

УДК 619:614.31:637:577.2

ОБЛАП Р.В., канд. біол. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

roblap@hotmail.com

ВИЗНАЧЕННЯ ПРЕДСТАВНИКІВ *SALMONELLA SPP.* МЕТОДОМ ПЛР У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

Розроблено тест-систему для визначення бактерій роду *Salmonella* методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (Real-Time PCR). Система уможливіє ідентифікацію представників *Salmonella spp.* у харчових продуктах та продовольчій сировині. Діагностикум адаптовано для проведення аналізів на приладах найбільш відомих виробників (BioRad, Applied Biosystems, Corbett Research, Синтол, ДНК-технологія) і може бути рекомендовано до застосування у лабораторній діагностиці.

Ключові слова: *Salmonella spp.*, ПЛР у реальному часі, харчові продукти і продовольча сировина.

Постановка проблеми. Нині епідеміологічна безпека харчових продуктів як тваринного, так і рослинного походження визначається передусім за мікробіологічними показниками. Це і не дивно, оскільки з-поміж усіх агентів, що спричиняють харчові отруєння у людей, 70 % припадає на патогенні бактерії. Особливу небезпеку становлять такі мікроорганізми як сальмонели, стрептококи, стафілококи та ін., які, розмножуючись і накопичуючись у харчових продуктах, не призводять до зміни їх органолептичних властивостей [1, 2].

Аналіз останніх досліджень і публікацій. До найбільш небезпечних широко розповсюджених кишкових інфекцій людини та сільськогосподарських тварин належить сальмонельоз. У людини сальмонельоз проявляється у вигляді харчових токсикоінфекцій, які характеризуються значним поліморфізмом клінічного перебігу з переважним ураженням шлунково-кишкового тракту і різним ступенем вираженості симптомів загальної інтоксикації та зневоднення. Основними джерелами та факторами передавання збудника є забруднені харчові продукти, сировина та вода [3].

Сальмонельоз спричиняють бактерії роду сальмонела (*Salmonella spp.*). Згідно із сучасною класифікацією, основою на аналізі ДНК, рід *Salmonella* належить до родини *Enterobacteriaceae*, представлений двома видами (*S. enterica* і *S. bongori*), шістьма підвидами (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* і *indica*) і нараховує більш ніж 2500 серотипів. Інфекційна доза сальмонел, за різними даними, може становити від 10 до 10⁹ колонієтвірних одиниць та залежить передусім від особливостей організму господаря (імунітет, стан шлунково-кишкового тракту, вік), способу введення патогену, його серотипу та фізіологічного статусу бактерій [4–6].

Сальмонельоз залишається однією з найпоширеніших форм захворювань у світі, які пов'язані з вживанням харчових продуктів. Згідно з інформацією ВООЗ, у світі щорічно реєструють до 1,3 млрд випадків сальмонельозу, при цьому динаміка захворюваності населення має тенденцію до зростання. За відсутності ефективного лікування сальмонельозу частота летальних випадків у людей становить від 1–3 до 10–15 %. Останнім часом набули поширення серотипи сальмонел, що вирізняються резистентністю до багатьох сучасних поширених антибіотиків і дезінфікуючих засобів, а також підвищеною термостійкістю [7, 8].

У США сальмонельоз становить майже 9 % усіх харчових інфекцій. Щорічно це захворювання реєструють у 1,4 млн мешканців США, а матеріальні витрати, пов'язані з його наслідками та профілактикою, оцінюють у 1–2,3 млрд доларів на рік. У 2006–2009 рр. у країнах ЄС зареєстровано достовірне збільшення числа випадків виявлення сальмонел у м'ясі птиці. У Росії в 2010 р. Роспотребнадзор посилив мікробіологічний контроль тваринницької продукції через її потенційне забруднення сальмонелами [4]. В Україні випадки сальмонельозу реєструють майже на всіх адміністративних територіях. За даними МОЗ України, найвищі рівні захворюваності на сальмонельози з тенденцією до зростання реєструють у Харківській, Запорізькій, Дніпропетровській, Чернігівській областях, АР Крим та в місті Київ. Загальний показник захворюваності по країні у 2011 р. становив більш як 15 на 100 тис. населення [12].

