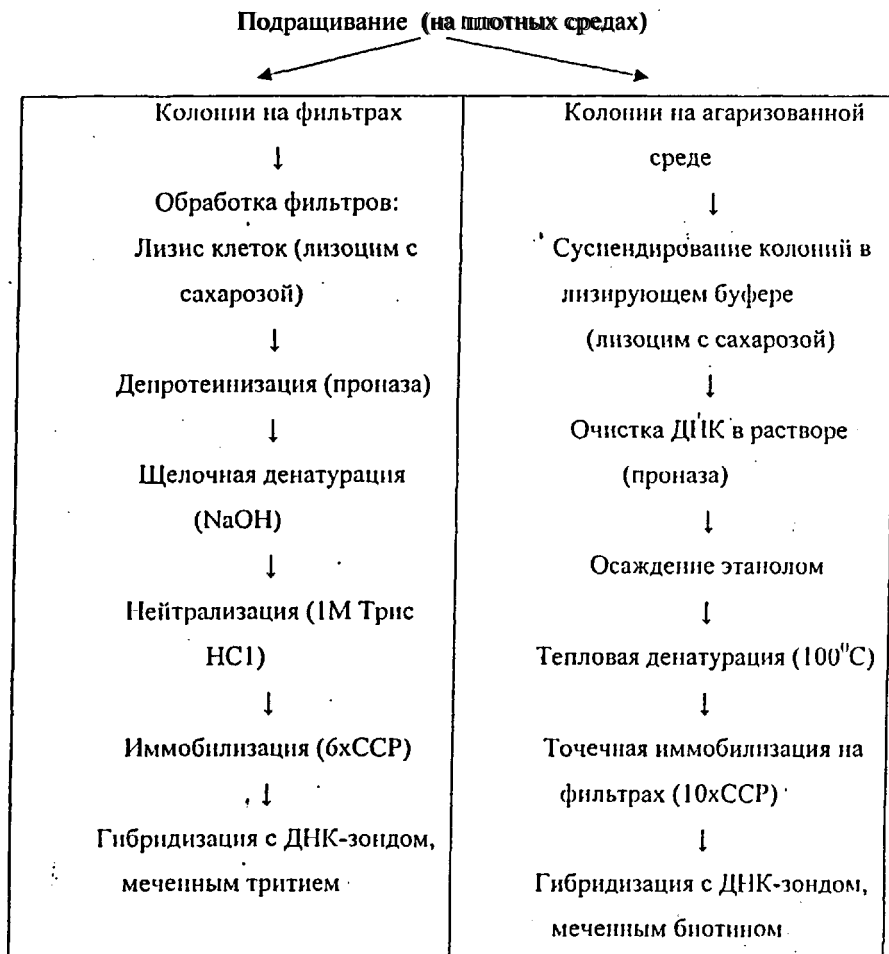


Рис. 1 Схема индикации патогенных штаммов методом гибридизации с плазмидными ДНК- зондами

В случае использования биоингибированных зондов колонии суспендировали в лизнрующем буфере, ДНК очищали с помощью пролазы, проводили тепловую денатурацию и иммобилизовали на мембранные нитроцеллюлозные фильтры в виде точек. Гибридизацию с биотинилированным ДНК-зондом и регистрацию конечного результата проводили, как описано выше.

Результаты гибридизации показали возможность индикации патогенных штаммов *Y.enterocolitica*.

Методика индикации патогенных штаммов *Y.enterocolitica* с использованием в качестве зондов плазмидной ДНК обладает высокой специфичностью и чувствительностью, не требует сложного оборудования, однако несколько длительна во времени. Это связано с необходимостью подращивания культуры бактерий и увеличением времени гибридизации до 12 часов из-за малых концентраций плазмидной ДНК. В целях усовершенствования была разработана методика ускоренной дифференциации патогенных и непатогенных штаммов *Y.enterocolitica* на основе амплификации и ДНК-гибридизации.

Бактерии элюировали из искусственно контаминированных образцов, концентрировали с помощью дифференциального центрифугирования, клетки лизировали и выделяли суммарную ДНК с помощью гуанидинизотионата. Далее проводили амплификацию ДНК методом рассеянной затравки в присутствии меченных тритием или биотипом дезоксипуридинрибозидтрифосфатов. Меченную амплифицированную ДНК гибридизовали с предварительно иммобилизованными на фильтрах ДНК специфичных *Y.enterocolitica* ампликонов или плазмидной ДНК *Y.enterocolitica*, а также с хромосомными ДНК других бактерий. Гибридизация проходила только в гомологичных системах, содержащих аналогичные ДНК в исследуемых бактериях и иммобилизованные на фильтрах ДНК-зонды.

Таким образом, разработанная методика на основе амплификации методом рассеянной затравки с последующей гибридизацией со специфичными ДНК-зондами позволяет проводить индикацию *Y. enterocolitica* и дифференцировать патогенные и непатогенные штаммы. Чувствительность анализа детерминируется амплификацией и составляет 10-100 клеток в пробе. Время анализа 8 часов.

