Для корреспонденции

Ефимочкина Наталья Рамазановна – кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории санитарно-пищевой микробиологии и микрoэкологии ГУ НИИ питания РАМН
 Адрес: 109240, г. Москва, Устьинский пр-д, д. 2/14
 Телефон: (495) 698-53-83

Н.Р. Ефимочкина

Молекулярно-генетические методы в идентификации пищевых патогенных бактерий

ГУ НИИ питания РАМН, Москва

Приведен обзор зарубежной и отечественной литературы о применении современных молекулярно-биологических методов в пищевой микробиологии. Перечислены наиболее часто применяемые для анализа пищевых бактериальных патогенов методы, основанные на анализе нуклеиновых кислот: ДНК-гибридизация, методы полимеразной цепной реакции (ПЦР), включая ПЦР в реальном времени. Изложены основные преимущества и недостатки различных модификаций ПЦР-методов, а также проблемы их применения при анализе пищевых продуктов. Показана необходимость разработки критериев и методологии стандартизации ДНК-исследований пищевых продуктов и патогенных микроорганизмов, выделенных из пищи, в целях гармонизации генетических методов с действующей системой микробиологического нормирования и контроля.

Molecular-genetic analysis of foodborne pathogens

N.R. Efimochkina

The review of the modern foreign and national publications on application of modern molecular and DNA-based analysis in food microbiology is given. Most frequently used nucleonic acids-based assays for foodborne pathogens, including DNA-hybridization, conventional PCR and real-time PCR are listed. The basic advantages and lacks of PCR-techniques also problems of their application are stated at the analysis of foods. Necessity of development of criteria and methodology of standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens is shown, with a view of harmonization of genetic methods with existing system of microbiological requirements and control.

Конец второго тысячелетия ознаменовался созданием революционных технологий в различных сферах человеческой деятельности, в частности, в биотехнологии и геномной инженерии. Возникновение принципиально новых направлений в медицине привело к внедрению в практику современных клинико-диагностических лабораторий методов молекулярно-генетического анализа, среди которых первое место занимают полимеразная цепная реакция (ПЦР) и гибридизация ДНК. Эти методы позволяют не только выявить наличие и установить этиологическую роль возбудителя в возникновении инфекционной патологии, но и расшифровать природу патогенности, которая генетически заложена в исследуемом микроорганизме.

Осветить все возможные варианты существующих методов ДНК-диагностики весьма затруднительно вследствие их большого числа и интенсивного развития этой области. Без преувеличения можно сказать, что развитие технологии манипулирования с наследственной информацией сравнимо по темпам роста с микроэлектроникой и информатикой и нередко эффективно сочетается с ними.

Преимущество методов ДНК-анализа состоит в их высокой специфичности, поскольку выявление генотипических признаков по определенным участкам нуклеотидных последовательностей генома не зависит от физиологического состояния, степени выраженности метаболических

свойств бактериальной клетки и условий культивирования микроорганизма. Однако, если при использовании молекулярно-генетических методов для целей клинической диагностики не требуются выделение и наращивание культуры возбудителя, то для выявления микроорганизмов из пищевых продуктов или объектов внешней среды необходимы специальные подходы. Одна из ключевых проблем анализа – отработка оптимальных условий подготовки и обогащения исследуемого материала для накопления бактериальных клеток в количестве, необходимом для индикации ДНК и обнаружения возбудителя в исследуемой пробе.

Скорость накопления биомассы микроорганизмов на этапе предварительного обогащения зависит от многих факторов, связанных со сложным составом пищевых продуктов, широким диапазоном их физико-химических свойств, присутствием в среде культивирования искусственных или естественных селективных агентов. Важным условием эффективного применения методов ДНК-диагностики в пищевой микробиологии является интеграция новейших достижений в этой области с традиционными методами анализа.

Разработка комплексных схем выделения и идентификации бактериальных патогенов, включающих наряду с бактериологическими и иммунологическими тестами методы молекулярно-генетического анализа нового поколения, позволит повысить эффективность лабораторной диагностики и станет приоритетным направлением в развитии методической базы микробиологических исследований пищевых продуктов.

