

*А. Абжалиева<sup>1</sup>, К.Б. Бияшев<sup>1</sup>, Киркимбаева Ж.С.<sup>1</sup>,  
С.Е. Ермагамбетова<sup>1</sup>, С.С. Кошкимбаев<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Казахский национальный аграрный университет, г.Алматы, Казахстан

## **УСКОРЕННЫЙ МЕТОД ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕНОМНОЙ ДНК**

---

---

**Аннотация.** Внедрение современных стандартизованных схем анализа бактериальных патогенов ознаменует переход системы микробиологического контроля пищевых продуктов на новый научно - методический уровень. Это необходимо для обеспечения новых подходов в системе ветеринарно-санитарного и санитарно-эпидемиологического контроля продовольственного сырья и готовой продукции, в том числе и мясной. Были изучены морфологические, культуральные и биохимические свойства мясной продукции по общепринятым схемам. Возможность использования молекулярно-генетических, иммунологических, биохимических и бактериологических методов в едином диагностическом пространстве обеспечивает выбор оптимальных решений для изучения кишечных пищевых патогенов и повышения эффективности самих исследований. Предложенные методы ДНК-типирования могут быть применимы для проведения мониторинга и создания баз данных о генетических профилях эпидемиологически значимых штаммов пищевых патогенов.

**Ключевые слова:** мясные продукты, энтеробактерии, ускоренный метод индикации, метод ПЦР, биохимический анализ, ветеринарно-санитарный контроль, контроль пищевой продукции.

• • •

**Түйіндеме.** Бактериялардың патогендерін талдаудың заманауи стандартталған схемаларын енгізу азық-түлік өнімдерінің микробиологиялық бақылау жүйесін жаңа ғылыми-әдістемелік деңгейге көшіруді белгілейді. Бірыңғай диагностикалық кеңістіктегі молекулярлық-генетикалық, иммунологиялық, биохимиялық және бактериологиялық әдістерді қолдану мүмкіндігі ішек тамақтарының патогендерін зерттеу және зерттеудің тиімділігін арттыру үшін оңтайлы шешімдерді таңдауға мүмкіндік береді.

**Түйінді сөздер:** ет, ет өнімдері, энтеробактериялар, жедел индикациялау әдісі, ПЦР әдісі, биохимиялық талдау, ветеринариялық-санитариялық бақылау, тамақ өнімдерін бақылау.

**Abstract.** The introduction of modern standardized schemes for the analysis of bacterial pathogens will mark the transition of the microbiological control system of food products to a new scientific and methodological level. This is necessary to ensure new approaches in the system of veterinary-sanitary and sanitary-epidemiological control of food raw materials and finished products, including meat. Morphological, cultural and biochemical properties of meat products were studied according to the generally accepted schemes. The possibility of using molecular genetic, immunological, biochemical and bacteriological methods in a single diagnostic space provides the choice of optimal solutions for studying intestinal food pathogens and improving the effectiveness of the studies themselves. The proposed methods of DNA typing can be used to monitor and create databases of genetic profiles of epidemiologically significant strains of foodborne pathogens.

**Key words:** meat, meat products, enterobacteria, accelerated method of indication, PCR method, biochemical analysis, veterinary and sanitary control, control of food products.

**Введение.** Практика показывает, индикация и идентификация возбудителей инфекций классическими бактериологическими методами связаны с использованием многочисленных селективных питательных сред и различных субстратов. Это делает процесс идентификации длительным и трудоёмким.

Кроме того, выращивание контаминирующих микроорганизмов на различных средах в условиях конкуренции не всегда приводит к адекватным результатам идентификации. Идентификация *in vivo* трансформированных бактерий или искусственно генетически изменённых форм, несущих гены патогенности, неприсущие данному штамму, затруднительна при классическом бактериологическом анализе [1].

Это обосновывает необходимость разработки новых подходов и критериев в системе ветеринарно-санитарного и санитарно-эпидемиологического контроля продовольственного сырья и готовой продукции, на основе создания и внедрения высокочувствительных и эффективных методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа. Внедрение в широкую лабораторную и производственную практику наиболее специфичных, чувствительных и ускоренных методов индикации и идентификации пищевых патогенов имеет большое практическое значение [2,3].

В последние годы для обнаружения и идентификации микроорганизмов в различных объектах исследования стали успешно при-

меняться молекулярно-генетические методы диагностики (иммунно - ферментный анализ (ИФА) полимеразная цепная реакция - ПЦР). Эти методы позволяют проводить индикацию и идентификацию микроорганизмов с высокой специфичностью в присутствии сопутствующей микрофлоры и чувствительностью до единичных клеток.

**Материалы и методы.** Материалом для исследований служили поступившие в убойный цех рынка туши и органы крупного рогатого скота различных категорий упитанности. Животных отбирали по принципу аналогов. Для бактериологического исследования брали различные органы животных.

