
Розділ 2. Бітехнологія

УДК 619:616.34-022-07:636.2-053.2

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИНДИКАЦИИ ДНК САЛЬМОНЕЛЛ И ИДЕНТИФИКАЦИИ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ *SALMONELLA ENTERITIDIS* И *SALMONELLA TYPHIMURIUM* НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Арефьев В.Л.

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

Сальмонеллезы – это группа инфекционных заболеваний, вызываемая различными серовариантами бактерий рода *Salmonella*, характеризующиеся развитием патологий желудочно-кишечного тракта, печени, лимфоидных структур кишечного тракта, развитием септицемии. [1]

Существующие традиционные методы выявления сальмонелл не позволяют быстро и надежно осуществлять индикацию данного возбудителя вследствие длительности и трудоемкости бактериологических исследований. Альтернативу классическим методологиям в системе современной лабораторной диагностики составляют молекулярно-генетические тесты, которые характеризуются высокой чувствительностью, специфичностью и экспрессностью выполнения анализа. Поэтому, для решения проблемы диагностики сальмонеллезов и ветеринарно-санитарной экспертизы при токсикоинфекциях, в настоящее время все шире используются методы молекулярной диагностики на основе полимеразной цепной реакции.

Ранее нами были проведены биоинформатические расчеты и синтезированы следующие пары праймеров для индикации сальмонелл и идентификации сероваров *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium* [2]:

1. Salm3_4 – для *Salmonella spp.*;
2. Sent F_R – для *Salmonella Enteritidis*;
3. Styp F_R – для *Salmonella Typhimurium*.

Целью настоящей работы была разработка методики индикации и дифференциации сальмонелл *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium* на основе полимеразной цепной реакции путем определения её аналитической чувствительности, а также отработка температурного и временного режимов проведения ПЦР с разработанными парами праймеров.

Материалы и методы исследований. Для отработки протокола ПЦР были подготовлены рабочие растворы праймеров с концентрацией 20 пМ/мкл.

В качестве положительного контроля была использована ДНК, экстрагированная из суточных бульонных культур *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium*, выделенная из инaktivированных культур, хранившихся в музее сектора сальмонеллезов и микоплазмозов отдела изучения болезней птиц ННЦ «ИЭКВМ».

Для проведения ПЦР был использован базовый набор реактивов фирмы АмплиСенс (Российская Федерация). На первом этапе наших исследований были подобраны оптимальные температуры отжига праймеров.

Праймеры характеризовались большой разницей в температурах плавления, а, следовательно, и большой разницей в температурах отжига:

- | | | |
|-----------------|-----------------|-----------------|
| • Salm 3 – 69°C | • Sent F – 62°C | • Styp F – 65°C |
| • Salm 4 – 59°C | • Sent R – 67°C | • Styp R – 60°C |

Для определения оптимальных температурных параметров ПЦР, её проводили с различными температурами отжига праймеров: 59°C, 60°C, 63°C и 65°C.

Для определения чувствительности ПЦР реакцию проводили с ДНК-матрицами штаммов *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium* различной концентрации, которую определяли спектрофотометрически при длине волны = 260 нм [4]. Для определения оптической плотности ДНК разводили в 100 раз дистиллированной водой. Количество ДНК определяли по формуле: $C[\text{мг/мл}] = A_{260} \cdot K$, где C – концентрация ДНК, A_{260} – оптическая плотность при длине волны 260 нм, K – коэффициент пересчета (K является константой для растворителя, для дистиллированной воды он составляет 38,1).

Результаты исследований. Температура отжига праймеров является параметром, определяющим, как комплементарность с матрицей, так и специфичность ПЦР. Поэтому, определение корректной температуры является необходимым этапом оптимизации протокола реакции.

При испытании в экспериментальных условиях при различных температурах отжига праймеров при 59°C и 60°C, отмечалась четкая картина видимости ампликона на электрофореграмме на расчетной длине, однако наблюдались параллельно артефакты в виде неспецифических ампликонов, характеризовавшихся длиной, не соответствующей расчетной.

При амплификации с наивысшей тестируемой температурой отжига 65°C, отмечалось полное отсутствие ампликона, что указывало на отсутствие гибридизации праймеров.

Вследствие этого, температуру отжига подбирали в интервале между 60°C и 65°C. Как нами было установлено, оптимальной оказалась температура отжига 63°C, которая и используется нами для дальнейших исследований. При этом происходило образование специфических ампликонов и отсутствовали неспецифические продукты, о чем свидетельствует представленная на рис. 2 электрофореграмма.

