

На правах рукописи



ПЛУГИНА
Ирина Владимировна

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
РАСПРОСТРАНЕНИЯ ТОКСИГЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ

16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией
и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2004 г

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Научно-исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева (ГНУ НИИПЗК) РАСХН

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
Козловский Юрий Евгеньевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор
Ингизаров Михаил Михайлович

кандидат биологических наук
Семнрасова Алла Николаевна

Ведущая организация: Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П.Коваленко

Защита состоится «27» декабря 2004 г. в 10³⁰ час., на заседании диссертационного совета КРООб.047.53 при Научно-исследовательском институте пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева РАСХН по адресу: 140143, Московская обл., Раменский р-н, п. Родники, ул. Трудовая, д.6.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке института.

Автореферат разослан «26» ноября 2004 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат с-х. наук



Н.Н.Лоенко

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Диарейные заболевания относятся к числу наиболее распространённых среди людей и животных и создают одну из серьёзнейших проблем современной медицины и ветеринарии. Возбудителями диареи могут быть различные микроорганизмы, но чаще всего заболевание вызывается токсигенными энтеробактериями. Заражение происходит перорально. Факторами передачи бактерий являются инфицированные продукты и вода [Guth, Pickett, 1986]. Наиболее восприимчивыми к токсикоинфекциям являются дети младшего возраста и молодняк сельскохозяйственных животных. Диарейные заболевания, вызываемые токсигенными энтеробактериями, широко распространены и в клеточном звероводстве, являясь основной причиной повышенного отхода молодняка пушных зверей и ослабления иммунной системы организма.

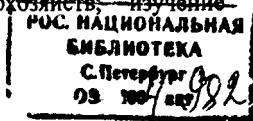
Проблема острых кишечных инфекций до настоящего времени остаётся одной из важнейших в инфекционной патологии пушных зверей. Отмечается возрастающий удельный вес заболеваний, вызываемых бактериями сем. *Enterobacteriaceae*, относящихся к группе условно-патогенных микроорганизмов. Детекция энтеробактерий, продуцирующих термолabileный и термостабильный энтеротоксины, ответственных за диарейный компонент при острых кишечных инфекциях, является одной из важнейших задач, направленных на повышение эффективности диагностики диарейных заболеваний.

Важным этапом борьбы с энтеротоксигенными бактериями является разработка эффективных методов обнаружения как токсигенных микроорганизмов, так и продуцируемых ими токсинов.

Для обнаружения токсигенной микрофлоры используют два принципиальных подхода: либо поиск самого токсина, либо поиск генетических детерминант, ответственных за его продукцию бактериальной клеткой. Стандартный биологический метод, используемый для детекции энтеротоксигенных штаммов, позволяет определить биологически активный токсин. В последнее время широкое распространение получили молекулярно-генетические методы, позволяющие обнаружить генетические детерминанты, отвечающие за продукцию токсинообразования [Moseley et al., 1982]. Такими методами являются ДНК-ДНК гибридизация и полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Всё это делает актуальным как изучение распространения энтеротоксигенных штаммов в патологическом материале, кормосмесях для пушных зверей, объектах окружающей среды, так и разработку методов их обнаружения.

Цель и задачи исследования. Целью данного исследования является изучение распространения генов токсинообразования в популяциях энтеробактерий, изолированных из кормов и патологического материала, полученного от пушных зверей ~~зверохозяйств, изучение частоты~~



встречаемости различных типов энтеротоксинов и проведение сравнительного анализа эффективности методов индикации токсигенной микрофлоры.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Выделить из кормов пушных зверей и патологического материала бактерии, принадлежащие к сем. Enterobacteriaceae и провести их идентификацию.

2. Провести тестирование энтеробактерий на способность к токсинообразованию с использованием биологического метода.

3. Сконструировать биотинилированные зонды на основе фрагментов генов токсинообразования LT, STa и STb для детекции потенциальных возбудителей токсикоинфекций, подобрать оптимальные условия гибридизации и провести скрининг штаммов лабораторной коллекции на наличие генов токсинообразования методом дот-блот гибридизации.

4. Подобрать нуклеотидные праймеры для детекции генов токсинообразования LT, STa и STb методом полимеразной цепной реакции, подобрать оптимальные условия проведения ПЦР и проанализировать коллекцию штаммов, изолированных из кормов и патологического материала, на наличие генов токсинообразования методом ПЦР

5. Провести сравнительный анализ эффективности методов индикации токсигенной микрофлоры.

Научная новизна исследования состоит в том, что:

- впервые изучен с качественной и количественной сторон видовой состав энтеробактерий, изолированных из кормов пушных зверей, и определена частота встречаемости представителей сем. Enterobacteriaceae.

- впервые исследована репрезентативная коллекция штаммов, выделенных из кормов и патологического материала на наличие энтеротоксинов.

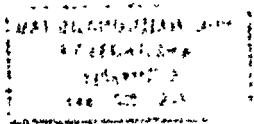
- впервые установлены типы токсинов, встречаемые в кормах и патологическом материале с привлечением самых современных молекулярно-генетических методов.

Практическая ценность состоит в том, что определён видовой состав микрофлоры, обсеменяющей кормосмеси пушных зверей, разработаны методы ДНК-гибридизации на основе сконструированных нами генно-инженерным путём нерадиоактивных зондов для определения генов токсинообразования. При разработке ПЦР-метода для детекции энтеротоксигенных штаммов, нами подобраны праймеры, позволяющие амплифицировать фрагменты ДНК, соответствующие генам LT, STa, STb токсинов энтеробактерий.

Основные положения, выносимые на защиту.

- изучение видового состава энтеробактерий, обсеменяющих кормосмеси пушных зверей,

- разработка молекулярно-генетических методов детекции энтеротоксигенных штаммов на основе ДНК-гибридизации и полимеразной цепной реакции,



- скрининг коллекции энтеробактерий молекулярно-генетическими методами и проведение сравнительного анализа эффективности методов детекции токсигенной микрофлоры.

Апробация полученных результатов. Материалы диссертационной работы были представлены на Междунар. науч.-практич. конференции "Проблемы восстановления и дальнейшего развития клеточного пушного звероводства и кролиководства России", (к 70-летию ГНУ НИИПЗК им. В.А. Афанасьева), 2002г; на 3-rd International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference, Торонто, Канада, 2003г.; на Науч. сессии Россельхозакадемии "Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки в России", (к 100-летию юбилею ВИЭВ), 1998г.; на Междунар. науч.-практич. конференции "Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных" (к 40-летию ВНИИ ветеринарной микробиологии и вирусологии), Покров, 1998г.; на III Общероссийской конференции с международным участием "Гомеостаз и инфекционный процесс", Сочи, 2002г.; на II Московском междунар. Конгрессе "Биотехнология: состояние и перспективы развития", 2003г.; на Междунар. науч.-практич. конференции "Ветеринарная медицина - 2004", Феодосия.

Публикации. Основные материалы диссертации изложены в 14 научных статьях, отражающих основное содержание диссертации.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов, выводы, библиографический список использованной литературы. Работа содержит 14 таблиц, 12 фотографий, 7 диаграмм, 2 схемы. Список литературы включает 294 источника, в том числе 204 иностранных авторов.

Материалы и методы исследования

Работа проводилась в лаборатории генно-инженерных препаратов отдела биотехнологии Государственного научного учреждения Научно-исследовательского института пушного звероводства и кролиководства им. В.А. Афанасьева (ГНУ НИИПЗК) РАСХН.

Штаммы бактерий и плазмиды. Материалом для исследования служили 636 штаммов, выделенных из кормов для пушных зверей, 310 из которых идентифицированы как энтеробактерий; а также 176 штаммов, изолированных из патологического материала.

