

УДК 636.09:616.98:579.62

УШКАЛОВ А.В., аспірант

ГОЛОВКО А.М., академік НААН України

ДЕРЯБІН О.М., зав. відділу молекулярної біології та імунохімії

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ)

artem_ushkalov@mail.ru

РЕЗУЛЬТАТИ КОМІСІЙНИХ ВИПРОБУВАНЬ НАБОРУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ДНК *YERSINIA ENTEROCOLITICA* МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ

У статті наведено дані щодо результатів комісійних випробувань діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій виду *Yersinia enterocolitica* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Yersinia enterocolitica* – ПЛР – Тест». Експериментально доведено специфічність та відтворюваність розробленого засобу діагностики, що стало підставою для його державної реєстрації згідно із чинними вимогами. Тест-система дозволить інструментально вдосконалити систему моніторингу ієрсиній як складової системи превентивних заходів щодо контролю безпеки харчових продуктів та попередження харчових інфекцій людей.

Ключові слова: *Yersinia enterocolitica*, полімеразна ланцюгова реакція, ДНК бактерій, діагностичний набір.

Постановка проблеми. У зв'язку з підписанням економічної частини угоди про асоціацію України з Європейським Союзом, змінами у вітчизняному харчовому законодавстві з метою гармонізації його до європейського, необхідністю впровадження в Україні європейської моделі оцінки відповідності харчової продукції вимогам технічних регламентів, виникла об'єктивна потреба інструментального забезпечення належного її контролю на всіх етапах виробництва з урахуванням визначених критичних точок можливого забруднення, зокрема – біотичними факторами. У зв'язку з викладеним, розробка і впровадження засобів експресного виявлення небажаних та потенційно небезпечних для споживачів мікроорганізмів – можливих контамінантів харчових продуктів, є актуальним завданням сьогодення [1].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Одним із потенційно небезпечних представників факультативної (транзитної) мікрофлори різних біотопів тваринного організму є збудник кишкового ієрсиніозу *Yersinia enterocolitica*.

Кишковий ієрсиніоз – гостре інфекційне захворювання, що характеризується переважним ураженням шлунково-кишкового тракту з тенденцією до генералізованого ураження різних органів і систем. Хворіють тварини і людина. Проблема ієрсиніозів привертає все більше уваги ветеринарних та медичних працівників, що обумовлено поширеністю ієрсиній у природі (грунт, вода, каналізація, рослини, пил), збільшенням кількості хворих на ієрсиніоз людей та недосконалими методами лабораторної діагностики цих захворювань. На вивчення біологічних властивостей збудника та розробку засобів лабораторної діагностики ієрсиніозу спрямовували свої дослідження: Бабкін А.Ф., Скрипник В.Г., Івановська Л.Б., Соболев Н.М., Орлова В.А., Савинова Е.М., Козловська Г.В., Скибіцький В.Г., Рубан О.М., Назаренко О.В., Кравченко М.А., Ляшенко В.В., Поліщук Н.М., Elmanana A., Fevrana N., Rahman A., Boni T., Stonsoavapak S., Ananchaipatana H. Проте, досі залишається ряд невирішених питань. Отже, розробка ефективних засобів та способів, направлених на своєчасну діагностику та попередження масового розповсюдження ієрсиніозу, на сьогодні залишається актуальним питанням як для ветеринарної, так і для медичної науки і практики [2].

За даними ВООЗ, поширеність ієрсиніозу носить глобальний характер. Ця хвороба реєструється більш ніж у 30 країнах світу, але частіше в країнах з прохолодним кліматом (рис. 1) [12].

За літературними даними, основним джерелом ієрсиніозної інфекції для людини є сільськогосподарська продукція – як тваринницька, так і рослинного походження. На носійство ієрсиній ВРХ вказують численні повідомлення про хибно позитивні реакції на бруцельоз під час виконання національних програм боротьби з цим захворюванням (зокрема виявлені перехресні реакції до *Yersinia enterocolitica* серотипу O: 9) [8].