Сучасна діагностика сальмонельозу базується на бактеріологічних, серологічних та молекулярно-генетичних методах аналізу [9]. Традиційні методи детекції сальмонел, основані на

культивуванні в поживних середовищах, мають високу чутливість і селективність, але водночас досить трудомісткі і займають багато часу. В останні роки широкого поширення в практиці лабораторної діагностики набули нові експрес-методи на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР, PCR). Метод ПЛР виявився досить ефективним під час діагностики мікроорганізмів, які важко культивуються у лабораторних умовах, внутрішньоклітинних паразитів, атипічних форм та мікроорганізмів, здатних до довготривалої персистенції в організмі господаря. Останні розробки в галузі ПЛР-технологій, зокрема ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ, Real-Time PCR) дають можливість значно прискорити час аналізу, зменшити його собівартість та трудомісткість, і, завдяки його високій чутливості та вибірковості, забезпечити винятковість визначення патогену в харчових продуктах, сировині та кормах [4, 10].

У зв'язку з цим **метою** роботи було розроблення та апробація вітчизняного діагностичного методу на основі методу ПЛР-РЧ для виявлення та ідентифікації *Salmonella spp.* у харчових продуктах та продовольчій сировині рослинного і тваринного походження.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом для виділення бактеріальної ДНК слугували типові штами родів *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella* та *Escherichia*, а також харчові продукти, в яких було підтверджено наявність *Salmonella spp.* мікробіологічними методами аналізу. Ізоляцію ДНК проводили за використання методу температурного лізису з наступним доочищенням на Silica-Spin колонках. Концентрацію та якість виділеної ДНК оцінювали методом спектрофотометрії за довжини хвилі $\lambda=260$ нм [11].

ПЛР-ампліфікацію у режимі реального часу проводили за допомогою приладу CFX96 (BioRad, США). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила 2 мкл ДНК, 10 мМ Тріс-НСІ (рН 8,3), 50 мМ КСІ, 2,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ дНТФ суміші, 10 пкМ кожного з праймерів, 5 пкМ зонду та 1 од. Таq-полімерази (Fermentas, Литва). Температурний режим складався з початкової денатурації впродовж 3 хв за 94 °С та наступних 45 циклів: денатурації – 20 с за 95 °С, відпалу праймерів – 60 с за 63 °С та синтезу – 30 с за 72 °С. Флуоресцентний сигнал вимірювали по завершенні стадії синтезу (72 °С) у кожному циклі ампліфікації.

Для виготовлення тест-систем використовували реагенти таких виробників як «Sigma-Aldrich» (США), «Thermo Fisher Scientific» (Литва) та «Metabion» (Німеччина). Як позитивний контроль використовували ДНК штаму *Salmonella enterica* серотипу *Typhimurium* 104 (DT104).

Результати дослідження та їх обговорення. Ефективність заходів щодо профілактики та контролю сальмонельозів залежить від раннього розпізнавання спалахів та їх локалізації. У різних країнах використовують різні схеми виділення і визначення сальмонел. Для цього обирають високочутливі і досить специфічні методи діагностики. Водночас ці методи мають бути простими, швидкими та недорогими. Використання методу ПЛР у діагностиці інфекційних захворювань як бактеріальної, так і вірусної природи має велике значення для вирішення багатьох мікробіологічних і епідеміологічних проблем. Однак метод ПЛР лише доповнює спектр традиційних методів, які використовують у мікробіологічній діагностиці.

Дослідження проводили у лабораторії молекулярно-генетичних досліджень науково-дослідного центру випробувань продукції ДП «Укрметртестстандарт», яка акредитована Національним агентством акредитації України на компетентність відповідно до вимог ДСТУ ISO / ІЕС 17025-21.

Під час розроблення тест-системи було використано технологію *TaqMan* методу ПЛР-РЧ завдяки його високій чутливості, специфічності та швидкості виконання [13]. Розроблена система є мультиплексною, оскільки уможливує проведення двох незалежних реакцій в одній пробірці. Одна реакція направлена на виявлення родоспецифічної ділянки гена *invA* [14], що уможливує детектування представників *Salmonella spp.*, інша – на виявлення фрагмента гена бактеріальної 16S рРНК [15] як ендogenous контролю перебігу ПЛР. Перебіг кожної реакції відстежували за допомогою мічених зондів. Для виявлення послідовності *invA* використовували зонд, мічений флуоресцентним барвником FAM та гасником флуоресценції BHQ1, для гена 16S рРНК – мічений барвником Су5 та гасником флуоресценції BHQ3.