В работе использовались следующие штаммы: 4 производных штамма ДН 5, несущих плазмиду pLTB с EcoRI-HindIII фрагментом гена субъединицы-В термостабильного токсина, С600; плазмиды: pLT 701, содержащую -elt- оперон, pLTB 701, pLTB 44-полноразмерные гены В субъединицы LT-токсина, pLTA2-полноразмерные гены А- субъединицы термостабильного токсина.

Питательные среды Для культивирования штаммов использовали мясо-пептонный бульон (МПБ), среды Эндо, LB (Luria-Bertani) и дифференциально-диагностические среды для определения энтеробактерий. Соответствующие

плотные среды содержали 1,5% агара. В селективные среды добавляли антибиотики: ампициллин, тетрациклин.

Определение биохимических свойств культур проводилось с использованием следующих сред и тест-реактивов: среда для определения уреазы, среда для определения триптофан-деаминазы и индола, среда для определения лизинкарбоксилазы, среда Фогеса-Проскауэра, среда для выявления сероводорода, среды для определения ферментации лактозы, сахарозы, сорбита, маннита, арабинозы, среда Хью-Лейфсона, цитратный агар Симонса, среда с малонатом натрия, среда с ацетатом натрия, трёхсахарный агар Олькеницкого с мочевиной, среда Кларка, среда с фенилаланином; тест-реактивы для реакции с метиловым красным, реактив Ковача, реактив на триптофан-деаминазу, на ацетоин, на цитохромоксидазу, на бета-лактамазу. Для интерпретации результатов использовали определитель бактерий Bergey Manual of systematic Bacteriology (1984).

Культивирование штаммов для получения биомассы вели в среде LB в условиях активной аэрации на вращающейся платформе (180 об/мин) при 37°C в течение 18 часов до достижения культурой ранней стационарной фазы роста. После наращивания необходимого количества биомассы следовала процедура выделения плазмидной ДНК.

Выделение и очистку плазмидной ДНК из клеток E.coli выполняли методом щелочной денатурации.

Электрофорез ДНК проводили в агарозном геле с бромистым этидием в трис-боратном буфере.

Рестрикцию плазмидной ДНК проводили эндонуклеазами EcoR I, HindIII и Pst I при 37°C в течение 1 часа. Реакционную смесь подвергали электрофоретическому разделению.

Извлечение фрагментов ДНК из агарозных гелей проводили с использованием сорбента GlassMilk, а также фенольно-хлороформной экстракцией из легкоплавкой агарозы.

Генетическую трансформацию E.coli осуществляли используя метод Кушнира [Маниатис и др. 1984].

Введение метки в препараты ДНК осуществляли посредством биотинилирования, используя смесь дезокситрифосфатов dATP, dCTP, dGTP, dTTP, в которой 1/3 часть dTTP заменена на био-11-dUTP. Синтез комплементарной цепи проводили на денатурированной матричной ДНК при помощи фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. Включение био-11-dUTP осуществляли с использованием случайных гексануклеотидных затравок (random - праймирование).

ДНК-ДНК гибридизация с биотинилированными зондами. После нанесения образцов ДНК на нитроцеллюлозные мембраны и фиксации в УФ, проводили предгибридизацию с фрагментированной ДНК спермы лосося (500 мкг/мл) для уменьшения неспецифического связывания зонда с мембраной. Дот-блот гибридизацию проводили при 42°C в течение ночи.

Детекцию результатов гибридизации осуществляли методом связывания биотина с конъюгатом стрептавидин-щелочная фосфатаза с последующей

цветной реакцией с 5-бromo-4-хлоро-3-индолил фосфатом (BCIP) и нитроголубым тетразолием (NBT), осуществляемой щелочной фосфатазой, с образованием нерастворимого осадка.

Полимеразную цепную реакцию проводили по следующему режиму: денатурация - 1 мин. при 94°C, отжиг праймеров - 1 мин. при 54°C, элонгация - 1 мин. 72°C. После прохождения 30 циклов продукты амплификации разделяли электрофорезом в агарозном геле.

Результаты исследований

Выделение штаммов энтеробактерий, контаминирующих кормосмеси для норок

В связи с тем, что предполагаемой основной причиной токсикоинфекций могут быть недоброкачественные и обсеменённые корма, на первом этапе нашей работы мы проводили анализ кормосмесей с целью обнаружения потенциальных возбудителей токсикоинфекций и обобщению данных бактериологических исследований по изучению частоты встречаемости представителей сем. Enterobacteriaceae в кормосмесях пушных зверей и удельного веса энтеротоксигенных штаммов среди изолируемых культур энтеробактерий.

Кормосмесь и пептонную воду, взятую в соотношении 1:10, с 30 минутным шуттелированием и последующим отстаиванием, высевали в последовательных разведениях 10^{-1} - 10^{-7} на плотные среды для количественного учёта микроорганизмов.

Для дальнейшего анализа использовали комплекс селективных дифференциально-диагностических сред, предназначенных для отбора энтеробактерий: селенитовая среда [Leifson E.], среда EE [Mossel D. et al., 1963] в модификации Г. П. Калины (1981), среда Эт-1 [Калина Г. П., 1981], среда для протеев — П-1 [Калина Г. П., 1975], клебсиелл — К-1 [Калина Г. П., 1980], для иерсиний [Ющенко Г. В., Дунаев В. И., 1980], Висмут-сульфит агар, среды с антибиотиками (левомицетин, тетрациклин) для выделения шигелл [Черномордик А. Б., 1957]. Этот метод при всей своей трудоёмкости и высоких материальных затратах не позволил нам получить информацию о видовом составе представителей энтеробактерий в кормосмесях. Такую возможность предоставляло только полное биохимическое исследование всех колоний, выделенных с дифференциальной среды Эндо, с интерпретацией полученных результатов по Bergey Manual of systematic Bacteriology (1984).

Изучение биохимических свойств штаммов и их идентификация

Используя принцип подбора дифференциальных тестов для установления родовой и видовой принадлежности выделенных бактерий, обеспечивающих достаточную достоверность результатов идентификации, мы старались использовать менее трудоёмкие и более экономные методы, поскольку требовалось проскрининговать достаточно большую коллекцию штаммов. Применение быстрого тестирования на грам-принадлежность КОН-методом

[E.Ryu, T.Gregersen,1978], определение цитохромоксидазы и определении типа расщепления глюкозы [Hugh R., Leifson E.] ферментацией в аэробных и анаэробных условиях, позволило нам при первичной дифференциации обозначить представителей сем. Enterobacteriaceae.

Дальнейшая усовершенствованная система идентификации энтеробактерий [Сиволодский, Луканов, 1984] с использованием внесения большого количества инокулята в минимальный объём сред в полистироловых планшетах, позволила определить ряд биохимических свойств, достаточных для определения родовой, а иногда и видовой принадлежности, выделенных из кормов бактерий. С целью уточнения видовой принадлежности, проводили дополнительное тестирование, применяя посевы на среды с цитратом, малонатом натрия, ацетатом натрия, фенилаланина, орнитина, аргинина, что позволило нам установить таксономическую категорию выделенных бактерий.

Полученные результаты, уточнялись с помощью автоматизированной микробиологической системы "Avantag". Применённый комплекс методов дал возможность получить информативные данные относительно уровня обсеменённости кормосмесей $7,8 \pm 2,5$ млн.м.т./1г., причём на долю представителей сем. Enterobacteriaceae приходится 31,3% от общего микробного числа, т.е. обсеменённость кормосмесей энтеробактериями составила в среднем 2,4 млн.м.т/1г. Среди выделенных из корма и проанализированных 636 культур у 310 штаммов, принадлежащих к энтеробактериям, на основе биохимического тестирования определён род, а в некоторых случаях и вид.

Основным критерием качества корма и его пригодности к скармливанию считается общий уровень бактериальной обсеменённости. При этом обычно не учитывался ни видовой состав, ни токсигенность обсеменяющей микрофлоры. На первом этапе исследования мы решили эти проблемы, определив не только общее микробное число в кормосмесях, но и установили видовой состав энтеробактерий.

