

**В. О. УШКАЛОВ**, д-р вет. наук, член-кореспондент НААН,

**О. М. ДЕРЯБІН**

**В. А. КОВТУН**, кандидат ветеринарних наук

**О. В. МАЧУСЬКИЙ**, кандидат ветеринарних наук,

**Т. В. Беглінська**, пошукач

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

## РОЗРОБКА НАБОРУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ДНК БАКТЕРІЙ РОДУ *LISTERIA* МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ «*LISTERIA SPP.* – ПЛР-ТЕСТ»

У статті наведено результати розробки та комісійного випробування діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій роду *Listeria* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Listeria spp.*-ПЛР-Тест», якими встановлено, що зазначений набір є придатним для застосування в діагностичній практиці та може використовуватися як скринінговий метод виявлення бактерій роду *Listeria*. Отримані результати послугували підґрунтям для формування нормативної документації і досьє на «*Listeria spp.*-ПЛР-Тест» та проведенню його державної реєстрації в Україні.

**Ключові слова:** лістеріоз, штами, *listeria*, польові ізоляти, чутливість, відтворюваність, специфічність, реакція, виявлення, діагностика, набір, реєстрація.

Досить широко розповсюджені в навколишньому середовищі бактерії роду *Listeria*. Їх убиквітарність обумовлена полібіотрофією і вираженою стійкістю до несприятливих факторів навколишнього середовища. Вони здатні вегетувати у воді та ґрунтах, досить довго зберігатися на об'єктах неживої природи [1,2,3,4]. Тому, розробка ефективних засобів та способів, направлених на своєчасну діагностику та попередження масового розповсюдження лістеріозу, на сьогоднішній день залишається актуальним питанням ветеринарної науки та практики. Ще починаючи з 90-х років розроблялися та випробовувалися експрес-методи для прискореної діагностики лістеріозу. До них належать імунофлюоресценція, імуноферментний аналіз, моноклональні антитіла, радіоімунологічний метод, ДНК-зонди, ПЛР, проточна цитометрія [5,6].

Є інформація по підбору праймерів ампліфікації фрагменту гену *plcA*, що кодує необхідну для вірулентності *L.monocytogenes* фосфатидилінозитолспецифічну фосфоліпазу; по праймерах, що направляли синтез хромосоми з генами *prfA*, *plcA*, *hly*, що кодують регулюючий білок PrfA, фосфоліпазу PI-PLC та лістеріолізін O відповідно. При аналізі клінічного матеріалу (крові, ліквору, навколоплідної рідини, плаценти) є дані по використанню ПЛР з праймерами на основі послідовностей гену лістеріолізіну O (*hly*) або фосфоліпази (*plcA*) [6,7,8].

Взагалі, метод ПЛР для прижиттєвої діагностики, є важливими при вивченні поширення лістеріоносійства та виявлення скрито хворих тварин [8].

До переваг цього методу слід також віднести високу чутливість та специфічність, крім того його використання суттєво зменшує час аналізу.

Так як, існуючі на цей час вітчизняні засоби не забезпечують здійснення експресного виявлення лістерій в об'єктах ветеринарно-санітарного нагляду, а закордонні аналоги не завжди є доступними, виникла необхідність у розробці специфічного та чутливого діагностичного набору.

**Мета роботи** – розробка та випробування діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій роду *Listeria* методом полімеразної ланцюгової реакції.

### Матеріали і методи:

Розробку засобу для індикації *Listeria spp.* проводили методом полімеразної ланцюгової реакції у відділі молекулярної біології та імунохімії ДНКІБШМ на чотирьохканальному ампліфікаторі «Терцик» НВФ «ДНК-Технологія» (Росія, м. Москва).

ПЛР проводили у три етапи, відповідно до загальноприйнятих методик [9,10].

Розробку набору «*Listeria spp.*-ПЛР-Тест» проводили із використанням 12 польових ізолятів *Listeria spp.*, референтних штамів із Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms і Національного центру штамів мікроорганізмів (*Listeria ivanovii* LMG 11388, *Listeria seeligeri* LMG 11386, *Listeria grayi* LMG 16490, *Listeria murrayi* LMG 16491, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (F-49), *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50), *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) та музейних штамів із Національного центру штамів мікроорганізмів (*Listeria monocytogenes* 92U002, *Listeria innocua* 92U005, *Campylobacter jejuni*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* 19, *Yersinia enterocolitica*), а також із використанням польового матеріалу (фекалії гризунів, кров та виділення із статевих органів вівці, печінка свині), який готували відповідно до методичних вказівок «Лабораторні дослідження у ветеринарній медицині з використанням молекулярно-генетичних методів» [10].

Підбір специфічних праймерів проводили відповідно до літературних даних [11-17].