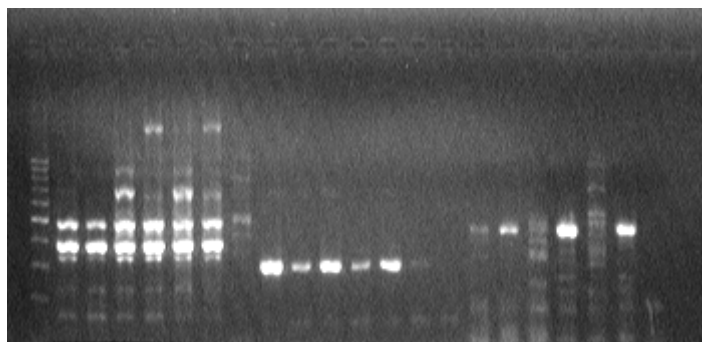


Рис. 1 Результаты ПЦР с праймерами Salm3_4, Sent F_R, Styp F_R, при температуре отжига 59 °С

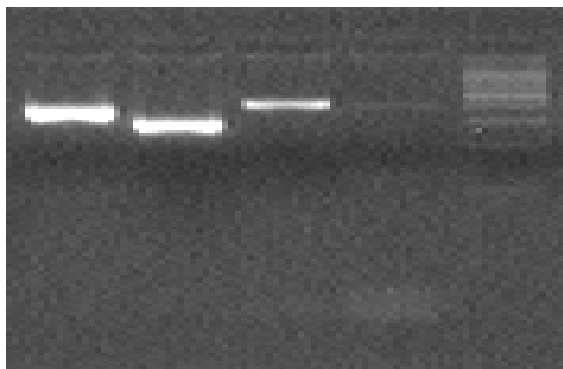


Рис. 2 Электрофореграмма результатов видо- серотипоспецифической ПЦР при температуре отжига праймеров 63°С

Аналитическая чувствительность ПЦР является одним из важнейших параметров реакции, который зависит, в частности, от специфичности праймеров.

Для определения чувствительности ПЦР с праймерами Salm3_4, Sent F_R, Styp F_R, реакцию проводили с образцами ДНК различной концентрации, экстрагированной из суточных бульонных культур.

Начальные концентрации ДНК, определенные спектрофотометрически, составляли:

1. *Salmonella Enteritidis* – 0,304 мг/мл;
2. *Salmonella Typhimurium* – 0,1837 мг/мл.

Далее путем последовательного разведения была получена серия, состоявшая из 8-ми образцов ДНК с концентрациями:

- 10 мг/мл;
- 1 мг/мл;
- 100 нг/мл;
- 10 нг/мл;
- 1 нг/мл;
- 100 пг/мл;
- 10 пг/мл;
- 1 пг/мл.

В результате проведения ПЦР с образцами ДНК *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium* различной концентрации была установлена аналитическая чувствительность реакции с использованием различных пар праймеров:

1. Salm 3_4 – *Salmonella Enteritidis* – 1 нг/мл;
2. Salm 3_4 – *Salmonella Typhimurium* – 100 пг/мл;
3. Sent F_R – *Salmonella Enteritidis* – 10 нг/мл;
4. Styp F_R – *Salmonella Typhimurium* – 100 пг/мл.

Результаты визуализации продуктов амплификации, полученных после постановки ПЦР с использованием ДНК-экстрактов сальмонелл с различной концентрацией бактериальных клеток и, следовательно, геномного материала возбудителя, представлены на рис. 3-6.

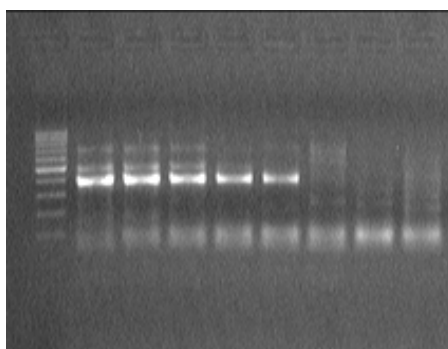


Рис. 3 Электрофореграмма продуктов амплификации, полученных после проведения ПЦР с ДНК *Salmonella Enteritidis* парой праймеров Salm 3_4