Методы ДНК-гибридизации

Основа всех современных генетических методов – гибридизация, т.е. взаимодействие комплементарных цепей нуклеиновых кислот. Первые сообщения о применении ДНК-диагностики, а именно гибридизации нуклеиновых кислот со специфическими зондами, появились в середине 70-х годов XX столетия [5]. Эти методы быстро вошли в практику диагностической лабораторной службы многих стран. Вместе с тем на первых этапах широкое применение ДНК-гибридизации сдерживалось необходимостью использовать в работе токсические органические соединения и радиоактивные изотопы. В значительной степени эти трудности были преодолены к началу 80-х годов прошлого века, когда на рынке диагностических средств появились тест-системы, в которых были использованы методы нерадиоактивной детекции результатов и подготовки проб, не требующие применения токсических веществ.

В микробиологии методы ДНК-гибридизации имеют наибольшее значение для идентификации бактериальных патогенов с помощью генных зондов, позволяющих судить о присутствии или отсутствии определенных генов. Эти методы отличают-

ся от большинства биохимических и иммунологических тестов, которые базируются на определении продуктов генов – таких, как антигены или конечные продукты метаболических реакций [4, 33].

Поскольку геном каждого микроорганизма содержит уникальные видоспецифичные нуклеотидные последовательности, подобрав к ним соответствующие зонды, можно идентифицировать любой из патогенных микроорганизмов. Зонды, используемые для их обнаружения, могут иметь разное происхождение, но в любом случае они должны быть специфичны в отношении генетического материала тех микроорганизмов, которые предполагается обнаружить. Для этого создают видоспецифичные зонды, или зонды, комплементарные уникальным последовательностям в геноме данного патогена. Генные зонды представляют собой молекулы нуклеиновой кислоты (наиболее часто двухцепочечные ДНК) и состоят либо из целого гена, либо из его участка с известной функцией, полученного клонированием фрагментов генома патогенного микроорганизма. Протяженные зонды одноцепочечной ДНК можно получить путем транскрипции *in vitro* [4]. При этом альтернативно могут быть синтезированы короткие участки одноцепочечной ДНК – так называемые олигонуклеотидные зонды, основанные на нуклеотидной последовательности известного гена. Для определения комплементарных ДНК- или РНК-мишеней используются как природные, так и синтетические нуклеотиды.

В основе ДНК-методов лежат гибридизация участка генома с комплементарным к определяемой последовательности меченым олигонуклеотидным зондом и последующая детекция гибридного комплекса, что позволяет существенно повысить специфичность анализа и делает возможной максимальную стандартизацию процесса, за счет чего практически исключается субъективность оценки. В зависимости от типа метки зонда (производные флюорохромов типа флюоресцеина, гаптены и т.п.) реализуются различные способы детекции результатов гибридизации (прямое измерение флюоресценции или хемолуминесценции, иммуноферментный анализ). Важными преимуществами методов гибридизации являются также минимальное количество манипуляций в пределах каждого этапа анализа, возможность автоматизации и совместимость приборов для детекции с программным обеспечением по статистической обработке результатов, что делает гибридные технологии весьма перспективными с точки зрения их интеграции в традиционные схемы микробиологического анализа.

Тесты ДНК-гибридизации могут выполняться различными способами:

- **гибридизация на колониях** – перенос колоний с селективной среды на твердую подложку: нейлоновые или нитроцеллюлозные фильтры, лизис клеток

и фиксации высвободившейся ДНК на фильтрах; гибридизация иммобилизованных нуклеиновых кислот с ДНК-зондами, меченными изотопами или ферментами, и детектирование метки путем преципитации красителя или радиографией [29, 42, 46];

- **гибридизация ДНК/РНК *in situ* (ГИС)** – используется для прямого выявления нуклеиновых кислот в клеточных структурах микроорганизмов. В отличие от гибридизации на твердых подложках этот метод позволяет локализовать нуклеотидные последовательности и идентифицировать самые разные микроорганизмы в культурах тканей и клеток, а также в гетерогенных бактериальных сообществах [2, 7, 12]; для гибридизации *in situ* используют как изотопно меченные зонды, так и неизотопные метки (биотин, дигоксигенин);

- **блот-гибридизация ДНК**, включающая этапы фракционирования исследуемой ДНК в агарозном геле с использованием ферментов рестриктаз и электрофореза, переноса полученных фрагментов ДНК на мембранные фильтры (саузерн- или нозерн-блоты), и собственно гибридизацию иммобилизованных молекул со специфичными зондами [8]. Одним из вариантов этого метода можно считать риботипирование патогенных бактерий [16, 56];