Паралельно було проведено дослідження щодо відповідності отриманих ізолятів до роду *Listeria* бактеріологічним методом за наступними показниками: морфологічне дослідження мазків, визначення каталазної активності та рухливості культур, культивування на селективних та хромогенних середовищах (рідке середовище Fraser, щільні середовища Oxford та Palcam, щільне середовище L. mono Differential Agar Base).

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

Усі дослідження проводили у трьох повторях.

Визначення чутливості проводили методом постановки ПЛР з використанням зразків, що вміщували різну кількість матеріалу

збудника. При цьому, з суспензії контрольного позитивного зразку робили граничні розведення з висівом на щільні середовища для отримання окремих колоній. Брали розведення з активністю 10, 100, 1000 КУО/см<sup>3</sup>.

Визначення специфічності проводили шляхом постановки ПЛР. Критерієм специфічності вважали наявність відповідних реакцій при використанні позитивних зразків та неспроможність праймерів гібридизуватись з ДНК негативних та гетерологічних зразків, що повинне супроводжуватись відсутністю будь-яких продуктів у цих пробах на електрофореграмі.

Відтворюваність перевіряли шляхом дослідження панелі позитивних, негативних та гетерологічних зразків, яке повторювали три рази.

#### Результати та обговорення:

Для проведення реакції ПЛР була визначена пара праймерів із такими послідовностями: прямий Lprgs-F – 5'-GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG-3', зворотний Lprgs-R – 5'-CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG-3'. Праймери Lprgs-F та Lprgs-R були специфічні консервативній ділянці гена (prgs), який кодує консервативний білок (фосфорибозил-пірофосфат синтазу), спільний для всіх видів *Listeria spp.*, і забезпечували синтез фрагменту ДНК завдовжки 370 п.н.

Надалі проводилися дослідження щодо визначення температурного оптимуму віддалу праймерів Lprgs-F та Lprgs R у діапазоні від 50 до 55 °C, в результаті чого встановлено, що оптимальна температура віддалу праймерів становить 53 °C (табл. 1).

Таблиця 1

Режими проведення етапу ампліфікації

№ циклу	Температура	Час	Кількість циклів
1	95° C	4 хв	1
2	95° C	30 сек	35
	53° C	30 сек	
	72° C	30 сек	
3	72° C	7 хв	1
4	10° C	зберігання	-

Подальша наша робота була пов'язана з вивченням чутливості, відтворюваності та специфічності набору.

Результати дослідження щодо чутливості та відтворюваності відображені в таблиці 2, при цьому усі зразки під час випробування було зашифровано.

При вивченні специфічності розробленого набору встановлено позитивний результат з культурами, що належать до роду *Listeria*, та негативний результат з культурами інших родів та патологічним матеріалом.

Отже, дослідження з перевірки діагностичної системи на відтворюваність, чутливість і специфічність показали, що вона відповідає всім вимогам для якісного проведення досліджу.

Отримані результати досліджень послуговували піддрунтям для формування нормативної документації та досьє на діагностичний набір для виявлення ДНК бактерій роду *Listeria* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Listeria spp.*-ПЛР-Тест» з метою його державної реєстрації в Україні.

Таблиця 2

Результати перевірки чутливості та відтворюваності розробленого набору

Зашифрований номер	Зразки	Результат 1 повтору	Результат 2 повтору	Результат 3 повтору
1	Позитивний контроль <i>L.monocytogenes</i> 92U002	позитивний	позитивний	позитивний
2	стерильна вода	негативний	негативний	негативний
3	розведення контрольного позитивного зразку 10 <sup>-7</sup> <i>L.monocytogenes</i> 92U002	негативний	негативний	негативний
4	розведення контрольного позитивного зразку 10 <sup>-6</sup> <i>L.monocytogenes</i> 92U002	позитивний	позитивний	позитивний
5	розведення контрольного позитивного зразку 10 <sup>-5</sup> <i>L.monocytogenes</i> 92U002	позитивний	позитивний	позитивний

Реєстраційні дослідження проводили комісійно за участю фахівців Державного науково-контрольного інституту біотехнології та штамів мікроорганізмів відповідно до «Методики реєстраційних комісійних випробувань Діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій роду *Listeria* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Listeria spp.*-ПЛР-Тест» з метою його реєстрації на території України», розглянутої і схваленої на засіданні Науково-методичної комісії ДНКІВШМ 18 лютого 2013 року, протокол № 2.

Було перевірено зовнішній вигляд набору на відповідність зазначеним характеристикам та встановлено, що сторонні домішки були відсутні, тріщин флаконів та пробірок не виявлено, на яких зазначені відповідні етикетки.

Наступним етапом дослідження було випробування набору щодо чутливості, специфічності та відтворюваності.

Так, встановлено, що поріг чутливості набору забезпечив детекцію ДНК в зразках, де мінімальна активність становила 100 КУО/см<sup>3</sup> збудника (розведення 10<sup>-6</sup>).