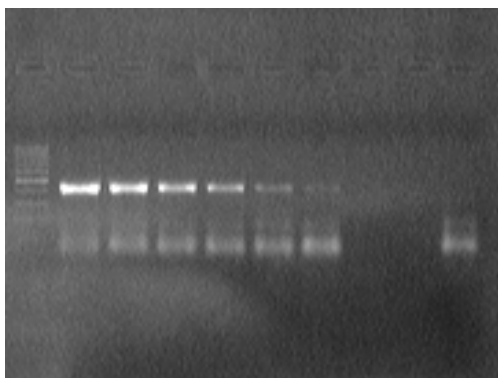


Рис. 4 Электрофореграмма исследования разведений ДНК *Salmonella Typhimurium* в ПЦР с использованием пары праймеров Salm 3_4. Чувствительность реакции определялась до 6-го разведения, что соответствует 100 пг/мл

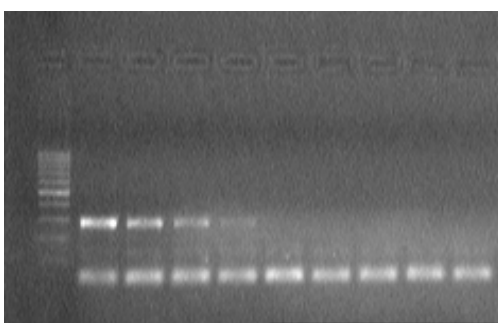


Рис. 5 Электрофореграмма исследований разведений ДНК *Salmonella Enteritidis* в ПЦР с использованием пары праймеров Sent F_R. Чувствительность реакции определялась до 4-го разведения, что составляет 10 нг/мл

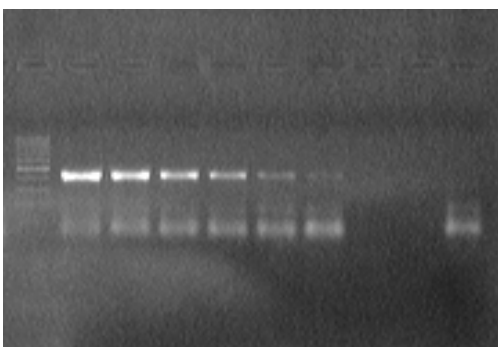


Рис. 6 Электрофореграмма разведений ДНК *Salmonella Typhimurium* в ПЦР с использованием пары праймеров Styp F_R. Чувствительность реакции определялась до 6-го разведения, что составляет 100 пг/мл

При использовании пары праймеров Salm 3_4 образование продуктов амплификации наблюдалось с ДНК *Salmonella Enteritidis* до 5-го разведения и ДНК *Salmonella Typhimurium* до 6-го разведения, что соответствует аналитической чувствительности ПЦР 1 нг/мл для *Salmonella enteritidis* и 100 пг/мл для *Salmonella Typhimurium* (рис. 3 и рис. 4). Наличие интенсивности неспецифических полос на электрофореграмме, представленной на рис. 3, можно объяснить высокой концентрацией ДНК-матрицы.

При использовании пары праймеров Sent F_R образование видимых после электрофореза продуктов амплификации наблюдалось до 4-го разведения, что соответствовало концентрации ДНК сальмонелл 10 нг/мл.

При использовании пары праймеров Styp F_R образование видимых после электрофореза продуктов амплификации наблюдалось до 6-го разведения, что составляло концентрации ДНК сальмонелл 100 пг/мл.

Выводы: 1. В результате проведенной работы была установлена единая оптимальная температура отжига для трех пар праймеров Salm 3_4, Sent F_R, Styp F_R, которая составила 63 °C, что дает возможность использования их для постановки мультиплексной ПЦР для индикации возбудителей рода *Salmonella* и идентификации двух серовариантов *Salmonella Typhimurium* и *Salmonella Enteritidis*.

2. Установлена минимальная концентрация ДНК, необходимая для амплификации с использованием пар праймеров Salm 3_4, Sent F_R, Styp F_R. Разведение с концентрацией ДНК 100 пг/мл соответствует $0,3^{-1}$ аМ или 191 геномной единице в 1 мл исследуемого материала.

Список литературы

1. Борисов, Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология [Текст] / Борисов Л.Б. - М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2001. 736 с.
2. Герілович, А.П. Розробка олігонуклеотидних систем для виявлення сальмонел у біологічних об'єктах [Текст] / Ареф'єв В.Л., Вовк С.І. //Ветеринарна медицина: міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2011. – Вип. 95 – с. 47-49.
3. Зайнуллин Ленар Ильгизарович – Электрофоретические и антигенные свойства полипептидов сальмонелл и идентификация их геномов полимеразной цепной реакцией [Текст]: дисс...канд. биол. наук /Л.И. Зайнуллин – Казань, 2003 - 157с.
4. Маниатис, Т. – Молекулярное клонирование. [Текст] пер. с англ. - А.А. Баева, К.Г. Скрябин

