

На правах рукописи

ГОРЯИНОВ Л ГАЛИНА МИХАИЛОВНА

ИНДИКАЦИЯ

**S GARNYLOCOCCUS AUREUS МЕТОДАМИ ДНК-ДИАГНОСТИКИ
В МОЛОКЕ И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТАХ**

Г 6.00.06 - 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 ВНИИВСГЭ РАСХН)

Научный руководитель:
доктор ветеринарных наук

Л.Д- Демидова (ГНУ ВНИИВСГЭ)

Официальные оппоненты:

- доктор ветеринарных наук, профессор В.А. Долгов (ГНУ ВНИИВСГЭ)
- доктор биологических наук А.М. Лысенко (Институт
микробиологии РАН)

Ведущая организация: 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

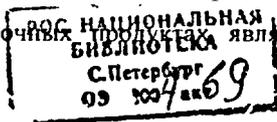
Актуальность темы. Одними из наиболее опасных возбудителей в плане возникновения пищевых токсикозов и токсикоинфекций являются стафилококки, листерии и сальмонеллы. Пищевые отравления людей при данных инфекциях возникают в случае употребления в пищу молока, молочных, мясных, рыбных и других продуктов, причем чаще всего они связаны с молочными продуктами (Поставин В.А., 1980; Логвинов Д.Д., 1992; Eshraghi H., 1997; Pflieger R. et al., 2002).

Золотистый стафилококк широко распространен во внешней среде, может жить и размножаться в тканях молочной железы, на коже сосков и вымени и является основным возбудителем мастита у коров (Демидова Л.Д., 1997; Гаврилин А.С., 2002; Matsunaga T. et al., 1990; Fitzgerald J.R. et al., 2000).

Заболевания людей, вызванные употреблением контаминированных золотистым стафилококком продуктов, обусловлены наличием в данных продуктах энтеротоксинов, которые вырабатываются стафилококками при определенных условиях.

Сырое молоко и молочные продукты всегда содержат то или иное количество стафилококков и поэтому они могут представлять опасность в плане возникновения стафилококковых интоксикаций (Коган Г.Ф. и др., 1990; Логвинов Д.Д., 1992).

Содержание *Staphylococcus aureus* в термически обработанном молоке и в молочных продуктах является одним из основных показателей безопасности и нормируется у нас в стране согласно требованиям СанПиН 2.3.2. 1078-01. Индикация *Staphylococcus aureus* определена в программе Государственного мониторинга сырья и продуктов. Большой объем исследований требует разработки быстрых и вместе с тем высокоспецифичных и чувствительных методов индикации золотистого стафилококка. Поэтому разработка ускоренных методов определения золотистого стафилококка в молоке и молочных продуктах является



весьма актуальной, так как это позволяет своевременно выявлять продукты с высокой контаминацией и определять пути ее устранения.

13 настоящее время существует достаточно много тестов выявления *Staphylococcus aureus*, основанных на методах бактериологического анализа, серологических методах и методах генной диагностики. Наиболее специфичными и чувствительными тестами зарекомендовали себя методы ДИК-диагностики. Они позволяют проводить анализ без предварительного обогащения материала в присутствии близкородственной микрофлоры (Гинзбург Л.Л., 1999; Hill W. et. al., 1983; Moseley S.L. et. al., 1989; Gannon V.P. et. al., 1992; Hashimoto Y., 1995; Myllys V. et. al., 1997; Khan M.A. et. al., 1998; Raimundo O. et. al., 1999; Lange C et. al., 1999; Capurro L. et. al., 1999; Edingloh M. et. al., 1999; Giese S.B. et. al., 2000).

Из литературных источников известно о применении методов на основе ДНК - диагностики для индикации *Staphylococcus aureus*, однако актуальным остается совершенствование методов и тест-систем индикации, разработка оптимальных вариантов, адаптация их к проведению анализа конкретных объектов (Khan M.A. et. al., 1998).