По результатам идентификации удельный вес бактерий рода *Enterobacter* от общего количества энтеробактерий составляет 31,6%, на долю бактерий рода *Citrobacter* приходится 20,6%, чуть меньше, в 15,5% выделяются бактерии рода *Proteus*, род *Hafnia* в кормосмеси представлен 13,5% , *Escherichia* - 8,1%, *Salmonella*-5,8%, *Serratia* и *Klebsiella* представлены 2 и 1%.

На основе обобщения данных бактериологических исследований по изучению видового состава энтеробактерий кормосмесей установлено, что наиболее часто встречаемыми являются бактерии рода *Enterobacter*, представленного двумя видами - *Enterobacter cloacae* (16,2%) и *Enterobacter agglomerans* (14,4%), *Citrobacter freundii* в 19,2%, *Hafnia alvei* - в 10,8%, *Proteus vulgaris* - в 9%, а *Escherichia coli* 7,2%.

Определение патогенности изолированных штаммов

Биологические методы тестирования

Поскольку одним из основных факторов патогенности возбудителей диарей являются энтеротоксины, целью следующего этапа исследования было определение токсинообразования в штаммах энтеробактерий, изолированных из кормосмесей.

Диагностика энтеротоксигенных штаммов основана на идентификации определённого типа токсинов, термостабильного и/или термолабильного, продуцируемых культурами. Для определения токсигенности сначала использовали методы биологического тестирования, в основе которых лежит реакция организма на вводимый токсин. С этой целью использовали биопробу на мышах.

Изучение патогенных свойств подкожным введением

Подкожное введение 1 мл суточной культуры белым беспородным мышам показало, что среди исследуемых 310 энтеробактерий, принадлежащих к 9 родам - 20 штаммов (6,5%) привело к летальному исходу. Такую активность проявили представители сем. Enterobacteriaceae, идентифицированные до вида: *Salmonella typhi*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Enterobacter cloacae*, а также представители родов *Kluyvera* и *Klebsiella*.

Определение наличия токсинообразования

Определение наличия термостабильного токсина STa

Поскольку термостабильные токсины, в отличие от термолабильных и шигаподобных, являются секретируемыми белками, то для их обнаружения использовали бесклеточные фильтраты культуральной среды.

Активность термостабильного энтеротоксина оценивали в тесте на мышах-сосунках 2-4 дневного возраста [Guanella A.A.]. Пероральное введение 100 мкл пробы, приводило к накоплению жидкости и увеличению массы кишечника, которое мы наблюдали при тестировании лишь у 6 из 310 штаммов, т.е. 2% выделенных из кормов бактерий являются токсигенными. Величина секретируемой как отношение веса кишечника к весу тушек, была положительной ($>0,09$) у следующих представителей сем. Enterobacteriaceae: *Hafnia alvei*, *Salmonella typhi*, *Kluyvera specis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*.

У 19 из 176 штаммов (11%), изолированных из патологического материала и идентифицированных в основном как *Escherichia coli* и в одном случае как *Salmonella typhi*, установлено наличие STa-токсина.

Определение наличия термолабильного токсина LT

Продукцию термолабильного LT-токсина оценивали в тесте отёка лап белых мышей массой 12-14 г, вводя испытуемые фильтраты культуральной среды в

подушечку лапы в объёме 0,05 мл, используя в качестве контроля питательную среду, на которой были получены токсинсодержащие препараты [Dean A.G.]. Величину отёка через 48 часов оценивали по разнице веса правой и левой лап, ампутированных по голеностопному суставу. Установлено, что все бактериальные изоляты дали отёк менее 65 мг, что является отрицательным результатом. Ни один из штаммов, изолированных из кормосмеси не обнаружил способности продуцировать термолабильный энтеротоксин.

Анализируя имеющийся опыт, можно констатировать, что есть противоречивые данные о ценности биологических тестов, т.к. они не одинаковы по чувствительности, воспроизводимости и точности получаемых результатов, весьма трудоёмки и требуют большого количества лабораторных животных. Поэтому сделать окончательный вывод об отсутствии или наличии LT и ST энтеротоксинов в исследуемых культурах не представлялось возможным в связи с недостаточной объективностью биологических методов, и полученные нами результаты рассматривались как предварительные, так как нуждались в подтверждении с помощью других методов.

В связи с этим мы предприняли попытку их поиска с использованием молекулярно-генетических методов тестирования.

Молекулярно-генетические методы тестирования

Конструирование диагностических ДНК-зондов

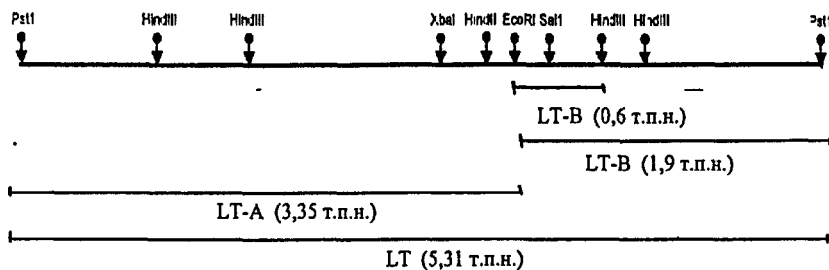
Необходимо отметить существенную разницу в используемых типах методов для определения токсигенности бактерий.

Биометоды основаны на детекции биологически активного токсина, с помощью его можно обнаружить фенотипическую экспрессию генов, кодирующих LT и ST энтеротоксины. Молекулярно-биологические методы позволяют обнаружить сами гены, кодирующие эти энтеротоксины. Диагностические приемы были направлены на выявление последовательностей, несущих гены термолабильного и термостабильного токсинов методом ДНК-ДНК гибридизации с биотинилированными зондами.

На данном этапе основное внимание было уделено разработке способов конструирования ДНК-зондов и применению последних для детекции генов токсинообразования в выделенных и очищенных образцах плазмидной ДНК.

Рис.1

Рестрикционная карта генов LT и стратегия получения зондов



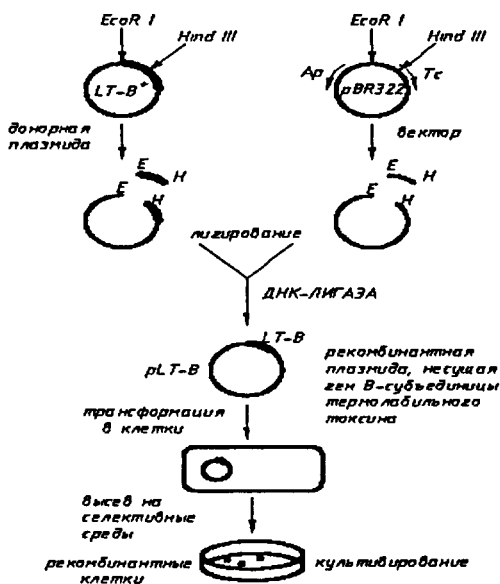
Наиболее перспективной на наш взгляд являлась разработка диагностического приёма с использованием фрагментов ДНК, ответственных за продукцию токсинов. Используя схему расположения сайтов рестрикции на последовательности генов LT-токсина и размер получаемых фрагментов, была разработана стратегия получения фрагментов плазмидной ДНК разных участков генов токсинообразования.

Получение зондов на гены В-субъединицы термолабильного токсина

Клонирование генетических детерминант патогенности является первым этапом на пути создания зондов. В качестве донорских ДНК использованы токсигенные штаммы, выделенные от пушных зверей. При клонировании LT-B фрагмента использовали плазмиды, являющиеся производными плазмиды pLT-B, полученными в лаборатории в ходе работ: плазмиды pLT-B1, pLT-B22, pLT-B31, несущие EcoRI-HindIII фрагменты гена субъединицы В термолабильного энтеротоксина в pBR322; плазмиду pLT-B10, несущую EcoRI-HindIII фрагмент субъединицы-В гена термолабильного энтеротоксина в pUC18.