Граничний цикл (Ст) для кожного зразка визначали циклом, за якого кінетична крива флуоресценції перетинала граничну лінію. Базову лінію, що являє собою фоновий рівень

флуоресценції, прилад розраховував автоматично. Пробу розглядали як позитивну на присутність *Salmonella spp.* лише в тому випадку, коли сигнал флуоресценції детектувався за двома каналами (FAM і Cy5), а значення Ct варіювало з 15 по 40 цикл, залежно від кількості матеріалу, взятого для виділення ДНК. Відповідно, пробу розглядали як негативну, коли сигнал детектувався лише за каналом Cy5 (ендогенний контроль), що свідчило про коректне проведення усіх стадій аналізу та відсутність інгібіторів ферментативної реакції в пробі. Якщо флуоресценція була відсутня за двома каналами (FAM і Cy5), проводили повторне дослідження цієї проби зі збільшенням кількості вихідного матеріалу, взятого для виділення ДНК.

Оцінювання ефективності роботи тест-системи, зокрема специфічності, чутливості, межі детектування, повторюваності та відтворюваності результатів аналізу, проводили відповідно до вимог щодо розроблення ПЛР тест-систем з використанням контрольних зразків.

Оптимізацію умов ампліфікації проводили за такими параметрами як температура відпау праймерів, концентрація $MgCl_2$, концентрація та співвідношення праймерів і зондів. Оптимальна температура, за якої підібрані нами праймери найефективніше працювали, становила 63 °С. Найкращі результати було отримано за концентрації $MgCl_2$ 2,5 мМ. Проведення серії реакцій з різними комбінаціями концентрацій праймерів і зондів у межах від 2 до 20 пкМ уможливило досягнення мінімальної величини Ct і максимального значення ΔRn за постійної концентрації матриці-мішені. Оптимальне значення концентрації становило 10 пкМ для праймерів та 5 пкМ для зондів.

Експериментальне визначення специфічності проводили тестуванням ДНК наступних типових штамів: *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. infantis*, *S. agona*, *S. blegdam*, *S. dublin*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii*. Перехресних реакцій при цьому виявлено не було. Всі досліджені штами сальмонел давали винятково позитивний сигнал (100 % специфічність), тимчасом представники інших родів були ПЛР-негативні за цією мішенню. Завдяки близьким філогенетичним взаємовідносинам з сальмонелами, а також асоціацією з харчовими продуктами, ці мікроорганізми спеціально було обрано для тестування специфічності.

Межу чутливості розробленої тест-системи визначали шляхом приготування серії розведень бактеріальної ДНК (від 0,0001 до 100 нг геномної ДНК). Межа чутливості системи за геном *invA* становила 0,01 нг, тимчасом за геном 16S рРНК – 0,001 нг (рис. 1, 2). Отримані результати виявились подібними до даних, описаних у літературних джерелах і отриманих за використання комерційних наборів.

Розроблений діагностикум було адаптовано під прилади найвідоміших виробників (BioRad, Applied Biosystems, Corbett Research, Синтол, ДНК-технологія), якими обладнано діагностичні лабораторії України.

