С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған **«Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру»** атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының **материалдары** = **Материалы** Республиканской научно-теоретической конференции **«Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее»**, посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - **2017. - Т.I, Ч.2. -** С.11-13

ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЭМЕРДЖЕНТНЫХ ПАТОГЕНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ В ПРОДУКТАХ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ И ОБЬЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Бияшев Б.К., *д.в.н., профессор*
Акимжан Н.А., *к.с.-х.н.*
Жуманов К.Т., *PhD, ассистент*
Казахский национальный аграрный университет, г.Алматы

Введение. Современные достижения в области молекулярной клинической диагностики позволили значительно расширить знания о природе патогенности наиболее значимых видов эмерджентных микроорганизмов, однако на этапах первичного выделения этих возбудителей, особенно патогенных энтеробактерий, ведущее место по-прежнему отводится традиционным культурально-биохимическим методам исследования, основанным на применении специально подобранных селективных питательных сред и диагностических наборов для характеристики фенотипических профилей штаммов[1, 2].

Конец второго тысячелетия ознаменовался созданием революционных технологии в различных сферах человеческой деятельности, в частности, в биотехнологии генной инженерии. Наряду с возникновением принципиально новых направлений в медицине, таких как генная терапия и генная фармакология, успешно применяются в практике современных клинико-диагностических лабораторий методы молекулярно-генетического анализа, среди которых, безусловно, первое место занимают полимеразная цепная реакция (ПЦР) и гибридизация ДНК [3, 4].

Ежегодно возрастающее количество видов микроорганизмов, которые могут быть выявлены и идентифицированы с использованием ПЦР, обуславливают актуальность и перспективность применения ПЦР в пищевой микробиологии. Однако ее применение сдерживается на данном этапе следующими обстоятельствами:

-массивная контаминация исследуемых образцов посторонней или технологической микрофлорой, на фоне которой единичные клетки возбудителя не могут быть выявлены без применения специальной технологии подготовки образцов, в том числе: селективное обогащение, концентрирование бактериальных клеток, экстракция амплифицируемой ДНК из пищевых субстратов и др.

-присутствие в термически обработанных пищевых продуктах

инактивированных бактериальных клеток, содержащих амплифицируемую ДНК;

-неоднородность исследуемых образцов по физико-химическому составу, уровню разнообразной микрофлоры требует освобождения пищевых проб от ингибирующих веществ.

Перечень вышеперечисленных проблем находит свое отражение в многочисленных зарубежных работах, посвященных исследованию возможности детекции и идентификации пищевых патогенов с использованием различных модификаций ПЦР- анализа [5, 6].

При постановке ПЦР всегда большое внимание уделяется выбору методов сепарации бактериальных клеток из исследуемого пищевого субстрата, деструкции клеточных стенок, созданию оптимальных условий амплификации и целевому подбору праймеров для индикации наиболее специфичных и информативных участков генома искомого патогена.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов состоит из трёх основных процедур: пробоподготовки, которая в основном сводится к выделению ДНК или РНК; постановки ПЦР и детекции амплифицированного продукта [7].

Основным 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.

Материалы и методы исследования. Материалом для молекулярно-генетического анализа служили культуры сальмонелл, эшерихии, листерии и стафилококков, выделенных из продуктов животного происхождения.

Первичный отбор культур проводился на основании особенностей роста на средах и микроскопах из препаратов из отдельных колоний (МПБ, МПА, МППА, среды Эндо, Плоскирева, Левина, Мюллера, Кауфмана). Идентификация выделенных эмерджентных патогенов проведена по определителю Берджи[6].

Результаты и обсуждение. С целью выявления и идентифицирования некоторых эмерджентных патогенов, выделенных в продуктах животного происхождения и в обьектах окружающей среды нами проведены исследования по выделению ДНКиз клеток микроорганизмов.

Для выделения ДНК исследуемым материалом служили культуры сальмонелл, эшерихии, листерии и стафилококков, выделенных из продуктов животного происхождения.

В наших 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; использование лизирующего буфера, содержащий и с дальнейшей экстракцией фенол/хлороформом; метод кипячения.