Рис.2

Схема конструирования рекомбинантной плазмиды pLT-B



Для клонирования фрагментов ДНК использовали в качестве вектора плазмиду pBR322 (4,6 т.п.н.). Молекулярное клонирование EcoRI-HindIII-рестрикционных фрагментов ДНК в составе векторной плазмиды pBR322 осуществляли с помощью эндонуклеазных рестриктаз EcoRI и HindIII, вырезая из исходных ДНК клонируемый фрагмент и линиаризуя кольцевую плазмиду pBR322, молекулы ковалентно сшивали с помощью ДНК-лигазы T4 с

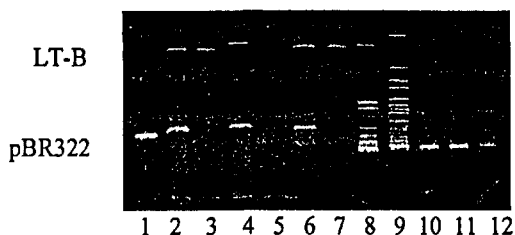
образованием новой рекомбинантной плазмиды. В результате клонируемые фрагменты-гены токсинообразования оказывались интегрированными в структуру вектора. После трансформации клеток реципиентного штамма *E.coli* C600 лигазными смесями, получали устойчивые к ампициллину (Ap^r) трансформанты, поскольку рестриктазы *EcoRI* и *HindIII* не затрагивают область устойчивости к ампициллину в плазмиде pBR322.

Рестрикционный анализ плазмидных ДНК, выделенных из рекомбинантных штаммов, несущих плазмидную ДНК со встроенным геном В-субъединицы LT (размером 0,6kb) и характеризующихся устойчивостью к ампициллину (pLT-B-1, pLT-B-10, pLT-B-22, pLT-B-31), позволил сделать выбор в пользу pLT-B-31.

Плазмидную ДНК подвергали гидролизу рестрицирующими эндонуклеазами *EcoRI* и *HindIII* в течение 1 ч. при 37°C, реакционную смесь разделяли электрофоретически в 1% агарозном геле в ТБЕ. Лёгкий фрагмент, соответствующий гену В-субъединицы LT-энтеротоксина размером 600 п.н., вырезали из геля, элюировали и проводили очистку и осаждение. Контроль чистоты выделенной последовательности ДНК, а также определение концентрации осуществляли посредством электрофореза (фото 3). В качестве маркеров при определении размеров плазмидных фрагментов использовали *HindIII* рестрикты ДНК фага λ и *Eco1301* и *MluI* рестрикты ДНК фага λ.

Рис.3

Электрофорез в 1% агарозном геле рестрикционных фрагментов плазмидных ДНК .



Слева указано местоположение рестрикционных фрагментов.

1- pBR322 по *EcoRI* и *HindIII*; 2 - pLT-B-31 (3), обработанная *EcoRI* и *HindIII*; 3 - выделенный из геля и очищенный фрагмент LT-B-31(3); 4 - pLT-B-31(5), обработанная *EcoRI* и *HindIII*; 6 - pLT-B-31, обработанная *EcoRI* и *HindIII*; 7 - выделенный из геля и очищенный фрагмент LT-B-31; 8 - λ ДНК, рестрицированная *HindIII*; 9 - λ ДНК /*Eco1301*/*MluI*; 10, 11, 12 - λ ДНК 300 нг, 200 нг, 100 нг, соответственно.

Таким образом, используя эндонуклеазы рестрикции *EcoRI* и *HindIII* были получены фрагменты плазмидной ДНК размером 0,6 kb, соответствующие гену В-субъединицы LT-токсина; применяя *PstI* эндонуклеазу, получали фрагмент ДНК, соответствующий генам полноразмерного LT, длиной 5,3 kb. Обработка *PstI* и *EcoRI* позволила получить фрагменты ДНК, соответствующие LT-B (размером 1,9 т.п.н.) и LT-A-субъединичной части токсина (3,35 т.п.н.). Эти фрагменты использовались для получения зондов для ДНК-гибридизации.

Биотинилирование зонда и определение включения метки.

На следующем этапе работы с фрагментами ДНК, содержащими гены токсинообразования, проводили реакцию нерадиоактивного мечения - биотинилирование, используя смесь dNTP дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (150мкл dATP, 150мкл dCTP, 150мкл dGTP, 100мкл dTTP и 50мкл bio-11-dUTP (MBI Fermentas). Для получения зонда с высокой удельной активностью брали в одну реакцию 50-100 нг ДНК. Включение метки осуществляли с применением гексануклеотидной затравки (праймеров). Достраивание цепи, включая меченые биотином трифосфаты, осуществляли фрагментом Кленова в течение 1 ч. при 37°C. Включение биотиновой метки в зонды определяли в реакции связывания биотина с конъюгатом стрептавидин-щелочная фосфатаза. Меченую ДНК выявляли в последующей цветной реакции с 5-бромо-4-хлоро-3-индолил фосфатом (BCIP) и нитроголубым тетразолием (NBT).

В результате опыта было установлено, что используя конъюгат биотин-щелочная фосфатаза удаётся обнаружить до 0,04 нг (40пг) меченого LT-B-зонда.

Реакцию биотинилирования полученных фрагментов проводили при различных условиях. Установлены оптимальные условия включения биотиновой метки для LT-B-зондов - 37°C в течение 1 ч.

Получение зонда на полноразмерный LT-оперон

В качестве донорной ДНК при клонировании LT - оперона использовали плазмиду из штамма Н74114 человеческого типа, несущую гены термолабильного энтеротоксина.

В плазмиду pBR322, используемую в качестве вектора, по сайту рестрикции PstI встраивали гены полноразмерного LT-токсина в области генов устойчивости к ампициллину. Трансформант (шт. pLT-701), несущий рекомбинантную плазмиду со вставкой LT выращивали на среде LB с тетрациклином (20мкг/мл) с целью наработки плазмидной ДНК для получения зонда к LT. Выделение плазмидной ДНК pLT-701 проводили согласно описанным методикам, рестрикцию проводили эндонуклеазой PstI в R+ буфере с БСА при 37°C в течение часа, контролируя полноту прохождения рестрикции электрофорезом в 1% агарозе в ТБЕ.

Из двух близкорасположенных фрагментов ДНК более тяжёлый, соответствующий полноразмерному LT фрагменту размером 5310 п.н., элюировали из агарозного геля и выделяли, используя методику с использованием сорбента GlassMilk (10 мкл сорбента на 5мкг ДНК) с последующей десорбцией ДНК во время инкубирования при 55°C.

Определение чистоты выделенного фрагмента
полноразмерного LT-701.



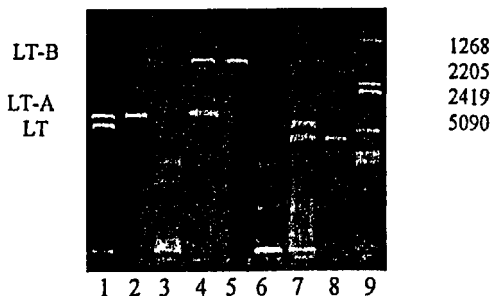
- 1 - плазмидная ДНК ρ LT-701;
2- электрофоретическое разделение рестрикционных PstI- фрагментов;
3- LT-фрагмент после выделения из агарозного геля.

1 2 3

Сайт узнавания для рестриктазы EcoRI находится на границе между генами *toxA* и *toxB*, кодирующими соответствующие субъединицы LT. Рестрикция плазмиды, несущей LT-оперон, одновременно эндонуклеазами PstI и EcoRI с последующим лигированием привела к созданию плазмид, содержащих гены *toxA* и *toxB* в отдельности. По ранее описанной схеме PstI—EcoRI фрагмент плазмиды pLT-A2, несущей A-субъединицу термолabile токсина, был клонирован в pBR322 по сайту PstI - EcoRI; EcoRI-PstI фрагмент плазмиды pLT-B44, несущей фрагмент B-субъединицы LT был клонирован в pBR322 по сайту EcoRI-PstI; PstI-фрагмент ДНК плазмиды pLT-701, несущей полноразмерный LT-токсин, был клонирован в плазмиду pBR322 по сайту PstI.