Большое значение, наряду с индикацией золотистого стафилококка в продуктах питания, придается вопросам их выявления в молоке коров на фермах при диагностике мастита, так как они являются наиболее опасными возбудителями. Однако, учитывая тот факт, что кроме золотистого стафилококка возбудителями мастита являются и другие микроорганизмы (стрептококки, эшерихии, псевдомонады, коринебактерии, микоплазмы и др.) (Карташова В.М., 1973; Карташова В.М. и др., 1988; Демидова Л.Д., 1997; Гаврилин А.С., 2002; Erskine R.J. et. al., 1987; Fang W. et. al., 1993), при изучении этиологии мастита важным является проведение идентификации всего спектра возбудителей. При этом большое разнообразие видов возбудителей, относящихся к разным родам и семействам, а также масштабность предполагаемых исследований **требуют создания ускоренных** скрининговых методов идентификации

микроорганизмов в молоке от коров, больных маститом. Эту задачу можно также решить с помощью одного из методов ДНК-диагностики, а именно» метода, основанного на изучении гомологии ДНК.

Цель и задачи исследований. Целью исследований являлась разработка методов и тест-систем индикации *Staphylococcus aureus* на основе ДНК-диагностики в молоке и молочных продуктах.

В задачи исследований входило:

1. Разработать методику ускоренной индикации *Staphylococcus aureus* в молоке и молочных продуктах на основе полимеразной цепной реакции.
2. Разработать методику ускоренной индикации *Staphylococcus aureus* в молоке и молочных продуктах с использованием генных зондов.
3. Провести идентификацию бактерий на основе гомологии ДНК для ускоренной оценки микробных контаминаций молока от коров, больных маститом.
4. Провести оценку методов ДНК-диагностики для быстрой индикации *Staphylococcus aureus* при мониторинге молока и молочных продуктов.
5. Разработать методические рекомендации по индикации *Staphylococcus aureus* в молоке и молочных продуктах на основе ДНК-диагностики.

Научная новизна. Отработаны условия выделения ДНК и параметры проведения полимеразной цепной реакции при индикации *Staphylococcus aureus* в молоке и молочных продуктах.

Разработаны методики индикации *Staphylococcus aureus* с использованием генных зондов, меченных биотипом, в молоке, сметане, твороге, сыре.

Определены чувствительность и специфичность методов индикации *Staphylococcus aureus* в молоке и молочных продуктах на основе **ПЦР и ДНК-гибридизации с тритиевой** и биотиновой метками.

Проведена оценка методов ДНК-диагностики для быстрой индикации *Staphylococcus aureus* при мониторинге молока и молочных продуктов.

Разработана методика идентификации бактерии на основе гомологии **ДНК** для ускоренной оценки микробных контаминации молока от коров, больных маститом.

Практическая ценность. На основании результатов исследования разработаны:

- Методические рекомендации по индикации *Staphylococcus aureus* в молоке и молочных продуктах на основе **ДНК-диагностики** (утверждены Отделением ветеринарной медицины РЛСХН, 10.12.2003 г.).

Апробация работы. Материалы диссертации доложены и обсуждены на:

- Международной конференции молодых ученых «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» (г. Щелково, 2000 г.);
- Международной конференции молодых ученых «Научные основы технологии производства ветеринарных биопрепаратов» **ВНИИТИБП РАСХН** (г. Щелково, 2001 г.);
- Международной научной конференции «Биотехнология на рубеже двух тысячелетий» (г. Саранск, 2001 г.);
- 4-й Международной научно-технической конференции «Пища. Экология. Человек.» (г. Москва, 2001 г.);
- заседании Ученого совета ВНИИВСГЭ (2003 г.);
- межлабораторном совещании ВНИИВСГЭ (2003 г.).

Основные положения выносимые на защиту.

- Условия выделения ДНК и параметры проведения полимеразноцепной реакции при индикации *Staphylococcus aureus* в молоке и молочных продуктах.

- Методики индикации *Staphylococcus aureus* в молоке, сметане, твороге, сыре с использованием генных зондов, меченных биотипом и тритием.

Чувствительность и специфичность методов индикации *Staphylococcus aureus* в молоке и молочных продуктах на основе ПЦР и ДНК-гибридизации с тритиевой и биотиновой метками.

- Результаты сравнительной оценки методов ДНК-диагностики для быстрой индикации *Staphylococcus aureus* при мониторинге молока и молочных продуктов.

- Методика идентификации бактерий на основе гомологии ДНК для ускоренной оценки микробных контаминации молока от коров, больных маститом.

