

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Сәтбаев Университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Химиялық және биохимиялық инженерия» кафедрасы

Мырзахан Әлия Аятқызы

Аурулардың диагностикасында классикалық полимеразды тізбекті реакция
әдістерін қолдану

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

5B070100 - «Биотехнология» мамандығы

Алматы 2020

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Сәтбаев Университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Химиялық және биохимиялық инженерия» кафедрасы

ҚОРҒАУҒА ЖІБЕРІЛДІ
ХжБИ кафедрасының меңгерушісі
_____ Г.Ж. Елигбаева
«__» _____ 2020 ж.

ДИПЛОМДЫҚ ЖҰМЫС

Тақырыбы: «Аурулардың диагностикасында классикалық полимеразды тізбекті реакция әдістерін қолдану»

5B070100 - «Биотехнология» мамандығы

Орындаған:

Мырзахан А.Ә.

Ғылыми жетекші
б.ғ.д, қауымдастырылған профессор
_____ Г.В. Курбанова
«__» _____ 2020 ж.

Алматы 2020

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ БІЛІМ ЖӘНЕ ҒЫЛЫМ МИНИСТРЛІГІ

Сәтбаев Университеті

Химиялық және биологиялық технологиялар институты

«Химиялық және биохимиялық инженерия» кафедрасы

БЕКІТЕМІН

ХжБИ кафедрасының меңгерушісі

_____ Г.Ж.Елигбаева

«__» _____ 2020 ж.

**Дипломдық жұмысты орындауға
ТАПСЫРМА**

Білім алушы Мырзахан Әлия Аятқызы

Жобаның тақырыбы: «Аурулардың диагностикасында классикалық полимеразды тізбекті реакция әдістерін қолдану»

Университет Ректорының «27» қаңтар 2020 жылғы №762-б бұйрығымен бекітілген.

Орындалған жұмыстың өткізу мерзімі «__» _____ 2020 ж.

Дипломдық жұмыстың бастапқы мәліметтері: дипломалды практикасындағы жиналған мәліметтер.

Дипломдық жұмыста қарастырылатын мәселелер тізімі:

- а) әдебиетке шолу;
- ә) жеке зерттеулер;
- б) зерттеу нәтижелері.

Негізгі әдебиет 39 кітаптан тұрады.

Дипломдық жұмысты даярлау
КЕСТЕСІ

Бөлім атаулары, қарастырылатын мәселелер тізімі	Ғылыми жетекшіге, кеңесшілерге өткізу мерзімі	Ескерту
Әдебиетке шолу	қаңтар	
Жеке зерттеулер	ақпан	
Зерттеу нәтижелері	наурыз	

Дипломдық жұмыс бөлімдерінің кеңесшілері мен
норма бақылаушының аяқталған жұмысқа қойған
қолтаңбалары

Бөлімдердің атауы	Кеңесшілер (аты-жөні, тегі, ғылыми дәрежесі, атағы)	Қол қойылған мерзімі	Қолы
Норма бақылаушы	Г.В.Курбанова		

Ғылыми жетекшісі _____ Г.В. Курбанова

Тапсырманы орындауға қабылдаған білім алушы _____ Ә.А. Мырзахан

Күні «___» _____ 2020 ж.

АҢДАТПА

Дипломдық жұмыстың мақсаты полимеразды тізбекті реакция әдісімен сальмонеллездің қоздырғыштарын идентификациялау болып табылады.

Жұмыста ұсынылған әдебиеттерді талдауы полимеразды тізбекті реакция тестіленетін ДНҚ тізбегін бірнеше рет көбейту есебінен инфекциялық аурулар қоздырғышының жасушаларын анықтайтын және қазіргі уақытта ең жетілдірілген диагностикалық әдіс болып табылатынын көрсетті.

Жұмыс барысында 10 құс ұшасы, 25 құс фекалийінің үлгілері қолданылды. Сальмонелла ДНҚ-сын бөлу үшін АҚШ-тың «Salma» фирмасының шетелдік праймерлері пайдаланылды. Сальмонелла ДНҚ-сын секвенирлеу Германия өндірісінің «Nexus» амплификаторында жүргізілді. Зерттеу нәтижелері бойынша сальмонеллалар: 10 ұшаның 6-да, 25 фекалий үлгісінің 9-да табылды.

Дипломдық жұмыс 41 беттен тұрады, ол кіріспе, әдебиетке шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, зерттеу нәтижелері мен қорытындылардан тұрады.

АННОТАЦИЯ

Целью дипломной работы является идентификация возбудителей сальмонеллеза методом полимеразной цепной реакции.