Используя вышеуказанные методы нами разработаны следующие способы:

- выделение геномной ДНК из клеток штамма Salmonellaenteritidis.

Способ включает: выращивание исследуемого штамма Salmonellaenteritidis в МПБ, суспендировании, добавления лизирующего раствора, центрифугирование с целью получения осадка ДНК.

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

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

Выделений ДНК из клеток Salmonellaenteritidis можно использовать для последующей ПЦР-амплификации специфических фрагментов микробных ДНК.

- Выделение хромосомной ДНК из клеток штамма Escherichiacoli.

Выращивание культуры Escherichiacoli 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 Staphilococ-cusaureus.

Выделение ДНК из культур стафилококков проводилось с использованием метода кипячения. Количество хромосомной ДНК, выделенной из культуры штамма Staphilococcusaureus составляло 105 мкг. Суспензию геномной ДНК хранили в замороженном (-20°C) состоянии для использования постановки ПЦР.

- Получение интактной геномной ДНК клеток Listeriamonocytogenes.

Выделение ДНК из культур листерий проводилось с использованием лизирующего буфера, содержащей и дальнейшей экстракцией фенол/хлороформом. В ходе пульс-электрофореза полученных нами нативных образцов ДНК L. monocylogenes была выявлена единственная дискретная полоса, соответствующая по своей подвижности нативной хромосной ДНК данного микроорганизма (размер хромосомы L. monocytogenes - около 3000 kb). При фракционировании образцов хромосомных ДНК, обработанных рестриктазойNotI, мы наблюдали восемь дискретных полос, соответствующих макрорестриктам (Notl-рестриктам) ДНК L. monocytogenes. Размер последних варьировал от 1100 до 20 kb. Полученные результаты хорошо соответствовали литературным данным.

- Выделение геномной ДНК из клеток штамма Salmonellatyphimurium.

Выделение ДНК из культур листерий проводилось используя пути обработки кульуральной суспензии детергентом – 10 % раствором додецилсульфата натрия в сочетании с протеиназой К и с последующей экстракцией фенол/хлороформом. Отношение оптической плотности

(E_{260}/E_{280}) полученных препаратов ДНКSalmonellatyphimurium имело средние значение 1,93□0,04 (n=4).

Способом выделения геномной ДНК из клеток микроорганизмов. Поданы заявки на выдачу патентов на изобретение.

Выводы. Предлагаемые методы позволяют упрощенному процессу выделения геномной ДНК из бактериальных клеток, выделенных из продуктов животного просхождения, высокой степени чистоты и нативности, которую можно использовать для последующей ПЦР-амплификации специфических фрагментов микробных ДНК.

Список литературы

1.WHO responds to new challenges in food safety. WHO Newsletter, No 63,March 2000. P.1-2.

2.Тутельян В.А., С.А. Шевелева, Н.Р. Ефимочкина. 8-й доклад Программы ВОЗ по контролю за пищевыми инфекциями и интоксикациями в Европе за 1999-2000 гг. Раздел: Российская Федерация. /FAO/WHO.-Берлин, 2003

3. K.B. Biyashev, B.K. Biyashev, A.M. Makbuz. Prevalence of Causative Agents of Emergent Food Zoonotic Diseases in Animals, Animal Origin Products and Environmental Objects/ Biology and Medicine.Web of Science. ISSN:0974-8369 BLM, anopenaccessjournal. Volume 8.Issue 2. 169-16.

4. Шевелева С.А., Ефимочкина Н.Р. Анализ микробиологического риска как основа для совершенствования системы оценки безопасности и контроля пищевых продуктов. /Мат. X Всероссийского съезда гигиенистов и санитарных врачей, М.: 2007.С.21-24

5. Куликовский А.В. Эмерджентные пищевые зоонозы. //М., 2004, 174 с.

6. Ерусланов Б.В., Баннов В.А., Степаншин Ю.Г., Светоч Э.А. Комплексная тест-система для экспресс-идентификации энтерогеморрагическихэшерихий (включая E. coliO157:H7) в продуктах питания и клиническом материале. //II Московский Международный Конгресс. «Биотехнология: состояние и перспективы развития», 2004, с. 92-93.

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