Публикации. Результаты исследований отражены в 5 научных статьях.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических предложений, списка использованной литературы и приложений.

Диссертация изложена на 110 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц и 9 рисунков. Список литературы включает 210 источников отечественных и зарубежных авторов.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследований. Работа проводилась в период- с 1999 по 2003 гг. Диссертационная работа выполнена на основании плана научно-исследовательских работ ВНИИВСГЭ и является частью темы 05.02.12.1. Экспериментальная часть выполнена в лаборатории санитарии молока и профилактики мастита, в отделе сертификации и в лаборатории санитарной микробиологии ВНИИВСГЭ, а также в Институте микробиологии РАН.

Праймеры получали с помощью Центра пренатологии, акушерства и гинекологии РАМИ.

Материалами для исследования служили музейные штаммы *Staphylococcus aureus* 209 P, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* 0141-K99, *Pseudomonas aeruginosa*, образцы молока и молочных продуктов.

Для контаминации использовали культуры микроорганизмов различных таксономических групп: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. В качестве эталонных ДНК использовали ДНК этих же микроорганизмов.

Микробиологический анализ молока и молочных продуктов проводили по ГОСТ 9225-84 «Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа» и ГОСТ 30347-97 «Молоко. Метод выявления и определения *Staphylococcus aureus*».

Выделение и очистку ДНК, постановку реакции гибридизации проводили по Маниатису Т. (1984). Суммарные ДНК бактерий метили в реакции ник-трансляции. Получение ДНК-зондов и их мечение биотином 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).

Интенсивность окрашивания фильтров с гибридными молекулами определяли визуально или по поглощению при длине волны 500 нм на фотометре.

Экспериментальные данные подвергали статистической обработке по Стьюденту.

2.2. Результаты исследований.

2.2.1. Разработка методики ускоренной индикации *Staphylococcus aureus* в молоке и молочных продуктах на основе полимеразной цепной реакции.

При разработке методики ускоренной индикации, *Staphylococcus aureus* в качестве праймеров были выбраны следующие нуклеотидные последовательности:

Sa442-1 (5'-ЛАТ СТТ ТГТ СГГ ТАС АСГ АТА ТТС ТТС АСГ-3'), позиция с 5 по 34; Sa442-2 (5'-СГТ ГАГ АТТ ТГА ГАТ АЛТ АСА ЛСА-3'), позиция с 83 по 112.

В результате исследований были отработаны параметры полимеразной цепной реакции с использованием данных праймеров. Оптимальные режимы амплификации для соответствующих этапов были следующими: 1) денатурация - 95°C; 2) отжиг - 55°C; 3) элонгация - 72°C.

Использование -указанных праймеров позволило специфично выявлять ДНК *S.aureus*. Полоса амплификации наблюдалась только в системе, содержащей указанные праймеры и матричную ДНК *S.aureus*. При использовании матричных ДНК *S.epidermalis* и *E.coli* реакции не проходила.

Для постановки ПЦР очень важным является этап выделения матричных ДНК из бактерий, контаминирующих молоко и молочные продукты, так как из литературных данных известно, что недостаточная

очистка проб бактериальных ДНК от белков молока может приводить к **ингибированию** амплификации.

Памп было проанализировано несколько вариантов выделения и очистки **ДИК S.aureus** из молока и молочных продуктов.

При анализе молока и сметаны бактериальные клетки осаждали дифференциальным центрифугированием. Сметану дополнительно перед центрифугированием разбавляли физраствором. Осадок бактериальных клеток лизировали в буфере с лизостафином, проводили депротеинизацию хлороформом, ДИК осаждали этанолом и осуществляли амплификацию, как описано в методах.

При исследовании творога и сыров, имеющих твердую консистенцию, бактериальные клетки элюировали физраствором, осаждали центрифугированием, лизировали лизостафином, проводили депротеинизацию протеиназой и далее проводили ПЦР.

Различия в пробоподготовке молока и жидких молочных продуктов, а также продуктов твердой консистенции обусловлены тем, что в жидких объектах было трудно отдифференцировать бактериальные клетки от липопротеидной фракции.