Представленный в работе анализ литературы показал, что полимеразная цепная реакция позволяет выявить клетки возбудителя инфекционных заболеваний за счет многократного увеличения копий тестируемых ДНК и является наиболее совершенным диагностическим методом.

В работе был использован материал 10 тушек птиц, 25 образцов фекалий птиц. Для выделения ДНК сальмонелл были использованы зарубежные праймеры фирмы «Salma» США. Секвенирование ДНК сальмонелл проводили на амплификаторе «Nexus» производства Германии. Анализ результатов исследования показал присутствие сальмонелл: в 6 из 10 тушек, в 9 из 25 образцов фекалий.

Дипломная работа изложена на 41 страницах, состоит из: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования и выводов.

ANNOTATION

The purpose of the diploma work is to identify the pathogens of salmonellosis by polymerase chain reaction.

The literature analysis presented in this paper has shown that the polymerase chain reaction can detect the cells of the pathogen of infectious diseases by repeatedly increasing the copies of the tested DNA and is the most advanced diagnostic method.

We used the material of 10 bird carcasses and 25 samples of bird feces. Foreign primers from the us company «*Salma*» were used to isolate Salmonella DNA. Sequencing of Salmonella DNA was performed on a «Nexus» amplifier made in Germany. Analysis of the research results showed the presence of Salmonella: in 6 out of 10 carcasses, in 9 out of 25 fecal samples.

The diploma work is presented on 41 pages, consists of: introduction, review of literature, materials and methods of research, research results and conclusions.

МАЗМҰНЫ

Кіріспе	
1 Әдебиетке шолу	10
1.1 Жұқпалы ауруларды диагностикалаудың заманауи молекулалық биологиялық әдістері	10
1.1.1 Молекулалық зондтау	10
1.1.2 Полимеразды тізбекті реакция	11
1.2 Бактериялық және вирустық инфекциялардың заманауи зертханалық диагностикасы	14
1.2.1 Бактериялық ЖИИ диагностикасы	14
1.2.2 Сальмонеллез қоздырғыштарының морфо - функционалды сипаттамасы	17
2 Жеке зерттеулер	21
2.1 Құрал-жабдықтар мен әдістер	24
2.2 Үлгілерден ДНҚ бөлу	25
2.3 RAPD/RFLP талдау	26
2.3.1 SpaO ген фрагменттерін амплификациялау	26
2.3.2 <i>invA</i> ген фрагменттерін амплификациялау	26
3 Зерттеу нәтижелері	28
3.1 ПТР-ге оңтайлы параметрлерін таңдау	28
3.2 Тест-жүйелердің аналитикалық ерекшелігі мен сезімталдығын анықтау	32
3.3 Сальмонелл штамдарын молекулалық-генетикалық типтеу	34
Қорытынды	
Нәтиже	
Пайдаланылған әдебиеттер тізімі	

КІРІСПЕ

Қазіргі кезеңде ветеринария және денсаулық сақтау саласындағы әлеуметтік маңызы бар өзекті мәселе жұқпалы аурулардың таралуын алдын алу және жою болып табылады. Қазақстанда олардың ең кең таралғандарының бірі сальмонеллез болып табылады.

Сальмонеллез (*Salmonellosis*) - Enterobacteriaceae тұқымдас *Salmonella* бактерияларынан туындайтын фекальды - оралдық берілу механизмі бар полиэтиологиялық инфекциялық ауру, симптомсыз немесе ауыр септикалық түрге дейінгі әртүрлі клиникалық көріністермен сипатталады.

Сальмонеллез - сальмонелладан пайда болатын жануарлар мен адамда кездесетін жұқпалы жіті ішек инфекциясы, салдарынан организм улануы күшейеді және асқазан - ішек жолдарының зақымдануына әкеп соқтырады.

Сальмонеллезбен ауырған төлдердің едәуір бөлігінің қырылуы, ауырған жануарлардың өсуі мен дамуындағы артта қалушылық, аборттар, емдеу шараларын ұйымдастыруға байланысты шығындардан құралатын мал шаруашылығына зор зиян келтіретін ауру түрі. (Ахмедов А. М., 1983).

Көптеген Еуропа елдерінде соңғы екі онжылдықта адамдардың ауру деңгейі айтарлықтай өсті (Oboegbulem, S.I., Collier P. W., Sharp J. C. m., 1993, CDC 2003 Ақпараттық бюллетені).