Рестрикционный анализ плазмиды pLT-A2 с помощью эндонуклеаз PstI и EcoRI показал наличие двух близко расположенных фрагментов: нижний соответствовал вектору pBR322 (4,6 т.п.н.), а верхний - фрагменту A-субъединицы LT размером 3,35 т.п.н., который соответствует по рестрикционной карте гену *toxA*. Электрофоретическое разделение pLT-B44 теми же рестриктазами PstI и EcoRI показало наличие фрагмента LT-B размером 1,96 т.п.н., соответствующее по рестрикционной карте гену *toxB*. Плазмида pLT-701, обработанная рестриктазой PstI, на электрофореграмме проявилась в двух фрагментах, более тяжёлый из которых соответствует полноразмерному LT-токсину размером 5,31 т.п.н. В качестве маркера при определении размеров плазмидных фрагментов использовали MluI рестрикты ДНК фага λ.

Электрофорез в 1% агарозном геле рестрикционных
фрагментов плазмидных ДНК



1- рестрикты pLT-A2 по PstI и EcoRI; 2- выделенный из геля и очищенный фрагмент А-субъединицы; 3-плазмидная ДНК pLT-B44; 4- рестрикты pLT-B44 по PstI и EcoRI; 5- выделенный из геля и очищенный фрагмент В-субъединицы токсина; 6- плазмидная ДНК pLT-701; 7- рестрикты pLT-701 по PstI; 8- выделенный из геля и очищенный фрагмент полноразмерного LT; 9 -λ ДНК /МЫ.

Фрагменты ДНК большого размера (LT-A и LT) требовали иных режимов биотинилирования. Установлены оптимальные условия включения биотиновой метки: для LT-B-зондов - при 37°C в течение 1 ч.; для LT-A и LT реакцию включения метки проводили в течение ночи при 22°C, увеличив в 4 раза dNTP с 1/3 bio-11-dUTP, дополнительно добавляя фрагмент Кленова через час от начала реакции. Используя конъюгат биотин-щелочная фосфатаза удаётся детектировать 1 нг меченого LT -зонда.

Таким образом была получена серия зондов на области кодирования В-субъединицы LT, различающихся размером, область кодирования А-субъединицы, зонд на область кодирования полноразмерного LT-токсина.

При отработке реакции гибридизации было установлено, что короткие зонды LT-B размером 0,6 и 1,9 kb были более эффективны, чем протяжённые зонды LT-A и LT с размерами 3,35 и 5,31 т.п.н., соответственно. Гибридизационные сигналы при формировании комплекса ДНК-зонд-мишень в случае протяжённых зондов наблюдали очень слабые. Полученные нами данные согласуются с утверждениями S.Moseley относительно частичной гомологии протяжённых LT-зондов с анализируемой ДНК.

В качестве диагностического зонда для определения токсигенности коллекции штаммов мы использовали EcoRI-HindIII фрагменты (0,6 т.п.н.). Гибридизация с такими короткими зондами более специфична, чем с протяжёнными и осуществляется быстрее, хотя проигрывает в чувствительности, т.к. в более короткий зонд можно включить не так много молекул-свидетелей.

При конструировании зондов на гены термостабильных токсинов, для клонирования использовали фрагменты ДНК, полученные в результате амплификации генов токсинообразования в ходе полимеразной цепной реакции. Таким образом был получен ряд рекомбинантных плазмид pPStA и pPSTb - термостабильных токсинов первого и второго типов, а также плаزمида pPLST, содержащая фрагмент гена, ответственного за продукцию шипаподобного токсина.

Созданные ДНК-зонды, проверены в реакции гибридизации с выделенной ДНК штаммов, продуцирующих заведомо известные энтеротоксины. Биотинилированные зонды гибридизовались с иммобилизованной на мембранах ДНК с высокой специфичностью - отсутствием ложноположительных сигналов.

В результате подобранных условий для проведения гибридизации с биотинилированными зондами, условий введения метки, иммобилизации ДНК на фильтре, стало возможным тестирование потенциальных продуцентов токсинов ДНК-зондированием.

Оптимизация условий гибридизации

В качестве матриц для связывания ДНК при блот-гибридизации использовали нитроцеллюлозные мембраны (НЦМ), нанося предварительно обработанные кипячением растворы исследуемых нуклеиновых кислот (дот-блоты). НЦМ обрабатывали 0,4М щёлочью и выдерживали в 2х SSC, сводя к минимуму потери ДНК в процессе денатурации. Имобилизацию ДНК на мембране осуществляли УФ лучами.

Гибридизацию проводили в 50% формамиде при 42°C в полиэтиленовых пакетах, герметично запечатывая их нагреванием. Для уменьшения неспецифического прикрепления зонда, мембрану насыщали ДНК лосося, предварительно обработанной ультразвуком для фрагментации до среднего размера 400 п.н. Инкубацию в предгибридизационном буфере проводили в течение 4 часов при 42°C.

В раствор для гибридизации вносили денатурированный меченый биотином зонд в конечной концентрации 50 нг. После завершения гибридизации мембраны подвергали серии промываний растворами SSC+SDS для удаления ДНК-зондов, которые неправильно связались или были некомплементарны искомой последовательности.

Мембраны с ДНК-ДНК-гибридами инкубировали со стрептавидином, ковалентно связанным со щелочной фосфатазой в течение 30 мин., несвязавшийся конъюгат удаляли. Мембраны с гибридизовавшимися ДНК-зондами проявляли хромогенным субстратом - красителем для щелочной фосфатазы, проводя реакцию в темноте для уменьшения фона.

В качестве контроля использовали гетерологичные ДНК. Специфичность гибридизации была высокой: фоновой реакции с гетерологичными ДНК не было. Окраска развивалась в интервале 30мин.-3 ч.

Теоретически гибридизацией можно обнаружить очень малые количества токсигенной плазмидной ДНК, порядка 10 нг. Однако опыт показал, что такого малого количества ДНК недостаточно для сигнала из-за слишком малой скорости гибридизации. Для того чтобы реакция гибридизации протекала с достаточной скоростью, на мембрану должно быть нанесено около 1 мкг плазмидной ДНК.

Изучение распространения генов токсинообразования методом ДНК-ДНК гибридизации

Дот-блот гибридизационный тест, предполагая прямое нанесение нуклеиновых кислот на мембранные фильтры, позволил нам ответить на вопрос есть ли в данном образце искомая последовательность.

В результате зондирования среди энтеробактерий, изолированных из кормосмеси для пушных зверей, обнаружен 1 штамм (к447), несущий в плазмиде ген термостабильного токсина (StA), наличие которого было определено и биометодом на мышах сосунках и подтверждено молекулярно-генетическим методом ДНК-ДНК-гибридизацией. Генов кодирующих

образование термолabileного энтеротоксина (LT) не обнаружено ни в одном из 310 исследованных штаммов, выделенных из кормосмеси.

Использование метода гибридизации оказалось более эффективным по сравнению с биопробой и позволило обнаружить в группе штаммов, изолированных из патологического материала 32 токсигенных штамма из 176 исследованных культур, что составляет 18,2 %. Среди них 17 штаммов (9,7%) имели в составе плазмидной ДНК гены только термолabileного токсина LT, 3 штамма - только термостабильного токсина I типа STa , 4 культуры - гены только термостабильного токсина II типа STb. Кроме того 6 штаммов несли на плазидах гены двух типов токсинов : STa+ STb (4 штамма) и LT+ STb (2 штамма). Сочетание сразу трёх типов генов токсинообразования LT+ STa+ STb установлено у 2 штаммов.