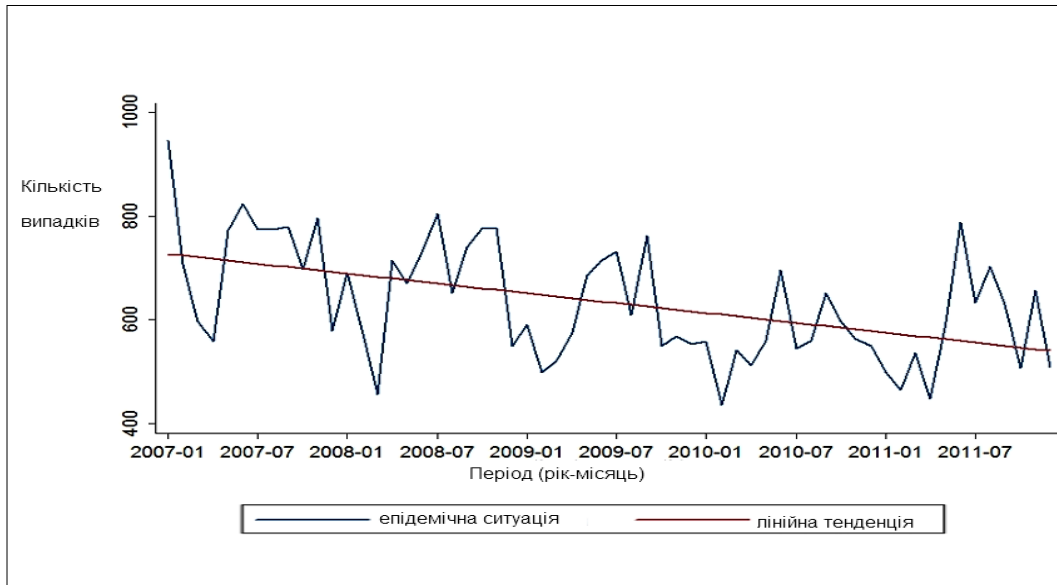


Рисунок 1. – Динаміка кількості підтверджених випадків ієрсиніозу людини в країнах ЄС за період 2007-2011 рр. [12].

Рівень контамінації ієрсиніями продуктів харчування, за даними EFSA, коливався від 0 до 83%, а саме найбільш часто контамінованими виявилися свинячі язика (83 %), печінка (73%), серце (71 %) і нирки (67%). Vishnubhatla зі співавторами виявили високий рівень контамінації із фаршу яловичини ієрсиніями. Є дані про контамінацію ієрсиніями устриць, мідій, креветок, крабів, риби, салатів з курячого м'яса, тушкованих грибів, капусти, селери, моркви тощо [11].

Діагностика ієрсиніозу проводиться комплексно з урахуванням епізоотологічних даних, клінічних та патолого-анатомічних змін і обов'язково лабораторних досліджень, які є трудомісткими та довготривалими. Основними методами діагностики ієрсиніозу є: 1) бактеріологічний метод, 2) серологічний метод, 3) молекулярно-генетичний (ПЛР). Найбільш швидким та високоспецифічним методом діагностики ієрсиніозу є полімеразна ланцюгова реакція.

Ураховуючи різноманіття біотипів бактерій виду *Yersinia enterocolitica*, а також численних типів, що не культивуються, в ДНКІБШМ була розроблена тест-система для їх виявлення на основі «гніздового» варіанту ПЛР. У ролі мішені було обрано ген, що кодує субодиницю 16S rRNA.

Мета і завдання дослідження – проведення комісійних реєстраційних випробувань розробленого в ДНКІБШМ «Діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій виду *Yersinia enterocolitica*» методом полімеразної ланцюгової реакції «*Yersinia enterocolitica* – ПЛР – Тест».

Матеріал і методика досліджень. Випробування проводили відповідно до Методики державних комісійних міжвідомчих випробувань дослідної серії «Діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій виду *Yersinia enterocolitica*» методом полімеразної ланцюгової реакції «*Yersinia enterocolitica* – ПЛР – Тест», розглянутих та схвалених на засіданні науково-методичної комісії Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (протокол № 2 від 18.02.2013 року).

Розроблений набір було перевірено за наступними показниками: зовнішній вигляд та колір; наявність сторонніх домішок, тріщин флаконів (ампул), щільність укупорки, етикетування; специфічність, чутливість, відтворюваність.

Визначення чутливості проводили з використанням зразків, що вміщували різну кількість матеріалу збудника (поріг чутливості тест-системи повинен забезпечувати детекцію ДНК у зразках, що містять до 500 мікробних клітин). З цією метою із суспензії контрольного позитивного зразку виготовляли граничні розведення з висівом на щільні середовища для отримання окремих колоній. Брали розведення з активністю 10, 100, 1000 КУО/см³.