– М.: Мир, 1984. – 480 с. 5. Меркулов, В.А. Методические подходы к определению чувствительности амплификационных наборов реагентов и прогнозированию ожидаемой концентрации возбудителя в биопробах по результатам ПЦР [Электронный ресурс] /Борисевич И.В., Сизикова Т.Е., Мельникова Е.В., Меркулова О.В., Мельников Д.Г., Петров А.А., Пирожков А.П., Лебедев В.Н., Пантюхов В.Б.// Биопрепараты 2010 – № 4[40] – Режим доступа: http://www.biopreparaty-magazine.ru/profit/40_01_6. Яцышина, С. Б. Выявление и типирование возбудителей сальмонеллеза молекулярно-генетическими методами [Текст]: дисс. ... канд. биол. / С.Б. Яцышина. – М., 2003 – 112 с.

DEVELOPMENT OF PCR-BASED TECHNIQUE FOR INDICATION OF SALMONELLAS' DNA AND IDENTIFICATION OF SALMONELLA ENTERITIDIS AND SALMONELLA TYPHIMURIUM SEROVARS

Arefyev V.L.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov

The technique for *Salmonella* genus-specific and *Salmonella* Enteritidis, and *Salmonella* Typhimurium serovariant-specific detection was developed on the basis of polymerase chain reaction. The optimal annealing temperature was determined for three specific primer pairs' (*Salm3_4*; *SentF_R*; *StypF_R*). The analytic sensitivity was determined for PCR with listed oligos use.

УДК 619-616.98:616.682-002

ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОСОРБЦІЇ ТЕРМОСТАБІЛЬНИХ ТА ТЕРМОЛАБІЛЬНИХ АНТИГЕНІВ ШТАМІВ *B. OVIS* 67/Б, 76/982, 156/7807 ТА СПЕЦИФІЧНОГО БРУЦЕЛАОВІСНОГО ПЕРОКСИДАЗНОГО КОН'ЮГАТУ В ІФА

Бабкін А.Ф., Михайлова С.А., Обуховська О.В., Близнецов О.Г., Гончаренко-Прокоф'єва В.В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Інфекційний епідемії баранів (*Brucella ovis* інфекція) небезпечна хронічна хвороба, яка спричиняє суттєві економічні збитки вівчарству багатьох країн. Обраховано, що собівартість збитків від *Brucella ovis* інфекції може перевищувати кошторис утримання неблагополучної отари овець [10]. Барани-плідники відіграють основну роль у розповсюдженні збудника хвороби. У епізоотичному процесі приймають участь також інфіковані вівцематки, які заражають баранів-плідників статевим шляхом у період парувального сезону, а також новонароджених ягнят з молоком. Для виявлення інфікованих дорослих тварин і молодняка застосовують серологічну діагностику. Для діагностики у країнах СНД використовують реакцію тривалого зв'язування комплекменту (РТЗК), реакцію імунодифузії (РІД), алергічну пробу [1, 2, 3]. У країнах ЄС серологічні дослідження на інфекційний епідемії баранів проводять у реакції зв'язування комплекменту (РЗК), реакції імунодифузії (РІД), імуноферментному аналізі (ІФА) [5, 6, 8, 9]. Ефективність серодіагностики залежить від епітопних (специфічних) властивостей антигенів. Згідно рекомендацій МЕВ для серологічної діагностики *Brucella ovis* інфекції рекомендується застосовувати сольовий термоекстрагований очищений антиген із суспензії культури серонезалежного еталонного штаму збудника *B. ovis* REO 198 [5, 6, 7, 8, 9]. В Україні чинними серологічними тестами є РТЗК (Набір компонентів для серологічної діагностики інфекційного епідемії баранів в РТЗК ТУ У 46.15.059-95) та РІД (Набір компонентів для серологічної діагностики інфекційного епідемії баранів в РІД ТУ У 46.15.127-96) з термоекстрагованим антигеном трьох штамів *B. ovis* збудника виділених від клінічно хворих баранів і адаптованих для культивування у поживних середовищах без сироватки і збільшеної концентрації CO₂ в атмосфері [1]. У порівняльних дослідженнях встановлено, що РТЗК і РЗК доповнюють одна одну у діагностиці та проведенні оздоровчих заходів: РЗК – більш специфічна, РТЗК – більш чутлива [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11]. За даними багатьох авторів РІД у діагностиці інфекційного епідемії баранів за чутливістю не поступається РЗК і разом з непрямим ІФА рекомендується для виявлення інфікованих *B. ovis* баранів та проведення оздоровчих заходів [3, 4, 6, 7, 11]. Технологія застосування серологічної діагностики інфекційного епідемії баранів в ІФА відкриває нові аспекти контролювання інфекційного процесу, зокрема, виявлення латентного бактеріоносійства *B. ovis* на основі не тільки термостабільних, але і термолабільних антигенів як імуносорбентів.