На следующем этапе были проведены исследования по определению чувствительности индикации *S.aureus* в молоке и молочных продуктах. С этой целью указанные объекты контаминировали *S.aureus*, выделяли ДНК по приведенной выше схеме и амплифицировали. Параллельно пробы молока и молочных продуктов анализировали микробиологическим методом с использованием жидких и твердых питательных сред.

Порог чувствительности индикации *S.aureus* составлял 10-100 клеток в пробе (табл. 1).

Таблица I

Чувствительность метода индикации *S.aureus* в молоке и молочных продуктах на основе ПЦР

Разведения проб культуры <i>S.aureus</i> в жидкой среде	Результаты ПЦР			
	молоко	сметана	творог	сыр
Исходное	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+
10^{-5}	+	+	+	+
10^{-6}	+	+	+	+
10^{-7}	-	-	+	+
10^{-8}	-	-	-	-
контроль	-	-	-	-

(-) - отсутствие полосы амплификации

(+) - наличие полосы амплификации

При этом чувствительность определения *S.aureus* в твороге и сыре на порядок выше, чем в молоке и сметане. Это связано, по-видимому, с тем, что при данной методике выделения ДНК происходит частичная потеря бактериальных клеток при дифференциальном центрифугировании в результате их сорбции с липопroteидами сметаны и молока.

2:2.2. Разработка методики ускоренной индикации Staphylococcus aureus в молоке и молочных продуктах с использованием генных зондов.

При разработке методов и тест-систем индикации *S.aureus* в молоке и молочных продуктах генные зонды получали и метили тритием или биотипом в полпмеразной цепной реакции с использованием выбранных праймеров и меченых дезоксинуклеотидтрифосфатов.

При этом пробоподготовка для тритиевой и биотиновой меток отличалась тем, что для биотиновой метки очистку ДНК проводили с использованием органических растворителей (хлороформа или фенола).

В случае тритиевой метки из проб выделяли бактериальные клетки, обрабатывали лизостафином и протеиназой. Проводили термическую денатурацию ДНК и иммобилизовали на мембранные фильтры с диаметром пор 0,45мкм. После проведения гибридизации с H^3 ДНК - зондом фильтры отмывали от неспецифической сорбции раствором SSC и радиоактивность фильтров определяли на жидкостном сцинтиляционном счетчике. В качестве отрицательных контролен использовали аналогичные образцы продуктов, контаминированные близкородственными микроорганизмами, а также пустые фильтры.

При индикации *S.aureus* с ДНК- зондами, меченными биотипом, из проб элюировали бактериальные клетки, концентрировали их с помощью дифференциального центрифугирования и проводили лизис лизостафином. Далее осуществляли депротеинизацию 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, использование ДНК-зондов обеспечивало выявление *S.aureus* в исследуемых образцах. При этом специфичность анализа позволяла обнаруживать *S.aureus* даже в бактериальных смесях, включающих *S.epidermidis*, *E.coli*, *Ps.aeruginosa*.

Чувствительность индикации с применением ДНК-зондов была на два - три порядка ниже, чем при использовании методики ПЦР и составляла 10^3 - 10^4 клеток в пробе (таблицы 2 и 3).

Таблица 2

Результаты определения чувствительности индикации *S.aureus* в молоке методом гибридизации с ДНК-зондом, меченным тритием*

Разведение проб культуры <i>S.aureus</i> в жидкой среде	Объекты исследований			
	молоко	сметана	творог	сыр
	Радиоактивность фильтров с гибридными молекулами в имп/мин			
Исходное	3238±181	3966±154	7320±190	5421±99
10^{-1}	2915±179	3748±140	7100±181	5280±97
10^{-2}	2431±160	3300±135	6560±165	4873±86
10^{-3}	360±24	455±24	850±20	692±15
10^{-4}	45±2	58±3	106±5	87±3
10^{-5}	0	0	0	0
10^{-6}	0	0	0	0
10^{-7}	0	0	0	0
10^{-8}	0	0	0	0
контроль**	0	0	0	0

*- удельная активность ДНК-зонда составляла $2,5 \times 10^5$ имп/мин/мкг

** - контроль - культура *E.coli* · 10^8 КОЕ/см³

Таблица 3

Результаты определения чувствительности индикации *S.aureus* в молоке методом гибридизации с ДНК-зондом, меченным биотипом