Табл.1

Частота выявляемости различных генов токсинообразования и их комбинации в штаммах, изолированных из патологического материала, определённая методом ДНК-гибридизации с зондами на LT, STa, STb.

Тип генов токсинообразования	Количество штаммов	от токсигенных в %, (n=32)	от выделенных в %, (n=176)
LT	17	53,1	9,7
STa	3	9,4	1,7
STb	4	12,5	2,3
STa+ STb	4	12,5	2,3
LT+STb	2	6,25	1,1
LT+ STa+ STb	2	6,25	1,1
<i>Всего токсигенных</i>	32		18,2

В результате работы на основе клонированных фрагментов ДНК, соответствующих генам LT, STa и STb получены зонды, которые позволили в dot-блот гибридизационном тесте определить наличие в исследуемых образцах генов токсинообразования.

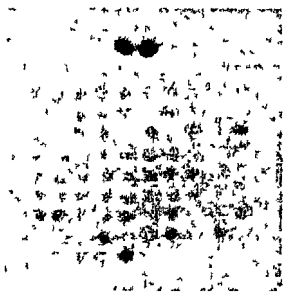
Определение шигаподобных токсинов SLTI и SLTII методом гибридизации с радиоактивным зондом.

На наличие шигаподобных токсинов SLTI и SLTII было проверено у 486 штаммов, выделенных из кормосмесей для норок и патологического материала. В качестве ДНК-зонда был использован HindIII фрагмент внутренней части гена SLT E.coli H19. Фрагмент получен из плазмиды VP101, несущей ген SLTI.

После гибридизации нитроцеллюлозной мембраны с иммобилизованными образцами ДНК с меченым ($\alpha^{32}P$) ник-трансляцией зондом, мембраны экспонировали в течении 24 часов и регистрировали результаты на рентгеновском снимке.

На фильтрах с ДНК исследуемых штаммов в реакции гибридизации с радиоактивно меченым зондом положительного свечения не наблюдалось, за исключением нескольких штаммов, которые показали сигнал, чуть превышающий фон. Гибридизационный анализ культур показал отсутствие

шигаподобных энтеротоксинов I и II типов (SLTI и SLTII) в исследуемой коллекции штаммов.



Разработка метода полимеразной цепной реакции для детекции генов токсинообразования у энтеробактерий

Анализ первичных последовательностей и подбор праймеров

Первым этапом нашей работы было получение олигонуклеотидных праймеров. В большинстве случаев использования ПЦР именно нуклеотидная последовательность праймера и его концентрация определяют успех реакции, поэтому подбор условий для проведения ПЦР являлся определяющим этапом в анализе плазмидных ДНК.

При разработке тест-системы нами были определены пары олигонуклеотидных праймеров на области последовательностей генов LT и ST. В случае термолабильного энтеротоксина (LT) мы использовали информацию о первичной нуклеотидной последовательности *elt*-оперона, детерминирующего LT ДНК у *Escherichia coli*, штамм HI0407, опубликованной Т. Yamamoto. Для подбора праймеров на термостабильные энтеротоксины STa и STb использовали информацию об их сиквенсах, имеющуюся в международном банке последовательностей ДНК.

При выборе праймеров были учтены рекомендации относительно длины - 18-28 н.п., отсутствия комплементарности между 3'-концами во избежание их димеризации. На регион LT-гена R-праймер с последовательностью 5'-t-gtc-aac-ctc-tga-ctg-ata-gt-3' соответствовал позиции 728-748 гена термолабильного токсина, L-праймер имел последовательность 5'-gag-tac-ttc-gat-aga-gga-act-3', соответствующую последовательности нуклеотидов в положении 139-159, состоял из 21 п.н. Праймеры ориентированы таким образом, что синтез, осуществляемый Taq-полимеразой протекал только между ними, увеличивая количество копий участка ДНК, соответствующего LT-гену. Поскольку праймеры физически включаются в концы продукта реакции, амплификат по длине составлял расстояние между 5'-концами праймеров на участке ДНК.

Праймеры для амплификации STa-участка ДНК имели следующие 5'-3' последовательности: atg-cca-tgt-tcc-gga-ggt и ccc-ggt-aca-agc-agg-att соответственно и состояли из 18 оснований и соответствовали позициям 475-492 и 688-705.

При амплификации гена, кодирующего STb, применяли 21-звенные праймеры: atc-gca-ttt-ctt-ctt-gca-tct и aa-acg-tgc-aac-cat-tat-ttg-c. Во всех случаях праймеры вносили по 1мкл., т.к. при более высокой концентрации происходит неспецифический отжиг праймеров и накопление неспецифического продукта.

Оптимизация условий проведения полимеразной цепной реакции

Для полимеразной цепной реакции лимитирующими являются ряд условий. В первую очередь - это концентрация ионов Mg^{2+} , затем значение pH, температура и временные параметры различных циклов амплификации. Варьируя этими параметрами мы установили, что оптимальными в данном случае являются первоначальная денатурация образцов ДНК при 95°C в течение 5 мин., концентрация дезокситрифосфатов dNTP 240 мкМ, pH 8,4, оптимальное количество образца ДНК-Юнг, MgCh - 20 мМ, Taq- полимеразы в концентрации 2,5 ед. на 100 мкл реакционной смеси.

Температурный режим ПЦР был следующим: 94°C - 1 мин. (денатурация), 54°C - 1 мин. (отжиг праймеров), 72°C - 1 мин. (элонгация). После 30 циклов амплификации реакционные смеси инкубировали при 72°C в течение 5 мин. для завершения достройки.

В качестве отрицательного контроля использовали плазмидную ДНК не содержащую LT, STa или STb гомологичных последовательностей и реакционную смесь без добавления ДНК, прошедшую цикл ПЦР. В качестве положительного контроля использовали рестрикты плазмидных ДНК токсигенных штаммов.

Различия в молекулярной массе ПЦР-продуктов позволили дифференцировать с помощью стандартного электрофореза в 2 % агарозном геле амплификаты, соответствующие генам термостабильного (610п.н.) и термостабильного токсинов I и II типов (232 и 242 п.н.).

При проведении амплификации в изложенных условиях, наблюдался синтез фрагментов ДНК, соответствующих LT, STa или STb, что свидетельствует о специфичном взаимодействии праймеров с плазмидной ДНК энтеробактерий.

Изучение распространения генов токсинообразования методом ПЦР

После установления возможности индикации энтеробактерий на наличие генов токсинообразования методом ПЦР, коллекция штаммов, состоящая из 310 энтеробактерий, принадлежащих к 9 родам и выделенных из кормосмесей, и 176 штаммов, изолированных из патологического материала, была исследована этим молекулярно-генетическим методом.

При тестировании штаммов ПЦР-методом, наблюдалась сходная с результатами ДНК-гибридизации картина. Среди штаммов, выделенных из кормосмесей, обнаружена одна токсигенная культура (штг. к447), идентифицированная как E.coli и имеющая в составе ДНК гены термостабильного токсина I типа.

Из числа штаммов, изолированных из патологического материала, 28 культур было идентифицировано токсигенными, что составляет 15,9 % от всех бактерий этой группы.

Табл.2

Частота выявляемости различных генов токсинообразования и их комбинации в штаммах, изолированных из патологического материала, определённая методом ПЦР с праймерами на гены LT, STa, STb.

Тип генов токсинообразования	Количество штаммов	от токсигенных в %, (n=28)	от выделенных в %, (n=176)
LT	9	32,1	5,1
STa	4	14,3	2,3
STb	3	10,7	1,7
STa+ STb	4	14,3	2,3
LT+ STb	4	14,3	2,3
LT+ STa+ STb	4	14,3	2,3
Всего токсигенных	28		15,9

Окончательная оценка токсигенности выделенных штаммов была установлена в некоторых случаях из подтверждающего сочетания методов биологического тестирования (внутригастральной пробой на ST и тестом отёка лап мышей на LT токсины), позволяющих определить активность продуцируемого штаммом токсина, и молекулярно-генетических методов (ДНК-ДНК гибридизация на LT, STa, STb, SLT со структурными генами для этих энтеротоксинов, а также методом ПЦР на гены LT, STa, STb), указывающих на наличие генов токсинообразования, а у некоторых штаммов только на основе молекулярно-генетических тестов, как наиболее достоверных.