- **ДНК/РНК-гибридный захват (*hibrid capture*)** – принцип этого метода основан на иммунохимической детекции продуктов гибридизации нуклеиновых кислот РНК/ДНК или ДНК/РНК моноклональными антителами, узнающими образующиеся дуплексы; если происходит детекция бактерий или ДНК-содержащих вирусов, то используется рибоолигонуклеотидный зонд. Если выявлению подлежат инфекционные агенты, содержащие рибонуклеиновые кислоты, используют ДНК-зонд [5];

- **метод гибридизации с использованием разветвленных зондов (*bdNA*)** – пример амплификационных технологий, позволяющих в ходе определения усиливать сигнал; в результате многоступенчатого процесса гибридизации происходит присоединение многочисленных зондов, конъюгированных с молекулами фермента, окисляющего специальный субстрат и запускающий таким образом хемолуминесценцию [5];

- **гибридизация на ДНК-чипах**, которая заключается во взаимодействии комплементарных цепей ДНК-пробы с расположенными в определенном порядке известными ДНК-мишенями (зондами), иммобилизованными на поверхности стекла или кремния. Результат детектируется по флюоресценции зонда, предварительно меченого флюорофором и гибридизованного с одной из иммобилизованных проб; использование микроэлектроники Nanogen позволяет активно перемещать (электронная адресация) и концентрировать заряженные молекулы в специфическом сайте на полупроводниковом микрочипе. Технология находит применение при анализе неизвестной заряженной биологической молеку-

лы, способной специфически связываться с известными молекулами на микрочипе; электромагнитная адресация применяется как на стадии иммобилизации ДНК-проб на кремниевую подложку, так и на стадии гибридизации [9].

В целях идентификации пищевых бактериальных патогенных микроорганизмов часто используют метод гибридизации бактерий на колониях [33, 46]. После инкубации образец (отпечаток) колонии переносится на мембранный фильтр, клетки лизируют комбинации высоких значений рН и температуры для денатурации и прикрепления ДНК к матриксу; иммобилизованная ДНК-мишень на подложке инкубируется с зондом, меченным ³²P или ферментом. Не связавшаяся с зондом ДНК (с невосстановленной двойной спиралью) удаляется отмытием при соответствующей температуре и концентрации соли. Радиоактивный ДНК-зонд детектируется при экспозиции рентгеновской пленки, помещенной поверх подложки, результаты учитывают по появлению пятен там, где клетки несут тот же ген, что и зонд. Если используется зонд, меченный ферментом, то добавляется хромогенный субстрат, в присутствии которого образуются цветные пятна, соответствующие числу бактериальных клеток, несущих ген мишени в исследуемой пробе.

Определяющими этапами метода гибридизации являются выбор мишени и конструирование генного зонда. Если определяют специфическую таксономическую группу, зонд должен быть направлен к гену или области гена, которые являются консервативными для определенных видов или рода микроорганизмов. Для детекции эмерджентных бактериальных патогенов необходимо выбирать специфические генетические детерминанты патогенности, ответственные за проявление конкретных свойств микроорганизма в инфекционном процессе (табл.1).

Например, с использованием клонированных *stx1*- и *stx2*-генов разработаны и созданы ДНК-зонды для детекции *E. coli*, продуцирующих шигаподобные токсины. В течение ряда лет эти зонды широко применялись для прямого скрининга колоний STEC, образующихся при посеве образцов фекалий на селективные среды для первичного выделения *E. coli* [52]. Серотип-специфичный олигонуклеотидный зонд PF-27 для детекции энтерогеморрагических эшерихий O157:H7 создан на основе мутантного гена *uidA*, присутствующего в *E. coli* данного серотипа и связанного с отсутствием фермента β-D-глюкуронидазы, который кодируется исходным геном *uidA* у других серотипов *E. coli* [25]. Наиболее достоверными в последние годы признаются методы генетической идентификации культур, основанные на выявлении кодируемых признаков патогенности или анализе последовательностей рибосомальной ДНК (16S, 23SpPHK). Более 25 лет назад методы, связанные с анализом рибосомальных РНК или генов, кодирующих 16SpPHK (16SpДНК), совершили революцию в

систематике прокариот. Из 3 типов молекул рРНК (5S, 16S, 23S) для построения филогенетических схем используют в основном данные по нуклеотидному составу 16SpРНК. Размер генов у 16SpРНК прокариотов составляет примерно 1550–1640 нуклеотидов, и определение полной последовательности этих генов в настоящее время не представляет методических сложностей. Филогенетические построения на основе анализа генов 16SpРНК стали неотъемлемой частью интегрированного «полифазного» подхода при описании бактериальных таксонов [3]. Данные по нуклеотидным последовательностям 16SpРНК представителей практически всех известных родов и множества видов бактерий имеются в соответствующих базах данных, например РБД Национального центра биологической информации США [44].