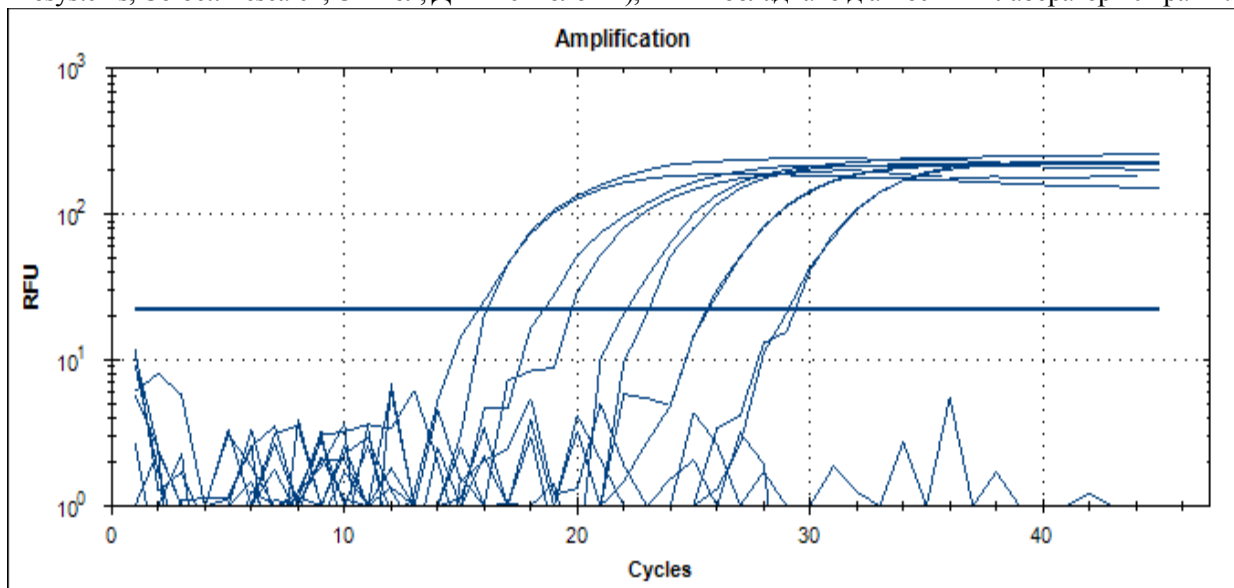


Рис. 1. Графіки ампліфікації десятикратних розведень ДНК бактерій штамів *Salmonella enterica* серотипу *Typhimurium* 104 (DT104).

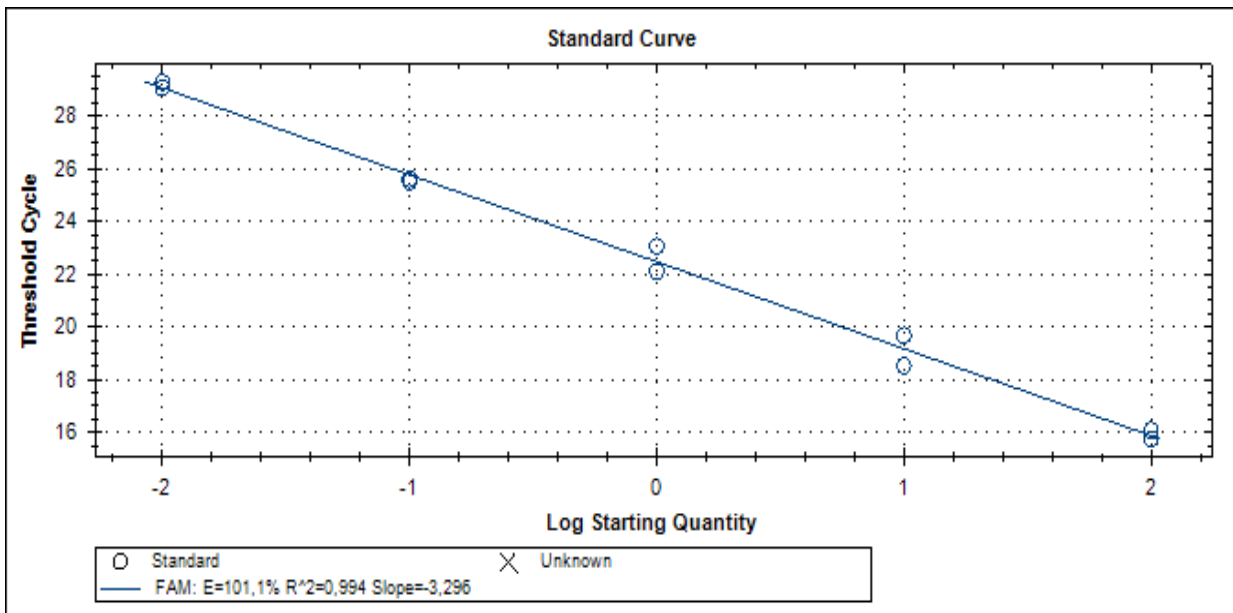


Рис. 2. Калібрувальна крива побудована за десятикратними розведеннями ДНК, що була виділена з бактерій штаму *Salmonella enterica* серотипу *Typhimurium* 104 (DT104).