Матеріали і методи. У дослідженнях використали *B. ovis* штами 67/Б, 76/982, 156/7807, термоекстрагований антиген для РТЗК, консервованій 0,5 % фенолом, а також моноштамні формолфіксовані, відмиті від формаліну, суспензії антигенів зазначених штамів, пероксидазний кон'югат гамаглобуліну сироватки крові барана інфікованого штамом 67/Б.

У першому досліді конкурентного ІФА (к-ІФА) визначена сорбційна активність імуносорбенту на основі термоекстрагованого антигену *Brucella ovis* («Набір для серологічної діагностики інфекційного епідемії баранів в РТЗК» ТУ У 46.15.059-95). Термоекстрагований антиген для РТЗК розчиняли 1:50 окремо у фосфатно-сольовому буфері (ФСБ) рН 7,4 і карбонатно-бікарбонатному буфері (КББ) рН 9,5, вносили у лунки полістеролової плати і витримували упродовж 16 год. за температури (5,0±1,0) °С, після чого тричі відмивали розчинником ФСБ рН 7,2. У два контрольні ряди лунок з антигеном вносили по 50 мкл фосфатно-сольового розчинника рН 7,2. З метою визначення блокуючої активності антигену у к-ІФА в окремі ряди вносили в розведенні 1:5 нормальну і позитивну контрольні сироватки крові овець зазначеного комерційного набору, а також в розведенні 1:5 чотири сироватки крові від баранів, позитивно реагуючих в РТЗК, з неблагополучної на інфекційний епідемії віцеферми. Плати з реагентами витримували за температури (37,0±0,5) °С в умовах термостату упродовж 30 хвилин. Надалі реагенти реакції тричі відмивали розчинником ФСБ рН 7,2 і вносили специфічний бруцелаовісний пероксидазний кон'югат окремо в розведеннях 1:200, 1:400, 1:800. Плати витримували в термостаті 30 хвилин за температури (37,0±0,5) °С, тричі відмивали реагенти розчинником ФСБ рН 7,2, додавали теобромін-субстрат (хромоген) і витримували 20 хвилин за температури (20,0±1,0) °С. Кольорову реакцію зупиняли стоп-реагенту (8N сірчана кислота) і визначали оптичну екстинкцію забарвлення лунок на спектрофотометрі «Sunrise» в однохвильовому режимі з довжиною хвилі 450 нм.

У другому досліді виготовлені імуносорбенти з формолфіксованих моноштамних антигенів з 3-5 добових агарових культур штамів *Brucella ovis* 67/Б, 76/982, 156/7807, для визначення сорбційної активності корпускулярних формолфіксованих зависей культур *Brucella ovis*, у концентраціях: 2×10⁹, 1×10⁹, 500×10⁶, 250×10⁶, 125×10⁶, 62,5×10⁶, 31,4×10⁶ м.к./см³, у фосфатно-сольовому буфері рН 7,2, в об'ємі 50 мкл. Сорбцію проводили 16 годин в холодильнику (5,0±1,0) °С. Імуносорбент відмивали ФСБ рН 7,2. Для виявлення сорбованих формолантигенів в ІФА застосовували специфічний пероксидазний бруцелаовісний кон'югат імуноглобулінів G, як і в першому досліді у розведенні 1:200.

Результати дослідження. Одержані результати досліджено в ІФА свідчать про достатню активність бруцелаовісного пероксидазного кон'югату гамаглобуліну G розведень 1:200; 1:400; 1:800, з термоекстрагованим антигеном (контроль). Показник оптичної екстинкції кон'югату прямо залежав від ступеня розведення кон'югату і розчинника антигену: ФСБ рН 7,4 – ОЕ 1,2; 0,8; 0,7 або КББ рН 9,5 – ОЕ 1,2; 0,6; 0,3 (рис. 1 і 2). Проте різниця специфічної конкуренції у блокуванні антигену імуносорбенту стандартними нормальною і позитивно бруцелаовісною сироватками був не високим. Негативна стандартна сироватка мала ОЕ 0,8; 0,8; 0,7, а позитивна – 0,6; 0,5; 0,6 в залежності від розведення кон'югату. Досліджені 4 сироватки баранів з господарств блокували бруцелаовісний антиген імуносорбенту значно більше ніж стандартна позитивна сироватка: ОЕ 0,5; 0,4; 0,4 і 0,3 у