2.3.3 Оценка методов и тест-систем ДНК-диагностики для выявления *Y. enterocolitica* при мониторинге кормов и мясной продукции

Как было отмечено, иерсинии относятся к'группе патогенных для человека и животных микроорганизмов, которые могут длительное время существовать и развиваться в окружающей среде: в воде, почве, растениях (Емельяненко Е.Н., 1997). Показано, что в ряде случаев термически необработанные зеленые овощи явились причиной вспышек заболеваний, вызываемых иерсиниями (Шубин Ф.Н., 1993).

Установлено, что иерсинии могут колонизироваться на растениях, прикрепляясь к ним или проникая внутрь (Венедиктов В.С., и др., 1989). Иерсинии не только сохраняются, но и успешно размножаются как на поверхности, так и внутри растений (Марков И.С., 1989). Бактериологический анализ суспендированных в физиологическом растворе мокрицы и пастушьей сумки позволил выделить культуры *Y. enterocolitica* в концентрации 1000 КОЕ/г зеленой массы, при отрицательных результатах посевов поверхностных смывов с растений.

Наличие психрофильных свойств позволяет иерсиниям накапливаться при хранении кормов при низких или постоянно меняющихся температурах и определяет возможность заражения через них животных и человека.

В качестве зеленых кормов мы использовали пророщенную смесь семян травы, предназначенную для кошек и котят. Как следовало из

инструкции к корму, в емкость с семенами и субстратом для роста травы вносили дистиллированную воду до полного смачивания. Затем субстрат с семенами переносили в пластмассовые емкости. В одну из них вносили суспензию суточной культуры *Y. enterocolitica* в концентрации 10^6 КОЕ/мл. Для контаминации использовали штамм *Y. enterocolitica* 09, содержащий специфическую плазмиду вирулентности. Проба без контаминантов служила контролем. После достижения величины травяного покрова 4-6 см корни и побеги отдельно гомогенизировали в ступках с буферным раствором и определяли наличие иеренин методами ДНК-диагностики и микробиологическим методом. Анализ контаминации частей растений проводили как непосредственно после взятия образца, так и после обогащения материала путем выдерживания суспензий отдельных частей растений в течение пяти дней при 4°C. В качестве методов ДНК-диагностики применяли полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и ДНК-гибридизацию.

Полоса амплификации и гибридные молекулы обнаруживались только в объектах, содержащих ДНК *Y. enterocolitica*, что указывает на специфичность выбранных праймеров и ДНК-зондов для индикации.

При этом ПЦР - анализ позволял выявлять искомую ДНК в нативном материале, а методы ДНК-гибридизации только после обогащения материала в течение 24 часов при 4°C.

Незначительные различия в результатах индикации *Y. enterocolitica* в корнях и побегах можно объяснить тем, что в корнях содержится суммарная фракция бактерий, включающая помимо эндогенных бактерий, экзогенную контаминацию за счет остатков среды для роста растений.

Результаты ДНК-диагностики коррелировали с данными микробиологического анализа.

Анализ результатов свидетельствовал о том, что трудность в обнаружении *Y. enterocolitica* в кормах может быть объяснена незначительными концентрациями бактерий. Однако, при благоприятных условиях, например, при длительном хранении кормов при низких

температурах, происходит значительное накопление бактерий и вследствие этого можно проводить индикацию *Y. enterocolitica* методами ДНК-гибридизации.

Полученные нами данные свидетельствуют о корреляции «результат» исследования при использовании тест-систем на основе ДНК-диагностики и микробиологического метода обнаружения *Y. enterocolitica* в кормах, мясе и мясных продуктах. При этом время индикации *Y. enterocolitica* с использованием разработанных тест-систем составляло 6-12 часов, что на порядок меньше бактериологического метода индикации данных бактерий.

Таким образом, тест-системы на основе ДНК-диагностики позволяют проводить индикацию и идентификацию *Y. enterocolitica* с высокой чувствительностью и специфичностью и не требуют предварительного выделения чистых культур. При этом время исследования значительно сокращается по сравнению с существующим бактериологическим методом, что дает основание рекомендовать методы ДНК-диагностики для практического использования при ветеринарно-санитарной экспертизе и сертификационных испытаниях мяса, мясопродуктов и кормов.

ВЫВОДЫ

1. Разработанная тест-система индикации *Y. enterocolitica* в кормах и мясных продуктах, включающая набор для выделения ДНК с лизирующим реагентом гуанидинтиоизоционатом и сорбентом NucleoSTM, набор для постановки ПЦР и реагенты для детектирования амплифицированной ДНК с помощью электрофореза в агарозном геле, позволяют выявлять искомые бактерии в присутствии близкородственных видов бактерий с чувствительностью $10 \cdot 10^2$ клеток в пробе в течение 6-8 часов без предварительного обогащения.