Висновки. Таким чином, було відпрацьовано умови ампліфікації та запропоновано до використання діагностичну тест-систему на основі методу ПЛР у режимі реального часу, яка дає змогу ідентифікувати представників *Salmonella spp.* у продовольчій сировині та харчових продуктах.

За своїми характеристиками тест-система відповідає вимогам міжнародних стандартів щодо проведення ПЛР-аналізу. Розроблена система значно прискорює проведення аналізів щодо визначення збудників сальмонельозу і може бути запропонована до використання у лабораторній практиці.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Димань Т.М. Безпека продовольчої сировини і харчових продуктів: підручник / Т.М. Димань, Т.Г. Мазур. – К.: ВЦ «Академія», 2011. – 520 с.
2. Никифорова Т.Е. Биологическая безопасность продуктов питания / Т.Е. Никифорова. – Иваново: ГОУ ВПО «ИГХТУ», 2009. – 179 с.
3. Бондаренко В.М. Сальмонеллы – возбудители брюшного тифа и пищевой токсикоинфекции. Руководство по медицинской микробиологии. Кн. 2 // В.М. Бондаренко, А.П. Батура. – М.: БИНОМ, 2010. – С. 461–476.
4. Соколов Д.М. Ускоренные методы выявления бактерий рода *Salmonella* в пищевых продуктах и сырье / Д.М. Соколов, М.С. Соколов // Вопросы питания. – 2013. – Т. 82, № 1. – С. 33–40.
5. Salmonella: A foodborne pathogen / [Pui C.F., Wong W.C., Chai L.C. et al.] // International Food Research Journal. – 2011. – № 18. – Р. 465–473.
6. Подборнов В.М. Бактерии сальмонеллы и сальмонеллезы / В.М. Подборнов, А.М. Подборнов. – М.: БИНОМ, 2010. – 117 с.
7. Сальмонеллы: молекулярные механизмы приспособленности и факторы вирулентности / [Ахметова Д.Г., Бердыгулова Ж.А., Евтыхова Е.Б., Шустов А.В.] // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 1. – С. 3–24.
8. Food-borne diseases – the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge / [Newell D.G., Koopmans M., Verhoef L. et al.] // Int. J. Food Microbiol. – 2010. – Vol. 139 (1). – Р. 3–15.
9. Detection of *Salmonella* species in foodstuffs / A.A. Bhagwat, J. Patel, T. Chua // Methods in Molecular Biology. – 2008. – Vol. 429. – Р. 33–43.
10. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology / [Postollec F., Falentin H., Pavan S. et al.] // Food Microbiology. – 2011. – Vol. 28 (5). – Р. 1–14.
11. Методичні рекомендації щодо використання методу полімеразної ланцюгової реакції в скотарстві / Р.В. Облуп, Н.Б. Новак, М.Д. Мельничук та ін.; за ред. Т.М. Димань. – Біла Церква: Видавництво БНАУ, 2010. – 68 с.
12. Епідеміологічні особливості сальмонеллезів на території Запорізької області / [Поліщук Н.М., Козирева В.Г., Ковязіна Л.С. та ін.] // Запорозж. мед. журн. – 2012. – № 5. – С. 46–48.
13. ПЦР в реальному часі / [Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. і др.]; под ред. Д.В. Ребрикова. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2009. – 223 с.

14. Detection of live *Salmonella* sp. cells in produce by a TaqMan-based quantitative reverse transcriptase real-time PCR targeting *invA* mRNA / [Gonzalez-Escalona N., Hammack T.S., Russell M. et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 75. – P. 3714–3720.

15. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set / [Nadkarni M.A., Martin F.E., Jacques N.A., Hunter N.] // *Microbiology.* – 2002. – Vol. 148 (Pt 1). – P. 257–266.

Определение представителей *Salmonella* spp. методом ПЦР в реальном времени

Р.В. Облап

Разработана тест-система для определения бактерий рода *Salmonella* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR). Система позволяет идентифицировать представителей *Salmonella* spp. в продуктах питания и пищевом сырье. Система адаптирована для проведения анализов на приборах наиболее известных производителей (BioRad, Applied Biosystems, Corbett Research, Синтол, ДНК-технология) и может быть рекомендована к использованию в лабораторной диагностике.

Ключевые слова: *Salmonella* spp., ПЦР в реальном времени, продукты питания и пищевое сырье.

Надійшла 24.10.2013.