Щодо результатів специфічності візуалізації продуктів ампліфікації не реєстрували при дослідженні гетерологічних зразків ДНК, отриманих із 12 видів бактерій. Показником відтворюваності результатів ПЛР слугувало триразове повторення одержаних результатів із їх збігом в усіх пробах.

Виявлення продукту ампліфікації при проведенні електрофорезу всіх видів бактерій роду *Listeria* відображено на рисунку 1.

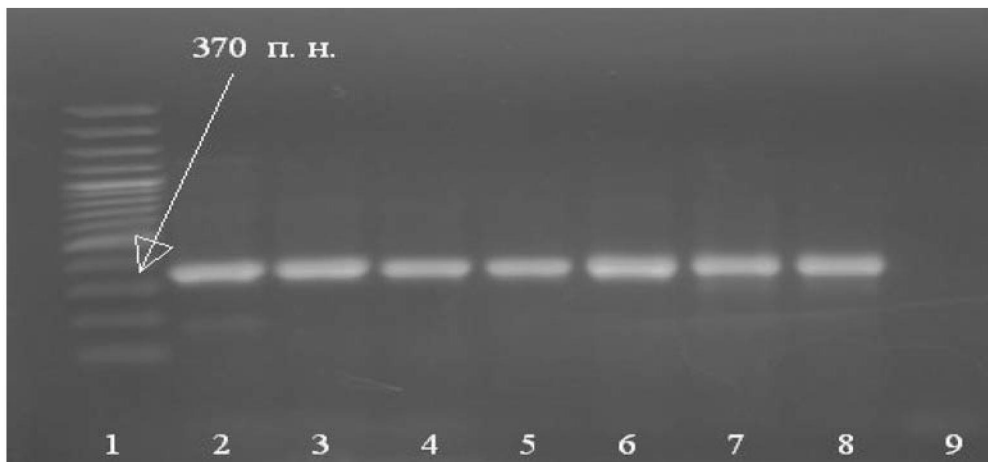


Рис. 2 Електрофоретичний аналіз продуктів ампліфікації фрагменту *prs* гену *Listeria spp.* з праймерами *Lprs-F* та *Lprs-R* (1 – маркер молекулярної маси, 2 – *L. monocytogenes* 92U002, 3 – *L. ivanovii* 0811i, 4 – *L. seeligeri* 0811s, 5 – *L. welshimeri* 0313w, 6 – *L. grayi* 0811g, 7 – *L. innocua* 92U005, 8 – *L. murrayi* 0811m, 9 – негативний зразок)

Отже, результати вивчення чутливості, специфічності та відтворюваності діагностичного набору вказує на те, що підібрані ділянки геному лістерій є консервативними й не мають гомології з іншими видами мікроорганізмів. Отримані результати дали можливість державної реєстрації діагностичного набору для виявлення ДНК бактерій роду *Listeria* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Listeria spp.*-ПЛР-Тест» в Україні, проте необхідно зазначити, що згідно з рекомендаціями Міжнародного Епізоотичного Бюро (МЄБ) використання полімеразної ланцюгової реакції є лише альтернативним способом виявлення лістерій (2012). Важливе значення має той факт, що не всі види роду *Listeria* є патогенними, тому, в разі виявлення позитивних зразків методом ПЛР, обов'язковим є проведення бактеріологічних досліджень з метою виділення патогену та його внутрішньородової диференціації.

#### Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Підібрано праймери для детекції ДНК бактерій роду *Listeria* у полімеразній ланцюговій реакції та експериментально підтверджено доцільність їх використання.
2. Розроблено набір «*Listeria spp.*-ПЛР-Тест», визначено його чутливість та специфічність.
3. Підготовлено нормативну документацію на діагностичний набір для виявлення ДНК бактерій роду *Listeria* методом полімеразної ланцюгової реакції «*Listeria spp.*-ПЛР-Тест».
4. Проведено комісійні випробування розробленого набору та процедуру його державної реєстрації (Реєстраційне посвідчення ВВ-00643-06-13).
5. Перспективними вбачаються дослідження із розробки засобу для внутрішньородової диференціації бактерій роду *Listeria* методом полімеразної ланцюгової реакції. Та його апробація у лабораторних та виробничих умовах.