Разведение проб культуры <i>S.aureus</i> в жидкой среде	Результаты гибридизации			
	молоко	сметана	творог	сыр
	Интенсивность окрашивания точек с гибридными молекулами			
Исходное	++++	++++	++++	++++
10^{-1}	++++	++++	++++	++++
10^{-2}	+++	+++	++++	++++
10^{-3}	++	++	+++	+++
10^{-4}	+	+	++	++
10^{-5}	-	-	+	+
10^{-6}	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-
контроль*	-	-	-	-

* - контроль - культура *E.coli* 10^8 КОЕ/см³

Повышение чувствительности метода до 10-100 клеток в пробе было получено в результате модификаций схем индикации *S.aureus* путем подращивания бактерий на твердых или жидких питательных средах.

При индикации *S.aureus* с предварительным подращиванием на твердых питательных средах исследуемые пробы переносили на нитроцеллюлозные фильтры, которые помещали на твердую питательную среду и подращивали до отдельных колоний, как описано в методах бактериологического анализа стафилококков. Далее фильтры помещали на стопку фильтровальной бумаги, смоченной соответствующим раствором для лизиса клеток, депротеинизации, щелочной денатурации ДНК и иммобилизации:

- раствор лизоцима 2 мг/см³, 40 ед. лизостафина (в 50 мМ трис-НС1, содержащий 25% сахарозы, рН-8,0, 10 мин);

- 0,5 М NaOH (10 мин);
- Трис-НСI буферный раствор 1М, рН-7,8 (10 мин);
- бхССР (5 мин).

ДНК на фильтрах фиксировали прогреванием в течение 1 часа при температуре 80°C и проводили гибридизацию с мечеными тритием ДНК в присутствии декстрансульфата в течение 8-12 часов.

После гибридизации осуществляли отмывку фильтров от неспецифической сорбции. Радиоактивность гибридных молекул ДНК на фильтрах определяли в жидкостном сцинтиляционном счетчике. В качестве контроля использовали чистые нитроцеллюлозные фильтры, обработанные аналогичным путем (контроль сорбции).

В случае использования биотинилированных зондов колонии золотистого стафилококка суспендировали в лизирующем буфере, ДНК очищали с помощью проназы, проводили тепловую денатурацию и иммобилизовали на мембранные нитроцеллюлозные фильтры в виде точек. Гибридизацию с биотинилированным ДНК-зондом и регистрацию конечного результата проводили по интенсивности окрашивания точек с гибридными молекулами.

Разработанные модификации методов с предварительным подрачиванием на твердых питательных средах позволяли проводить индикацию *S.aureus* в молоке и молочных продуктах, как с тритиевой, так и с биотиновой метками.

При использовании методики индикации *S.aureus* с подрачиванием в жидкой среде бактерии предварительно концентрировали из образцов дифференциальным центрифугированием, вносили в жидкую питательную среду и подрачивали в течение нескольких часов. Бактериальные клетки осаждали центрифугированием, выделяли ДНК, иммобилизовали на фильтры и проводили гибридизацию с мечеными ДНК-зондами.

Исследования показали высокую специфичность данного метода при индикации *S.aureus* в искусственно контаминированных образцах молока и молочных продуктов.

На основании проведенных исследований нами был разработан тест-набор для индикации стафилококков в молоке и молочных продуктах с использованием биотинилированных ДНК- зондов. Он включает реагенты для выделения ДНК и постановки реакции точечной ДНК-гибридизации с биотиновой меткой.

2.2.3. Идентификация бактерий на основе гомологии ДНК для ускоренной оценки микробных контаминаций молока от коров, больных маститом.

Кроме основных возбудителей мастита - стафилококков и стрептококков в этиологии этого заболевания принимают участие и другие микроорганизмы: эшерихии, коринебактерии, псевдомонады, а также микоплазмы. Вследствие этого, очень важным является проведение идентификации всего спектра микроорганизмов при мастите. При широкомасштабных исследованиях актуальной является разработка ускоренных скрининговых методов идентификации микроорганизмов в молоке от коров, больных маститом.

Метод определения гомологии ДНК на основе ДНК гибридизации нашел широкое применение в систематике бактерий. Он используется, как для уточнения систематики генетического родства между уже описанными группами, так и при установлении таксономического статуса новых форм. Высокая чувствительность и избирательность позволяет использовать его также для идентификации вновь выделяемых штаммов бактерий.