Результаты исследования были сведены в таблицу 3, отражающую информацию об общем количестве положительных результатов тестирования на токсигенность методами, применяемыми в данном исследовании.

Табл.3

Результаты определения токсигенности культур биологическими и молекулярно-генетическими методами.

Группа штаммов	Кол-во шт.	Биометод		Молекулярно-генетические методы						
		LT	STa	ДНК-гибридизация				Полимеразная цепная реакция		
				LT	STa	STb	SLT	LT	STa	STb
Выделен. из кормосмеси	310	0	6	0	1	0	0	0	1	0
Выделен. из пат. материала	176	0	9	20	9	14	0	17	11	15

Данные, полученные при исследовании штаммов, изолированных из кормов оказались неожиданными. Один штамм, типированный как *Escherichia coli*, нес на плазмиде ген термостабильного энтеротоксина STa. Результат подтверждён тремя методами: биотестом на мышцах-сосунках, методом ДНК-

ДНК гибридизации и методом полимеразной цепной реакции. Термолabileный токсин LT и шигаподобный токсин SLT в штаммах не обнаружены.

Штаммы, отнесённые к родам сем. Enterobacteriaceae Kluyvera, Hafnia, Salmonella, Escherichia, Enterobacter, Citrobacter, определённые как продуценты термостабильных токсинов на основании биопробы, не получили подтверждения ни одним из молекулярно-генетических методов. Возможно, эти штаммы и содержат какие-либо другие токсины, но гомологии с известными термостабильными токсинами не установлено.

Наличие единственного токсигенного штамма из 310 исследованных, противоречит существующему мнению о роли кормов как источнике распространения диарейных заболеваний у пушных зверей. Возможно такое низкое содержание токсигенной микрофлоры в кормах (0,3%) можно объяснить потерей микроорганизмом ряда функций, связанных с его вирулентностью при существовании в абиотических условиях. Тем более что элиминация плазмид, кодирующих гены токсинообразования, вне макроорганизма наблюдается и при культивировании токсинпродуцирующих штаммов в лабораторных условиях.

Табл.4

Сравнение распространённости токсинообразования в различных группах энтеробактерий

	Группа штаммов	
	выделенные из кормов пушных зверей	выделенные из патологического материала
исследовано штаммов	310	176
из них токсигенных	1	25
% токсигенных	0,3	14,2
установленные типы генов токсинообразования	STa	LT, STa, STb

Иная картина наблюдается среди штаммов, изолированных из патологического материала. По результатам определения биотестом и подтверждающими молекулярно-генетическими методами идентифицировано 25 токсигенных штаммов, типированных как *Escherichia coli* и одного штамма, принадлежащего к виду *Salmonella typhi*. Процент токсигенных культур от всех бактерий этой группы составляет 14,2. Из них обнаружено 7 штаммов (4%) - продуцентов термолabileного токсина. У 14 культур (8%) обнаружено продуцирование термостабильных токсинов, причём 6 из них несут на своей плазмиде гены только STa (3,4%), 4 штамма - только STb (2,3%), а 4 культуры способны продуцировать сразу два типа термостабильных токсинов STa+ STb (2,3%). Также установлено, что среди штаммов, изолированных из патологического материала, есть культуры, одновременно несущие гены термостабильного и термолabileного токсинов LT+STb (1,1%) и даже трёх типов генов токсинообразования LT+STa+STb (1,1%). Представителей, способных продуцировать шигаподобный токсин, за исключением контрольных, ни в кормах, ни в патологическом материале не обнаружено.

Возможно, шигаподобные токсины не играют в патологии пушных зверей такой существенной роли, как в патологии человека.

Результаты тестирования, отражающие наличие одного, двух или трёх генов токсинообразования в одном штамме, представлены в следующей табл.

Табл.5

Частота встречаемости генов токсинообразования и их комбинации в штаммах, изолированных из патологического материала, на основе сочетания методов исследования (биотест, ДНК-гибридизация, ПЦР)

тип генов токсино-образования	количество штаммов	% от токсигенных (n=25)	% от выделенных (n=176)
LT	7	28	4
STa	6	24	3,4
STb	4	16	2,3
STa+ STb	4	16	2,3
LT+ STb	2	8	1,1
LT+ STa+ STb	2	8	1,1
Всего токсигенных	25		14,2

Сравнительное изучение информативности методов детекции токсигенности бактерий показало, что в ряде случаев результаты тестирования штаммов биометодом и гибридизацией не совпадали, и метод ПЦР стал определяющим в установлении наличия генов токсинообразования.

Полученные данные позволяют сделать определённые выводы в использовании методов для определения энтеротоксигенных штаммов. Так, метод на мышцах-сосунках, несмотря на разработанные более совершенные методы, продолжает оставаться популярным в определении термостабильного токсина у энтеробактерий, поскольку он позволяет исследовать активность токсина, продуцируемого штаммом. Однако количество вырабатываемого клеткой токсина зависит от ряда причин, в том числе и от копияности оперона токсигенности, и не всегда может быть детектировано биометодом. Низкая эффективность биопробы связана и с субъективностью подхода, где результат зависит от неподдающихся контролю факторов, как то физиологическое состояние экспериментальных животных, их возраст, наличие специфических антител. Применение молекулярно-генетических методов, основанных на определении нуклеотидных последовательностей токсинообразования в ДНК, значительно упрощает проблему.

Ложно-положительные результаты, полученные биометодом, как было отмечено, уточнялись ДНК-зондами, которые гибридовались лишь в тех образцах, где были соответствующие последовательности. 72 % культур, проявивших активность в биометодом как STa-продуценты, не нашли подтверждения молекулярно-генетическими методами, т.е. не содержали соответствующих генов.

Анализ результатов, полученных при использовании двух современных методов блот-гибридизации и ПЦР в определении STa, свидетельствует о высокой сходимости данных: результаты детекции совпали в 83,3 %.

В определении СТб-токсинпродуцентов методом гибридизации и ПЦР разногласий не наблюдалось в 70,6 %. В 2 случаях наличие гибридизационных сигналов не были подтверждены наличием амплификата, что, возможно, объясняется влиянием субъективной оценки при визуализации блотов или усилением фона при проявлении окраски. В 3 штаммах ПЦР-метод определил наличие генов токсинообразования, что не удалось сделать зонду.

Ряд случаев, когда молекулярно-генетические методы показали наличие последовательности, кодирующей токсин, а сам токсин биометодом не тестировался, доказывает высокую чувствительность и избирательность ПЦР и гибридизации, позволяющих фиксировать "спящие" гены токсинообразования, не экспрессирующие продукцию токсина, либо уровень продукции ниже порогового для биометода.

Положительные данные, полученные методом гибридизации с клонированным зондом, в 48 % (12 из 25) подтвердились наличием полосы, соответствующей генам LT-токсина при электрофоретическом разделении продуктов амплификации.

Сопоставляя эффективность различных методов тестирования токсигенной микрофлоры, следует отметить, что каждый из них имеет свои определённые преимущества, поэтому проблему детекции энтеротоксигенных штаммов наиболее достоверно может решить комплекс диагностических приёмов.

Разработка методов быстрой и точной диагностики имеет большое значение, особенно для массового скрининга. ПЦР позволяет работать с малым количеством материала и получить результаты в объективной форме, используя электрофорез в агарозном геле, что даёт меньший процент ошибки в детекции, а также позволяет работать с деградированными образцами, некультивируемыми формами микроорганизмов и токсинами, находящимися в неактивной форме. Молекулярно-генетические методы являются достаточно точными, т.к. основаны на анализе участков ДНК, кодирующих синтез энтеротоксинов, и не зависят от уровня продукции токсинов штаммами.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о необходимости проведения молекулярно-генетического анализа, особенно ПЦР, при диагностике токсигенной микрофлоры.