Критерієм специфічності вважали наявність відповідних реакцій у використанні позитивних зразків та неспроможність праймерів гібридизуватись з ДНК-негативних та гетерологічних зразків, що повинно супроводжуватись відсутністю будь-яких продуктів на електрофореграмі у цих

Таблиця 2 – Результати визначення чутливості та специфічності тест-системи «*Yersinia enterocolitica* – ПЛР – Тест»

№ з/п	Зразки	Результати досліджень, повтор		
		1	2	3
1	Позитивний контроль <i>Yersinia enterocolitica</i> (нативний зразок)	позитивний	позитивний	позитивний
2	Негативний контроль (стерильна вода)	негативний	негативний	негативний
3	Позитивний контроль <i>Yersinia enterocolitica</i> (розведення 10^{-7})	негативний	негативний	негативний
4	Позитивний контроль <i>Yersinia enterocolitica</i> (розведення 10^{-6})	позитивний	позитивний	позитивний
5	Позитивний контроль (розведення 10^{-5})	позитивний	позитивний	позитивний

Аналіз одержаних результатів вказує на високу специфічність випробуваної тест-системи (табл. 3): встановлено позитивний результат з культурами, що належать до роду *Yersinia enterocolitica*, та негативний результат з культурами інших видів (*Yersinia pseudotuberculosis*) та родів (за дослідження гетерологічних зразків ДНК, отриманих із 12 видів бактерій, візуалізації продуктів ампліфікації не реєстрували).

Рівень відтворюваності результатів, отриманих з використанням тест-системи «*Yersinia enterocolitica* – ПЛР – Тест» (табл. 3), перевіряли триразовим дослідженням панелі позитивних, негативних та гетерологічних зразків; дослідження повторювали тричі. Одержані результати трьох циклів досліджень збігались у 100% випадків, що є критерієм відтворюваності.

Отже, дослідження з визначення відповідності розробленого набору для молекулярно-генетичної індикації та ідентифікації *Yersinia enterocolitica* за показниками якості – специфічності, чутливості, відтворюваності показали, що набір відповідає вимогам, які висуваються до засобів діагностики, термін проведення досліджень в межах 4-6 годин. Отримані результати досліджень слугували підґрунтям для державної реєстрації тест-системи в Україні.

Переваги виявлення *Yersinia enterocolitica* за допомогою тест-системи «*Yersinia enterocolitica* – ПЛР – Тест»: висока специфічність, обумовлена тим, що в дослідному матеріалі виявляють характерний лише для ієрсиній фрагмент ДНК; чутливість становила 100 КУО/см³ збудника. ПЛР дає змогу виявляти ДНК таких біотипів ієрсиній, які не вегетують на поживних середовищах; можливість у короткий термін одержувати результати (проведення аналізу не потребує бактеріологічного дослідження з метою виділення або накопичення збудника, дослідження одного зразка триває в середньому 6-8 год).

Таблиця 3 – Результати дослідження специфічності і відтворюваності тест-системи «*Yersinia enterocolitica* – ПЛР – Тест»

Штам	Код	Біотип	Ген 16S rRNA (п.н.)		
			Результат 2 реакція		
			повтор		
			1	2	3
<i>Yersinia enterocolitica, ub.entero-</i>	ATCC 23715	1	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica, ub.entero-</i>	ATCC 27729	8	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	46/15-09	O:6,30	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2/15-09	O:3	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	13/15-10	O:3	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2/15-08	O:4,32	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	12/15-08	нд	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	21/15-09	O:5,27	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	29/15-09	O:3	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	44/15-09	O:3	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	44/15-08	O:3	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	9610	O:8	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3/15-08	O:6,30	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	14/15-07	O:6,30	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	18/15-07	O:6,30	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	44/15-08	O:3	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	20/15-09	O:3	191	191	191

<i>Yersinia enterocolitica</i>	22/15-09	O:6,30	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	23/15-08	O:6,30	191	191	191
<i>Yersinia enterocolitica</i>	9610	O:8	191	191	191
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	121	нд	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	632	нд	-	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>	LMG 11388	нд	-	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>	LMG 11386	нд	-	-	-
<i>Listeria grayi</i>	LMG 16490	нд	-	-	-
<i>Listeria murrayi</i>	LMG 16491	нд	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923 (F-49)	нд	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922 (F-50)	нд	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	нд	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	нд	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	1	нд	-	-	-
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	19-	нд	-	-	-