#### Список використаної літератури:

1. Бакулов И. А. Основные вехи истории изучения листериоза животных и людей / И. А. Бакулов // Листериоз на рубеже тысячелетий : материалы междунар. симп. (18-20 мая 1999 г., Покров). – Покров : ВНИИВВиМ, 1999. – С. 43–47.
2. Сунайкин А. И. Характеристика изолятов *Listeria monocytogenes*, выделенных из разных объектов / А. И. Сунайкин [и др.] // Ветеринария. – 2010. – № 3. – С. 30–32.
3. Goldfine H. *Listeria monocytogenes*: pathogenesis and host response / H. Goldfine, H. Chen. – New York : Springer science, 2007. – 287 p.
4. Liu D. Handbook of *Listeria monocytogenes* / D. Liu. – New York : CRC Press, 2008. – 554 p.
5. Бондар Т. О. Сучасний стан лабораторної діагностики лістеріозу / Т. О. Бондар // Ветеринарна біотехнологія : бюл. – 2006. – № 8. – С. 16–23.
6. Типирование *Listeria monocytogenes* на основе полиморфизма генов факторов патогенности / Т. И. Карпова [и др.] // Клини. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2003. – Т. 5, № 3. – С. 251–258.
7. Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes* / Т. И. Карпова [и др.] // Клини. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2001. – Т. 3, № 3. – С. 266–273.
8. Тартаковский И. С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика / И. С. Тартаковский // Клини. микробиология и антимикроб. химиотерапия. – 2000. – Т. 2, № 2. – С. 20–30.
9. Методичні рекомендації по організації та проведенню робіт у лабораторіях, які використовують метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) / А. М. Головка [та ін.]. – К., 2002. – 18 с.
10. Лабораторні дослідження у ветеринарній медицині з використанням молекулярно-генетичних методів : методичні вказівки / А. Й. Мазуркевич [та ін.]. – К., 2005. – 23 с.
11. Эффект конститутивной активности генов патогенности у *Listeria monocytogenes* / Т. И. Карпова [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 3. – С. 3–8.
12. Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources / L. Cocolin [et al.] // Intern. J. of Food Microbiology. – 2005. – Vol. 103. – P. 167–178.
13. Bauwens L. Detection of pathogenic *Listeria spp.* in zoo animal faeces: use of immunomagnetic separation and a chromogenic isolation medium / L. Bauwens [et al.] // Veterinary microbiology. – 2003. – Vol. 91. – P. 115–123.
14. Churchill R. L. T. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food / R. L. T. Churchill [et al.] // J. of Microbiological Methods. – 2006. – Vol. 64. – P. 141–170.
15. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods / P. Jeyaletchumi [et al.] // Intern. Food Research J. – 2010. – Vol. 17. – P. 1–11.
16. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in foods as determined by quantitative PCR / K. Rantsiou [et al.] // Intern. J. of Food Microbiology. – 2008. – Vol. 121. – P. 99–105.

**РАЗРАБОТКА НАБОРА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК БАКТЕРИЙ РОДА *LISTERIA* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ «*LISTERIA* SPP. – ПЛР-ТЕСТ» / В. А. Ушкалов, О. Н. Дерябин, В. А. Ковтун, А. В. Мачуский, Т. В. Бетлинская**

*В статье приведены результаты разработки и комиссионного испытания диагностического набора для выявления ДНК бактерий рода *Listeria* методом полимеразной цепной реакции «*Listeria* spp.-ПЛР-Тест», которыми установлено, что набор пригоден для применения в диагностической практике и может использоваться в качестве скринингового метода выявления бактерий рода *Listeria*. Полученные результаты стали основой для формирования нормативной документации и досье на «*Listeria* spp.-ПЛР-Тест» и его государственной регистрации в Украине.*

*Ключевые слова: листериоз, штаммы, *Listeria*, полевые изоляты, чувствительность, воспроизводимость, специфичность, реакция, выявление, диагностика, набор, регистрация.*

**THE DEVELOPMENT OF KIT FOR DETECTION BACTERIA *LISTERIA* DNA BY POLYMERASE CHAIN REACTION «*LISTERIA* SPP. – PCR – TEST» / V. O. Ushkalov, O. M. Deryabin, V. A. Kovtun, O. V. Machus'kyi, T.V. Betlinska**

*The article presents the results of the development and commission testing of a diagnostic kit for the detection DNA of bacteria the genus *Listeria* in polymerase chain reaction «*Listeria* spp.-PCR-Test».*

*Disclosed a testing scheme for chosen primers and worked out methods of their use. The results of studying the sensitivity, specificity and reproducibility of the test kit indicates that the selected portions of the genome of *Listeria* are conserved and have no homology with other species of microorganisms. Shown the suitability of a set for use in diagnostic practice and the ability to use as a screening method for detection of bacteria of the genus *Listeria*.*

*The results obtained were the basis for the formation of regulatory documents and dossier to “*Listeria* spp.-PLR-Test”, as well as its state registration in Ukraine.*

*Shown promising research to develop tools for intragenus differentiation of bacteria of the genus *Listeria* by polymerase chain reaction, as well as its place in the diagnostic studies.*

*Keywords: listeriosis, strains, *Listeria*, field isolates, sensitivity, reproducibility, specificity, reaction, detection, diagnostic, set, registration.*

**Рецензент – доктор ветеринарных наук З. С. Клестова.**