Результаты научных исследований позволили разработать «Регламент применения ПЦР-диагностикума для определения токсигенных эшерихий, продуцирующих цитотонические токсины» (обсуждено и одобрено на секции пушного звероводства Россельхозакадемии, протокол №4 от 18.07.2000г).

Выводы

1. Качественный и количественный анализ бактериальной обсеменённости свежеприготовленного корма для пушных зверей показал обсеменённость в пределах 7,8 млн. микробных тел на 1 г корма.

На долю энтеробактерий приходится 31,3%, которые представлены следующими родами: Enterobacter - 31,6%, Citrobacter - 20,6%, Proteus - 15,5%,

Hafnia - 13,5%, Escherichia - 8,1%, Salmonella - 5,8%, Serratia - 2%, Kluyevera-2%, Klebsiella - 1 % .

Наиболее часто встречаемыми в кормах являются бактерии рода Enterobacter (31,1%), причём из них отмечаются 2 вида - Enterobacter cloacae (16,2%) и Enterobacter agglomerans (14,4%), а также Citrobacter freundii -19,2%, Hafnia alvei - 10,8%, Proteus vulgaris - 9%, Escherichia coli - 7,2%.

2. Установлено, что в абиотических условиях признак токсинообразования встречается редко. Из 310 штаммов, выделенных из кормов, достоверная токсигенность определена для одного штамма (STa), что составляет 0,3 %, в то время как у штаммов, выделенных из патологического материала, обнаружено 25 токсигенных культур, что составляет 14,2 %, причём на долю LT-продуцентов приходится только 4 % штаммов, STa -продуцентов - 3,4 %, STb - 2,3% , имеют оба гена термостабильного токсина STa+ STb 2,3% штаммов, 1,1% - сочетание генов LT+STb, а 1,1% - сочетание трёх генов токсинообразования LT+ STa+ STb в одном штамме.

3. Методами ДНК-ДНК гибридизации и ПНР показано отсутствие генов, кодирующих шигаподобные токсины I и II типов, как в кормосмесях, так и в патологическом материале, изолированном от пушных зверей.

4. Сравнительный анализ эффективности различных методов обнаружения токсигенных бактерий и продуцируемых ими энтеротоксинов показал, что наиболее объективным и точным является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), который можно рекомендовать при исследовании кормов и патологического материала.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Козловский Ю.Е., Хохлова О.А., Костюнина Н.А., Давыдова Л.И., Плугина И.В., Магомедова А.Д. Использование биплазмидных систем экспрессии при создании субъединичных вакцин//Вопросы физико-химической биологии в ветеринарии: Сб. науч. тр. Моск. гос. акад. вет. медицины и биотехнологии, им. К. И. Скрябина, 1997, с. 76-78.
2. Козловский Ю.Е., Давыдова Л.И., Плугина И.В., Гришина Л.Е., Чертович Н.Ф. Два подхода к созданию генно-инженерных вакцин. // Всероссийская научно-практическая конференция "Проблемы пушного звероводства и кролиководства" (к 65-летию НИИПЗК). 23-25 июня 1997, с.87-88.
3. Козловский Ю.Е., Плугина И.В., Давыдова Л.И., Магомедова А.Д. Распространение способности к токсинообразованию у штаммов энтеробактерий, выделенных в звероводческих хозяйствах. // Всероссийская научно-практическая конференция "Проблемы пушного звероводства и кролиководства" 23-25 июня 1997. Родники М.О., с.85-86.
4. Козловский Ю.Е., Плугина И.В., Серебряков С.Н., Магомедова А.Д., Емельяненко П.А., Козловская Г.В. Сравнительный анализ эффективности различных методов индикации токсигенной микрофлоры.// Научная сессия Россельхозакадемии "Состояние, проблемы и перспективы развития ветеринарной науки в России" (к 100-летию юбилею ВИЭВ): Сб.науч.тр.ВИЭВ, Москва, 16-17 июня, 1998, с.300.

5. Козловский Ю.Е., Серебряков С.Н., Плугина И.В., Магомедова А.Д., Емельяненко П.А., Козловская Г.В. Изучение эффективности различных методов индикации токсигенной микрофлоры.// Международная научно-практическая конференция "Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных" (к 40-летию Всероссийского НИИ ветеринарной микробиологии и вирусологии): Сб.науч.тр., Покров, 1998.
6. Емельяненко П.А., Хмель И.А., Козловский Ю.Е., Плугина И.В. Об ингибирующей активности микроцинов к энтеробактериям. // "Сельскохозяйственная биология", 2001 г, №4.
7. Козловский Ю.Е., Серебряков С.Н., Плугина И.В., Барановская О.П., Матевосян К.Ш., Тихонова Н.Б., Ефимов Б.А. Генетико- иммунологические особенности LT-подобных токсинов энтеробактерий./ Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии. Сб.науч.тр./ НИИ морфологии человека РАМН, 2002, с. 100-102.
8. Козловский Ю.Е., Плугина И.В., Серебряков С.Н., Барановская О.П., Тихонова Н.Б. Анализ токсигенности штаммов энтеробактерий, изолированных в зверохозяйствах России.// Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук, 2002, №3, с.44-46.
9. Козловский Ю.Е., Плугина И.В., Серебряков С.Н. Распространение токсинообразования в популяциях энтеробактерий.// III Общероссийская конференция с международным участием Томеостаз и инфекционный процесс". Сочи, 2002, с.50.
10. Плугина И.В. Обсеменённость кормов пушных зверей энтеробактериями. // Международная научно-практическая конференция "Проблемы восстановления и дальнейшего развития клеточного пушного звероводства и кролиководства России" (к 70-летию ГНУ НИИПЗК им.В.А.Афанасьева). Сб.науч.тр./18-19 июня 2002, с. 116-117.
11. Kozlovsky Yu.E., Plugina I.V., Baranovskya O.P. Test-systems on the basis of PCR for diagnostics of toxicoinfection of far animals.// 3-rd International Veterinary Vaccines and Diagnostics Conference./ 2003 г, Торонто, Канада.
12. Плугина И.В., Козловский Ю.Е., Барановская О.П., Серебряков С.Н., Тинаева Е.А. Молекулярная диагностика токсикоинфекций.// II Московский международный Конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития" /10-14 ноября 2003, с.256.
13. Плугина И.В., Козловский Ю.Е., Барановская О.П., Матевосян К.Ш., Серебряков С.Н., ПЦР анализ для обнаружения токсигенной микрофлоры.// Междунар. научно-практическая конференция "Ветеринарная медицина - 2004", Феодосия. Меж. тематический науч. сборник, 2004, №84.
- Н. Тихонова Н.Б., Плугина И.В., Емельяненко П.А., Тинаева Е.А., Балакирев Н.А., Серебряков С.Н., Козловский Ю.Е., Матевосян К.Ш. Препараты с антитоксической активностью на основе резидентной микрофлоры.// Междунар. научно-практическая конференция "Ветеринарная медицина - 2004", Феодосия. Меж. тематич. науч. сборник, 2004, №84, с.857- 860.

Практические предложения

1. На основании проведенных исследований разработан «Регламент применения ПЦР-диагностикума для определения токсигенных эшерихий, продуцирующих цитотонические токсины», который был обсужден и одобрен на заседании секции пушного звероводства и кролиководства Россельхозакадемии (протокол № 4 от 18 июля 2000 г.). ПЦР-диагностикум может быть использован в исследовании патологического материала, кормов и объектов окружающей среды.

2. Материалы диссертации могут быть использованы в научных целях, при составлении учебных и справочных пособий, чтении лекций и ведении лабораторных занятий по курсу генетики микроорганизмов.

#24531