Висновок. За результатами комісійних випробувань «*Yersinia enterocolitica* – ПЛІР – Тест» для виявлення бактерій виду *Yersinia enterocolitica* методом полімеразної ланцюгової реакції встановлено її відповідність аналітично-нормативній документації, визначено, що чутливість діагностичному становить 100 КУО/см³, відзначено її високу специфічність та відтворюваність, що стало підставою для реєстрації вказаного засобу діагностики в Україні (реєстраційне посвідчення – ВВ-00678-06-14).

Перспективи подальших досліджень. Надалі планується впровадження розробленої тест-системи в практику повсякденної роботи в державних лабораторіях ветеринарної медицини, що сприятиме підвищенню ефективності ветеринарно-санітарного нагляду.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Закон України про внесення змін до деяких законодавчих актів України щодо харчових продуктів / Верховна Рада України. – Офіц. вид. – К.: Парлам. вид-во, 2014. – № 41–42, ст. 2024.
2. *Yersinia enterocolitica*: Epidemiological Studies and Outbreaks [Електронний ресурс] // Journal of Pathogens Vol. 2011/ – Vol 2011 – P. 4, 6 / Спосіб доступу <http://www.hindawi.com/journals/jpath/2011/239391>.
3. Бактериологическая и серологическая диагностика иерсиниозов животных / Материалы Республиканской конференции // Ветеринарная медицина. Экономические, социальные и экологические проблемы (20-22 ноября 1990 г.). / А.Ф. Бабкин, В.Г. Скрипник, Л.Б. Ивановская. – Харьков, 1990. – С. 269–270.
4. Результаты гематологических исследований при экспериментальном иерсиниозе / Материалы Всесоюзной конференции. «Повышение продуктивности с.-х. животных и совершенствование мер борьбы с болезнями в условиях интенсивного ведения животноводства и создания фермерских хозяйств»: (17-22 сентября 1991 г.). / В.Г. Скрипник, Л.Б. Ивановская – Харьков, 1991. – С. 145–146.
5. Monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp. [Текст] / The EFSA Journal. – 2007. – Vol. 3.1. 3.2. – P. 10–13.
6. Н.М. Соболев. Серологическая и бактериологическая индикация иерсиний у животных / В.А. Орлова, В.Г. Скрипник, Е.М. Савинова, Л.Б. Ивановская // Ветеринария – № 63.– К.: Урожай, 1988. – С. 20–24.
7. Козловська Г.В. Контроль мікрофлори біотопів тваринного організму – важливий елемент в організації отримання якісної й безпечної продукції [Текст] / Г.В. Козловська, В.Г. Скибіцький // Вісник Полтавської аграрної академії. – 2013. – №4. – С. 56–58.
8. Епідемічна значущість іерсиніозів в м. Києві / Матеріали наради-семінару з актуальних питань епідеміології і профілактики зооантропонозних інфекційних хвороб та режиму безпеки у лабораторіях державної санітарно-епідеміологічної служби МОЗ. / О.М. Рубан, О.В. Назаренко, М.А. Кравченко, В.В. Ляшенко. – Дніпропетровськ, 2006. – С.122–123.
9. Elmanama A.A. *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in Clinical, Food and Environmental Samples in Gaza / Abdelraouf A. Elmanama, Naima Ferwana // Journal of Al Azhar University-Gaza (Natural Sciences). – 2011. – № 13. – P. 69–82.
10. Ивановська Л.Б. / Про клінічні ознаки, що спостерігаються у різних видів тварин, хворих на іерсиніоз / Л.Б. Ивановська // Вісник Сумського НАУ, 2003.– №8. – С.40–43.
11. Zoonoses and public health/ Zur diagnostik und vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in wasser./ [Електронний ресурс] / Спосіб доступу <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439.0450.1986.tb00009.x/abstract>

REFERENCES

1. Zakon Ukraïny pro vnesennja zmin do dejakyh zakonodavchyh aktiv Ukraïny shhodo harchovyh produktiv / Verhovna Rada Ukraïny. – Ofic. vyd. – K.: Parlam. vyd-vo, 2014. – № 41–42, st. 2024.