Анализ материалов, накопленных в течение нескольких десятилетий, показал высокую степень корреляции между результатами ДНК-гибридизации близких по фенотипическим характеристикам штаммов бактерий. Исходя из оценки хорошо изученных видов, считают, что уровень ДНК-гибридизации $\geq 70\%$ характеризует организмы одного вида, $10\text{--}60\%$ – одного рода, уровень $\leq 10\%$ – разных родов. Отмечены высокая степень разрешения этого метода при определении сродства между микроорганизмами на надвидовом уровне и его ограниченность при видовой идентификации. Поэтому для определения меж- и внутривидового сходства в последние годы стали применять данные анализа нуклеотидных последовательностей ITS-области генома (ITS-внутренний транскрибируемый регион), расположенной между генами, кодирующими 16SpРНК и 23SpРНК [3].

Несколько модификаций метода ДНК-РНК-гибридизации (с использованием тест-систем «GeneProbe», «Europrobe» и др.) широко применяются за рубежом

для исследований пищевых бактериальных патогенов. Так, в США они являются официально рекомендованными FDA/CFSAN для идентификации *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* и др. [33], в Европе – сертифицированы в системе AFNOR для индикации бактерий рода *Salmonella* и *L. monocytogenes* в пищевых продуктах.

При исследовании проб на наличие *L. monocytogenes* в реакции ДНК-гибридизации мишенью является последовательность ДНК, кодирующая продукцию токсичного белка листериолизина О – основного фактора патогенности возбудителя листериоза. Анализ сальмонелл осуществляется путем индикации последовательности генов в области рибосомальной РНК, специфичной для всех представителей рода *Salmonella* [22, 27].

С 2005 г. в России впервые внедрен и применяется метод выявления и определения бактерий рода *Salmonella* и *Listeria monocytogenes* на основе гибридационного ДНК-РНК-анализа (МУК 4.2.1955-05). Метод делает возможными ускоренное обнаружение и идентификацию названных выше эмерджентных патогенов в пищевых продуктах на основе твердофазного гетерогенного гибридационного ДНК-РНК-анализа с хемоллюминесцентным детектированием.

Возможность быстрой диагностики возбудителей пищевых инфекций с помощью прямого скрининга ограничивается отсутствием достаточно чувствительных методов детекции. Молекулярно-биологические методы, основанные на использовании для обнаружения патогенных микроорганизмов специфичных зондов, имеют ряд преимуществ перед классическими методами культивирования *in vitro* с последующим биохимическим и серологическим тестированием. Однако их чувствительность тоже недостаточна для прямой идентификации микроорганизмов в таких сложных биологических субстратах, как пищевые продукты. Значительно большей чувствительности и

Таблица 1. Генные зонды для детекции некоторых пищевых патогенных микроорганизмов

Микроорганизм	Мишень	Источник
<i>Campylobacter jejuni</i>	р-РНК	[53]
<i>Escherichia coli</i>	Термостабильный токсин (ST)	[34, 48]
	Термолабильный токсин (LT)	[55]
	Шигаподобные токсины (St I, St II)	[35]
	Инвазивные гены	[15]
	O157:H7	[25]
<i>Listeria spp.</i>	р-РНК	[38]
<i>Listeria monocytogenes</i>	Листериолизин О	[22]
	Основной секретируемый полипептид (<i>msp</i>)	[21, 33]
<i>Salmonella spp.</i>	р-РНК	[20]
<i>Shigella spp.</i>	Инвазивные гены	[33]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Энтеротоксин В	[50]
<i>V. parahaemolyticus</i>	Термостабильный гемолизин (<i>tdh</i>)	[49]
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Инвазивный ген (<i>ail</i>)	[47]