Первичный отбор культур проводился на основании особенностей роста на средах и микроскопии препаратов из отдельных колоний (МПБ, МПА, МППА, среды Эндо, Плоскирева, Левина, Мюллера, Кауфмана). Первичный отбор культур проводился на основании особенностей роста на средах и микроскопии препаратов из отдельных колоний. У культур изучены морфологические, культуральные, биохимические свойства по общепринятым схемам.

**Результаты исследований.** При диагностике патогенных микроорганизмов методом ПЦР основным рабочим материалом, как уже упоминалось, является ДНК бактерии. Критерием в методах выделения ДНК является то, что нуклеиновая кислота должна быть максимально очищенной от примесей клеточных ДНК и белков. Выделенная геномная ДНК должна быть нефрагментированной, так как она служит матрицей для синтеза специфического продукта.

С целью выявления и идентификации некоторых пищевых патогенов в продуктах животного происхождения проведены исследования по выделению ДНК из клеток микроорганизмов.

Исследуемым материалом для выделения ДНК служили культуры сальмонелл, эшерихии и стафилококков, выделенных из продуктов животного происхождения. В исследованиях по подбору оптимальной схемы выделения ДНК из культур микроорганизмов были использованы следующие методы: детергентно-ферментный метод с использованием додецилсульфата с последующей экстракцией фенол/хлороформом; с применением детергента и последующей экстракцией фенолом; с использованием лизирующего буфера, и с дальнейшей экстракцией фенол/хлороформом; метод кипячения.

### **Выделение геномной ДНК из клеток штамма *Salmonella enteritidis***

Исследуемый штамм *Salmonella enteritidis*, выделенный из мясных продуктов, выращивают в жидкой питательной среде (МПБ). После инкубации (18 ч) культуральную массу в объеме 1 мл суспендируют в 10 мл дистиллированной воды. К полученной суспензии бактерий добавляют равный объем лизирующего раствора с ДСН, тщательно пипетируют и выдерживают при температуре 37°C в термостате в течение 1 ч, время от времени перемешивая содержимое флакона аккуратным покачиванием.

После экспозиции к лизату добавляют 200 мкл хлороформа, перемешивают содержимое флакона, пока не образуется эмульсия. Затем смесь переносят пастеровской пипеткой в герметично закрывающиеся центрифужные стаканы и центрифугируют при 7000 г в течение 5 мин. Отбирают образовавшуюся водную фазу и повторно проводят экстракцию хлороформом в соотношении 1:1. Вновь проводят центрифугирование экстракта.

К извлеченной после последнего центрифугирования водной фазе добавляют 2 мл 96%-го этанола. Полученную смесь тщательно перемешивают и 1 ч экспонируют при -20°C. Осаждают ДНК путем центрифугирования при 7000 г в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок промывают 70%-м этанолом и подсушивают при комнатной температуре.

Осадок ДНК растворяют в буферном растворе (100 мкл ТЕ-буфера (10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0)).

Оценка качества экстрагированной ДНК проведенный методом измерения оптической плотности раствора ДНК в области белкового и нуклеинового спектров поглощения, колебался в пределах 260 и 280 нм. Соотношение оптических плотностей полученных образцов ДНК соответствовало 1,8 - 2,0, при 260/280 нм, что говорит о высокой степени чистоты препаратов ДНК от примесей белков и органических растворителей.

Количество хромосомной ДНК, выделенной из культуры штамма *Salmonella enteritidis* составило 25,2 - 28,8 мкг биомассы микроорганизма.

Для оценки нативности нуклеиновой кислоты растворы ДНК, полученные по указанному способу, в количестве 0,1 мл вносили в лунки 1%-ого агарозного геля, содержащего этидиум бромид 0,5 мкг/мл и подвергали горизонтальному электрофорезу в буфере ТВЕ при напря-

жени 10 В/см в течение 1-2 ч, определяли по наличию светящейся в ультрафиолетовом свете полосы, на расстоянии 0,2-0,5 см от лунки, в которую была внесена проба. Выделений ДНК из клеток сальмонелл можно использовать для последующей ПЦР-амплификации специфических фрагментов микробных ДНК.

### **Выделение геномной ДНК из клеток штамма *Salmonella typhimurium***

Образцы ДНК *Salmonella typhimurium* полученные путем обработки культуральной суспензии детергентом 10%-ым раствором додецилсульфата натрия в сочетании с протеиназой К и с последующей экстракцией фенол/хлороформом были наиболее чистыми и нативными. Применение додецилсульфата натрия не только депротенизирует бактериальную клетку, но также подавляет активность нуклеаз. Клеточные белки удаляли обработкой протеолитическим ферментом – протеиназой К. Для удаления белков и разрыва связей ДНК-белок использовали смесь фенол-хлороформ, который является более сильным средством депротенизации. Отношение оптической плотности ( $E_{260}/E_{280}$ ) полученных препаратов ДНК *Salmonella typhimurium* имело средние значение  $1,93 \pm 0,04$  ( $n=4$ ).