В классическом варианте идентификацию проводят по следующей схеме: из исследуемого микроорганизма выделяют ДНК, в нее вводят соответствующую метку и проводят гибридизацию с ДНК этого же

штамма (гомологичная система), а также с эталонными ДНК других штаммов (гетерологичные системы). Уровень гибридизации в гомологичной системе принимают за 100% гомологии сравниваемых молекул ДНК. При этом учитывают, что степень генетического родства микроорганизмов дискретна, поэтому определенному уровню гомологии соответствует и определенный таксономический ранг. Так, Медниковым Б.Н. и Леваиовой Г.Ф. на основании математической обработки экспериментальных данных было показано, что ~70-100 % гомологии ДНК свидетельствует о принадлежности к одному виду, -40-60% - к одному роду, -25% - к одному семейству, ближе к 0% - к разным семействам (Медников Б.Н., Леванова Г.Ф., 1974; Медников Б.Н., 1978).

Этот подход может быть использован для ускоренной оценки спектра микробных контаминации молока от коров, больных маститом.

Схема анализа заключалась в следующем: исследуемые пробы высевали на твердые питательные среды и подращивали до отдельных колоний; высевали чистую культуру на агар газоном и из полученной биомассы выделяли ДНК; метили тритием в реакции ник-трансляции и гибридизовали с эталонными, предварительно выделенными бактериальными ДНК.

Проведенные исследования показали, что степень гибридизации исследуемых ДНК соответствовала уровню гомологии внутри рода и между представителями разных родов и семейств. Полученные данные свидетельствуют о возможности идентификации бактерий в исследуемых образцах молока и молочных продуктов.

Для ускоренной оценки спектра возбудителей при мастите нами предлагается следующая тест-система на основе гибридизации ДНК. Она включает тест-набор для ускоренного выделения ДНК бактерий, тест-набор для мечения ДНК методом ник-трансляции, фильтры с эталонными иммобилизованными ДНК и тест-набор для проведения гибридизации ДНК с тритиевой меткой.

Предложенная методика. в 3-4 раза сокращает время анализа по сравнению с микробиологической оценкой.

2.2.4. Оценка методов ДНК-диагностики для быстрой индикации S.aureus при мониторинге молока и молочных продуктов.

Для оценки методов ДНК- диагностики при индикации S.aureus использовали образцы молока и молочных продуктов, отобранных для сертификации и мониторинговых исследований. Параллельно проводили испытания бактериологическим методом. Были исследованы образцы йогурта, пудинга, молока, кефира, сметаны, сыра, масла, как импортного, так и отечественного производства.

Результаты испытаний методами ДНК-диагностики в основном коррелировали с данными бактериологического анализа. Однако в единичных случаях положительные результаты были получены только в опытах по ДНК- диагностике. Это могло быть связано с тем, что в этих образцах присутствовали L- формы S.aureus.

Для подтверждения этого предположения, получали L-формы путем воздействия антибиотиков на культуру S.aureus и контаминировали ими, а также вегетативными формами молоко и молочные продукты.

При проведении модельных экспериментов с искусственно контаминированными вегетативными и L- формами S.aureus образцами молока и молочных продуктов методы ДНК-диагностики позволяли проводить индикацию вегетативных и L- форм.

При микробиологических исследованиях были получены отрицательные результаты, однако длительная инкубация посевов позволяла выделять вегетативные формы S.aureus, что объясняется реверсией L-форм.

Наличие L-форм контролировали также с помощью электронной микроскопии. При этом электронномикроскопические тесты показывали присутствие S.aureus в разных стадиях L-трансформации (Рис.1).



Рис.1. Фрагмент колонии *Staphylococcus aureus*, обработанным антибиотиками. Сканограмма, х 10000.