2. *Yersinia enterocolitica*: Epidemiological Studies and Outbreaks [Електронний ресурс] // Journal of Pathogens Vol. 2011/ – Vol 2011 – P. 4, 6 / Спосіб доступу <http://www.hindawi.com/journals/jpath/2011/239391>.
3. Bakteriologicheskaja i serologicheskaja diagnostika iersiniozov zhivotnyh / Materialy Respublikanskoj konferencii «Veterinarnaja medicina. Jekonomicheskie, social'nye i jekologicheskie problem» (20-22 nojabrja 1990 g.). / A.F. Babkin, V.G. Skrypnik, L.B. Ivanovskaja – Har'kov, 1990. – S. 269–270.
4. Rezul'taty gematologicheskikh issledovanij pri jeksperimental'nom iersinioze / Materialy Vsesojuznoj konferencii. Povyshenie produktivnosti s.-h. zhivotnyh i sovershenstvovanie mer bor'by s boleznyami v uslovijah intensivnogo vedenija zhivotnovodstva i sozdanija fermers'kih hozjajstv: (17-22 sentjabrja 1991 g.). / V.G. Skrypnik, L.B. Ivanovskaja //– Har'kov, 1991. – S. 145–146.
5. Monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp. [Текст] / The EFSA Journal. – 2007. – Vol. 3.1., 3.2. – P. 10–13.
6. N.M.Sobolev. Serologicheskaja i bakteriologicheskaja indikacija iersinij u zhivotnyh / V. Orlova, V. Skrypnik, E. Savinova, L. Ivanovskaja. // Veterinarija, №63. – K.: Urozhaj, 1988.– S. 20–24.
7. Kozlovs'ka G.V. Kontrol' mikroflory biotopiv tvarynnogo organizmu – vazhlyvyj element v organizacii' otrymanija jakisnoi' j bezpechnoi' produkcii' [Tekst] / G. Kozlovs'ka, V. Skybic'kyj // Visnyk poltavskoi' agrarnoi' akademii'. – 2013. – №4. – S. 56 – 58.
8. Epidemichna znachymist' ijersynioziv v m. Kyjevi / Materialy narady – seminaru z aktual'nyh pytan' epidemiologii' i profilaktyky zooantroponoznyh infekcijnyh hvorob ta rezhymu bezpeky u laboratorijah derzhavnoi' sanitarno – epidemiologichnoi' sluzhby MOZ. / O.M. Ruban, O.V. Nazarenko, M.A. Kravchenko, V.V. Ljashenko. – Dnipropetrovs'k, 2006. – S.122–123.
9. Elmanama A.A. *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in Clinical, Food and Environmental Samples in Gaza / Abdelraouf A. Elmanama, Naima Ferwana // Journal of Al Azhar University-Gaza (Natural Sciences). – 2011. – № 13. – P. 69-82.
10. Ivanovs'ka L.B. / Pro klinichni oznaky, shho sposterigajut'sja u riznyh vydiv tvaryn hvoryh na ijersynioz / L.B. Ivanovs'ka // Visnyk Sums'kogo NAU, 2003.– №8. – S. 40–43.
11. Zoonoses and public health/ Zur diagnostik und vorkommen von *Yersinia enterocolitica* in wasser./ [Електронний ресурс] / Спосіб доступу <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439.0450.1986.tb00009.x/abstract>

Результаты комиссионных испытаний набора для выявления ДНК *Yersinia enterocolitica* методом полимеразной цепной реакции

А.В. Ушкалов, А.М. Головки, О.Н. Дерябин

В статье приведены данные по внедрению в практическую деятельность диагностического набора для выявления ДНК бактерий вида *Yersinia enterocolitica* методом полимеразной цепной реакции «*Yersinia enterocolitica* – ПЦР – Тест». Обоснована необходимость совершенствования системы мониторинга возбудителей иерсиниоза в качестве превентивной меры касательно распространения заболевания среди животных и людей. Экспериментально доказаны специфичность и воспроизводимость разработанного средства диагностики, что стало основанием для его государственной регистрации согласно действующим требованиям. Тест-система позволит инструментально усовершенствовать систему мониторинга иерсиний как составляющей системы превентивных мер по контролю безопасности пищевых продуктов и предупреждению пищевых инфекций людей.

Ключевые слова: *Yersinia enterocolitica*, полимеразная цепная реакция, ДНК бактерий, диагностический набор.