### **Выделение хромосомной ДНК из клеток штамма *Escherichia coli***

Исследуемый штамм *Escherichia coli*, выделенный из мясных продуктов, выращивание и выделение ДНК проводят в тех же условиях, как при выделении ДНК из клеток сальмонелл. Выход ДНК из одинакового количества биомассы составляет 35-36 мкг.

### **Получение образцов ДНК для ПЦР-амплификации из клеток *Staphylococcus aureus***

Клетки бактерий *Staphylococcus aureus*, выделенные из мясных продуктов, выращиваются в бульоне Хоттингера при 37°C в течение 14-16 ч.

Биомассу клеток объемом 10-20 мкл, полученную центрифугированием жидкой суспензии, суспендируют в 200 мкл экстракционного буфера I (4М гуанидинтиоцианат, 50 мМ трис-НСI, рН 8.0, 5 мМ ЭДТА, 0,1М меркаптоэтанол, 0,5% лауроилсаркозина) либо в таком же количестве буфера II (4М гуанидинтиоцианат, 25 мМ цитрат натрия, 0,1М меркаптоэтанол, 0,5% лауроилсаркозила) в 1,5 мл центрифужных пробирках Eppendorf.

Клеточную суспензию кипятят на водяной бане в течение 5 мин.

Клетки осаждают центрифугированием при 12 тыс. об/мин. в течение 30-60 с на центрифуге Eppendorf. Супернатант удаляют.

Клеточный осадок суспендируют в 500-1000 мкл деионизованной (дистиллированной) воды и затем центрифугируют в тех же условиях. Супернатант удаляют. Проводят повторную промывку клеточного осадка 1000 мкл деионизованной воды. Клеточный осадок после второй промывки суспендируют в 200 мкл стерильной деионизованной воды. Количество хромосомной ДНК, выделенной из культуры штамма *Staphylococcus aureus* выращенного на жидкой среде, составляет до 105 мкг. Суспензию геномной ДНК хранят в замороженном (-20°C) состоянии и используют в ПЦР.

**Выводы.** Таким образом, предлагаемые методы позволяют упростить процесс выделения геномной ДНК из бактериальных клеток, выделенных из продуктов животного происхождения, высокой степени чистоты и нативности, которую можно использовать для последующей ПЦР-амплификации специфических фрагментов микробных ДНК.

В перспективе методы ДНК-типирования могут использоваться для мониторинга и создания баз данных о генетических профилях эпидемиологически значимых штаммов пищевых патогенов.

### Список литературы

1. WHO Consultation on Selected Emerging Foodborne Diseases/ Berlin, 20-24 March.-1995.- WHO/CDS/VPH/95.147.

2. *Schmidt K.* Situation of foodborne diseases in Europe// 1992- Proceedings 4th 28. Congress Foodborne Infections and Intoxications. 1998. Vol. 1. - P. 262-266.

3. *Позняковский В.М.* Гигиенические основы питания, качество и безопасность пищевых продуктов/5-е., испр. и доп.- Новосибирск: Сиб.унив. Изд-во, 2007.-456с.

4.Определитель бактерий Берджи. /под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др. 9-е издание. М., Мир, 1997. - 800 с.

5. *Сарсембаева Н.Б.* Автореферат: Ветеринарно-санитарная оценка качества продуктов птицеводства при использовании кормовых добавок цеолитов и пробиотиков// КазНАУ, Алматы – 2005. - с.11

6. *Гладилов М.Ю.* Изучение и разработка морфологических критериев оценки свежести субпродуктов первой категории (печени, почек, сердца) гистологическим методом. Автореферат. М., 2007.- 22 с.

7. *Козак С.С.* Устойчивость листерий к физическим и химическим факторам окружающей среды / С.С. Козак, Н.Л. Догадова, Л.Г. Хан // Мясная Индустрия. 2009.- №7. - С. 18-21.

8. *Комарова И.Н.* Полимеразная цепная реакция современный метод выявления фальсификаций мясного сырья и мясопродуктов / И.Н. Комарова, И.Г. Серёгин, А.Ф. Валихов // Мясная индустрия. - 2004. - №2. - С.34-36.

9. *Костенко Ю.Г., Матвеев О.А.* Производственный контроль основа получения высококачественной и безопасной мясной продукции // Мясная Индустрия. - 2009.- №7. - С. 23-24.

10. *Ю.Г.Костенко, Т.С. Шагова, К.С. Янковский.* Листерии критерий безопасности мясных продуктов // Мясная Индустрия. - 1997.- №3. - С. 23-24

**Абжалиева А.**, докторант PhD

**Бияшев К.Б.**, доктор ветеринарных наук, профессор

**Киркимбаева Ж.С.**, доктор ветеринарных наук, профессор

**Ермагамбетова С.Е.**, кандидат ветеринарных наук, профессор

**Кошкимбаев С.С.**, магистр ветеринарных наук