Бұл ауруларды анықтау үшін әдетте зертханалық жағдайларда бактериологиялық зерттеулер жүргізілді, зертханалық диагностика тиімділігі әдебиет мәліметтеріне жүгінсек шамамен 80% -ды құрады. Соңғы жылдары зерттеушілер [16,89,] жіті ішек инфекциясына күдікті науқастарды алғашқы тексеруде ПТР (полимеразды тізбекті реакция) *Shigella* және *Salmonella* бактерияларын анықтауда қолдану классикалық микробиологиялық зерттеумен салыстырғанда 2 есе тиімді екенін орнатты.

Полимеразды тізбекті реакция негізі инфекциялық агенттің геномының бірегей фрагменттерін анықтауға негізделген, бұл культивирленбейтін және қиын культивирленетін бактериялар түрлерін анықтауға мүмкіндік береді. Бұл әдіспен бірнеше жұқпалы агенттерді бір мезгілде анықтауға болады, профилактикалық мақсатта халық арасында скринингтік тексерулер жүргізу.

Жұмыс мақсаты - сальмонеллез қоздырғыштары мен басқа да жұқпалы ауруларды тиімді және ұтымды анықтау үшін ПТР әдісін қолдану.

Зерттеу міндеттеріне ПТР әдісімен жұқпалы ауруларды диагностикалау бойынша зерттеулерге арналған әдеби деректерді іздеу, ПТР - диагностикасын жүргізу үшін сынамаларды дайындау, биологиялық субстраттарды сақтау және тасымалдау, ПТР пайдалана отырып, сальмонеллез қоздырғыштарына уытты гендерінің болуына мониторинг жүргізу жатады.

1 ӘДЕБИЕТКЕ ШОЛУ

1.1 Жұқпалы ауруларды диагностикалаудың заманауи молекулалық биологиялық әдістері

Қазіргі уақытта жұқпалы ауруларды диагностикалауда нуклеин қышқылдарының құрылысын зерттеуге негізделген әдістер кеңінен қолданылады [8, 9]. Нуклеин қышқылдарының ашылуы өткен ғасырдың 50-ші жылдарында Уотсон мен Ф. Крик ДНҚ молекуласының құрылымын ашуымен байланысты.

Э.Чаргафф, М. Ниренберг, А. Н. Белозерскийдің жұмыс нәтижелері негізінде «гендік инженерия» деп аталатын практикалық бағыт қалыптасты. Осы бағыттың арқасында келесі жетістіктер пайда болды:

1. ДНҚ молекулаларындағы нуклеотидтердің белгілі бір тізбектегі учаскелерін кесетін рестрикциялық ферменттер - эндонуклеазалары ашылды.

2. Әртүрлі ген фрагменттерінен құралған ДНҚ гибридті молекулаларын прокариот пен эукариот жасушаларына енгізу және құру технологиясы әзірленді.

3. ДНҚ және РНК *in vitro* синтезі үшін ферментативті жүйелер таңдалған.

4. ДНҚ және РНК молекулаларына радиоактивті, флюоресцентті және басқа да белгілер түрлерін енгізу әдістері ұсынылды.

5. Геном фрагменттерінің бастапқы құрылымын анықтауға, берілген ДНҚ құрылымының фрагменттерін синтездеуге мүмкіндік беретін аспаптар құрылды.

1.1.1 Молекулалық зондтау

Молекулалық зондтау әдістері 20 ғасырдың 70 - жылдарының ортасынан бастап көптеген елдердің диагностикалық зертханаларының практикасына енді, олар бактериялар мен вирустарды детекциялауда пайдаланылады [6, 19]. Молекулалық зонд - анықталған объект геномына бірегей ерекше ДНҚ немесе РНК фрагменті. Зерттеліп жатқан микроағзалардың болуын сынамадағы нуклеин қышқылдары бар зондтың гибридизациясы бойынша байқайды [204].

Қазіргі уақытта зондтың екі түрі көп сұранысқа ие:

- біртізбекті РНК-зонды. Оларды РНК синтезінде ДНҚ фрагменттерінен алады, вектрлық плазмидаларға клондалған фагтық промоторлармен бірге [59]. Таңбалау синтез кезінде жүреді, бұл оның жоғары нақтылығын тудырады. РНК зондта балласты тізбектер жоқ, сол себепті гибридизацияға жол бермейді. Олардың кемшілігі тұрақсыздық болып табылады, олар тікелей синтезден кейін пайдаланылады [59].

- олигонуклеотидті зондтар. Көлемі 100 нуклеотидтен көп емес бір тізбекті ДНҚ-зондтар ДНҚ синтезінің автоматтандырылған жүйелерінің көмегімен алынады.

Олар ДНҚ мен РНҚ зондының артықшылықтарын өзіне біріктірді: тұрақты, тиімді өзгереді,гибридизацияға ұшырамайды, шағын өлшемге байланысты нысанамен тез байланысады, сол себепті зерттеу ұзақтығын азайтады.