ВЫВОДЫ

1. разработана методика ускоренной индикации *S.aureus* в молоке и молочных продуктах на основе ПЦР, включающая этапы дифференциального центрифугирования для выделения бактерии, лизис клеток с использованием лизостафина и депротенинизацию хлороформом и нротеиназой.
2. Специфичность методики индикации *S.aureus* с использованием **праймеров Sa442-1 (5'-ААТ СТТ ТGТ СGG ТАС АCG АТА ТТС ТТС АCG-3')**, позиция с 5 по 34; и **Sa442-2 (5'-CGT GAG АТТ ТGA GAT ААТ АСА АСА-3')**, позиция с 83 по 112, позволяет проводить анализ в присутствии близкородственных видов бактерий.
3. Чувствительность метода индикации *S.aureus* на основе ПЦР составляет в твороге и твердых сырах 10 клеток в 1 г, а в молоке и сметане - 100 клеток в 1 см³.
4. Разработана методика индикации *S.aureus* в молоке, сметане, Твороге и твердых сырах с использованием ДНК-зондов, меченных тритием, включающая этапы дифференциального центрифугирования для концентрирования бактерий, лизиса клеток с использованием лизостафина, депротенинизации додецилсульфатом натрия и протеиназой, гибридизации на фильтрах и детектирования гибридных молекул жидкостной сцинтилляцией.
5. Разработана методика индикации *S.aureus* в молоке, сметане, твороге и твердых сырах с использованием ДНК-зондов, меченных биотипом, включающая этапы дифференциального центрифугирования для концентрирования бактерий, лизиса клеток с использованием лизостафина, депротенинизации додецилсульфатом натрия и хлороформом, осаждения ДНК этанолом, точечной гибридизации на фильтрах и детектирования

гибридных молекул по интенсивности окрашивания визуально или фотометрированием.

6. Чувствительность метода индикации *S.aureus* с использованием трнтивных ДНК-зондов составляет 10^4 клеток в пробе всех исследуемых объектов, порог чувствительности с использованием биотиповых зондов составляет для молока и сметаны 10^4 клеток в пробе, а для творога и твердых сыров - 10^3 клеток в пробе.
7. Разработаны схемы с предварительным обогащением *S.aureus* в жидких и твердых питательных средах, позволяющие повысить чувствительность индикации ДНК- зондами до 10 - 100 клеток в пробе.
8. Проведенными мониторинговые исследованиями различных образцов молока и молочных продуктов показана возможность индикации вегетативных и L-форм *S.aureus* в присутствии близкородственной микрофлоры:
9. На основе определения степени гомологии ДНК методом гибридизации молекул показана возможность идентификации бактерий, являющихся возбудителями мастита.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ПРАКТИКИ

Для использования в научных учреждениях и исследовательских лабораториях могут быть рекомендованы разработанные нами «Методические рекомендации по индикации *Staphylococcus aureus* в молоке и молочных продуктах на основе ДНК-диагностики» (утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН, 10.12.2003 г.).

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Горяинова Г.М. Выявление *Staphylococcus aureus* методом полимеразной цепной реакции // Груды ВНИИВСГЭ «Проблемы ветеринарной санитарии и экологии», Москва, 2000, том 109, стр. 93-96.
2. Светличкин В.В., Орлов А.В., Доля Е.А., Горяинова Г.М., Белоусов В.И. Разработка переносной портативной укладки индикации и идентификации микроорганизмом в объектах ветеринарно-санитарного и экологического контроля с использованием генных зондов // Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 30-летию института «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» ВНИ и ТИБП РАСХН, Щелково, 2000, стр. 389-390.
3. Горяинова Г.М., Демидова Л.Д., Светличкин В.В. Ускоренное обнаружение и идентификация стафилококков на основе ДНК-диагностики // Сборник докладов Международной конференции молодых ученых «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов» ВНИ и ТИБП РАСХН, Щелково, 2001, стр. 197-198.
4. Светличкин В.В., Коноиенко А.Б.; Доля Е.А., Мамаев М.А., Денисова Е.А., Горяинова Г.М., Светличкин О.В., Макаров М.М. Тест-системы и технические средства ДНК-диагностики объектов ветеринарно-экологического контроля // Материалы Международной научной конференции «Биотехнология на рубеже двух тысячелетий», МГУ им. Н.П. Огарева, Саранск, 2001, стр. 138-140.
5. Горяинова Г.М. Методы контроля стафилококков при сертификации продукции и перспективы их развития // Материалы 4-й Международной научно-технической конференции «Пища. Экология. Человек.», Москва, 2001, стр.329.

№. 1701

РНБ Русский фонд

2004-4

26845