2. Разработанная методика индикации *Y. enterocolitica* в кормах и мясных продуктах с использованием ДНК-зондов, меченных тритием, включающая этапы дифференциального центрифугирования для концентрирования бактерий, лизиса клеток с использованием лизоцима,

лепротспнмзацмп додсцилсульфатом натрия и протеиназой, гибридизации на фильтрах и детектирования гибридных молекул жидкостной сцинтилляцией, позволяет проводить индикацию 10^5 микробных клеток в пробе за 6-8 часов.

3. Разработанные методика и тест-система индикации *Y. enterocolitica* в кормах и мясных продуктах с использованием ДНК-зондов, меченных биотипом, включающая реагенты для лизиса клеток, депротеинизации ДНК додсцилсульфатом натрия и хлороформом, постановки реакции точечной гибридизации, реакции с конъюгатом, субстратом и красителем на фильтрах и детектирования гибридных молекул по интенсивности окрашивания позволяет проводить индикацию с чувствительностью 10^4 клеток в пробе за 8-12 часов.

4. Предварительное обогащение культуры *Y. enterocolitica* при 4°C в течение 24 часов позволяет повысить чувствительность индикации ДНК-зондами до 10 - 100 клеток в пробе.

5. Разработана методика на основе гибридизации колоний иерсиний с плазмидой pYV, позволяющая выявлять патогенные штаммы *Y. enterocolitica* в течение 48 часов.

6. Разработана методика на основе амплификации с помощью рассеянной затравки с мечеными дезоксинуклеозидтрифосфатами и последующей гибридизацией с иммобилизованными ДНК-зондами плазмидных и хромосомных ДНК. Методика позволяет одновременно устанавливать наличие *Y. enterocolitica* и дифференцировать патогенные и непатогенные штаммы в течение 8 часов без предварительного обогащения материала. Чувствительность анализа составляет 10-100 клеток в пробе.

7. Высокая чувствительность и специфичность, корреляция с результатами бактериологического метода обнаружения иерсиний, значительное сокращение продолжительности анализа позволяют рекомендовать разработанные методы и тест-системы ДНК-диагностики для проведения мониторинговых исследований кормов и мясной продукции.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИКИ

Для использования в научно-исследовательских учреждениях и диагностических ветеринарных лабораториях могут быть рекомендованы разработанные :

- Методические указания по индикации *Y. enterocolitica* методом полимеразной цепной реакции (утверждены Департаментом ветеринарии МСХ РФ, 14.09.2000 г., № 13-5-2/196);
- Методические рекомендации по индикации *Y. enterocolitica* в продуктах и кормах на основе ДНК-диагностики (утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН, 18.03.2004 г.).

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Светличкин О.В. Разработка тест-систем обнаружения *Y. enterocolitica* с использованием полимеразной цепной реакции и ДНК-зондов //Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 30-летию института «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов», Щелково, 2000, стр. 388.

2. Коионенко А.Б., Бритова С.В., Светличкин О.В., Белоусов А.В. Проблема иерсиниоза и пути совершенствования диагностики //Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 30-летию института «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов», Щелково, 2000, стр. 386-387.

3. Орлов А.В., Светличкин О.В., Макаров М.М., Белоусов В.И., Светличкин В.В. Методы генной диагностики при ветсанэкспертизе и сертификации продовольственного сырья и пищевых продуктов // Материалы Всероссийской научно-производственной конференции «Разработка и освоение производства нового поколения лекарственных

средств для животных и их применение в ветеринарии», Ставрополь, 2000, стр. 89.

4. Соетличюп! В.В., Кононенко А.Б., Доля Е.А., Мамаев М.А., Денисова П.А., Горяннова Г.М., Светличкнн О.В., Макаров М.М. Тест-системы и технические средства ДНК-дпагностикп объектов встрииарпо-саннтариого и экологического контроля // Материалы Международной научной конференции «Биотехнология на рубеже двух тысячелетий», Саранск, 2001, стр. 138-140.

5. Светличкип О.В., Кононенко А.Б., Светлнчкйн В.В., Белоусов В.И. Индикация и идентификация иерспний в объектах ветсринарпо-сапитарного контроля // Сборник докладов Международной конференции молодых ученых «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов», Щелково, 2001, стр. 191-197.

6. Светлпчкин О.В. Индикация нерсинпй в зеленых кормах методами Д! К-дпагностики // Сборник трудов ВИИПВСГЭ "Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии", Москва, 2003,тД15,стр.184-188.

7. Кононенко А.Б., Бритова СВ., Бровкина А.Н., Светличкип О.В. Видовой состав микрофлоры кишечника птицы, персистенция иерсиний и степень распространения этих бактерий в птицеводческих хозяйствах // Сборник трудов ВМИИВСГЭ "Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии", Москва, 2003,т. 115,стр.93- 99.

ВИИИВСГЭ. г. Москва, Звенигородское шоссе, 5

Заказ 90/1 Тираж 80 экз.

№ 10584 .