Олигонуклеотидті зондтар патогенді микроорганизмдерді детекциялау, мутацияларды анықтау үшін (нуклеотидті алмасулар, шағын делециялар және ендірмелер) қолданылады. Сонымен қатар олар тест-жүйелер мен биочиптердің компоненті болып табылады.

1.1.2 Полимеразды тізбекті реакция

Амплификациялық технологиялар арасында ең көп практикалық қолдану полимеразды тізбекті реакция (ПТР) әдісі, ол сынама ішінде ДНҚ-ның бірдей молекулаларын алдын ала санын арттыра отырып анықтауға мүмкіндік береді.

ПЦР принципін К.Мюлис 1983 жылы тұжырымдады (1993 жылы ПТР ашқаны үшін Нобель сыйлығының иегері атанды).

ПТР – ДНҚ - ны *in vitro* амплификациялау әдісі. Оның көмегімен бірнеше сағат ішінде ДНҚ-ның белгілі бір фрагментінің миллиондаған көшірмесін алуға болады. Керекті ДНҚ праймер атауын алған екі біртізбекті олигонуклеотидті ДНҚ-зондының көмегімен алынады. Праймерлер әрбір ДНҚ тізбегіне гомологты. Праймерлер анықталған учаскені шектейді және осы фрагменттің синтезі үшін бастама ретінде қызмет етеді [1,281].

ПЦР әдісі патогенді вирустарды, бактерияларды, қарапайымдарды анықтауда кең мүмкіндіктер ашады [24]. Қазіргі уақытта ПТР - ға негізделген праймерлер мен тест - жүйелер әзірленді, іс жүзінде олар қауіпті барлық вирустарды, бактерияларды, саңырауқұлақтарды, қарапайымдарды анықтайды [44,].

ПЦР-дың ең айқын артықшылығы күрделі культивирленетін бактериялар: микобактериялар [68], микоплазмалар [43], лептоспиррлер, хламидиялар [94], легионеллдар [152], хеликобактерлер [45] жұмыс істеген кезде пайда болды. Бірқатар вирустар үшін (папилломавирустар, С, В гепатиттерінің вирустары және т. б.) ПТР вирус компоненттерін анықтаудың жалғыз сенімді әдісі болып табылады [48].

ПТР жүргізу кезеңдері.

ПТР жүргізу кезінде әрқайсысы үш кезеңнен тұратын 20-35 цикл орындалады.

1 – кезең - денатурация. ДНҚ тізбектерін ыдырату үшін ДНҚ матрицасын 94-96°С дейін 0,5-2 минут қыздырады. Бұл кезең денатурация деп аталады, себебі ДНҚ екі полинуклеотидті тізбегі арасындағы сутектік байланыстар бұзылады. Кейде бірінші циклдың алдында полимераза қосылғанға дейін реакциялық қоспаны 2-5 минут алдын ала қыздырады. Бұл тәсіл ыстық бастау деп аталады.

2 – кезең - күйдіру. Полинуклеотидті екі тізбек бір-бірінен үзілген соң, праймерлер тізбекке жабысу үшін температураны төмендетеді. Бұл кезең

күйдіру деп аталады. Күйдіру температурасы праймерлер құрамына байланысты және әдетте праймердің балқу температурасынан 4-5 °С төмен таңдалады. Кезең уақыты - 0,5 - 2 мин. Күйдіру температурасын дұрыс таңдамау праймерлердің матрицамен нашар байланысуына (жоғары температурада) немесе дұрыс емес жерде байланысуына (төмен температурада) әкеп соғады.

3-кезең - элонгация. ДНК - полимераза матрицалық тізбекті праймерді қолдана отырып репликациялайды. Бұл - элонгация сатысы. Полимераза екінші тізбектің синтезін 3' ұшынан бастайды және матрицаның бойымен қозғалады. Элонгация температурасы полимеразаға байланысты. Жиі қолданылатын Тақ пен Pfu полимеразалары 72⁰С белсенділігі жоғары. Элонгация уақыты ДНК-полимеразаның түріне, амплифицирленетін ДНК фрагментінің ұзындығына байланысты. Элонгация уақыты әрбір мың жұп үшін бір минутқа тең. Барлық циклдарды аяқтағаннан кейін қосымша соңғы элонгация кезеңін жиі өткізеді. Бұл кезең 7-10 минутқа созылады.

Диагностикалық мәселелерді шешу үшін ПТР әдісінің модификациялары қолданылады:

- КТ-ПТР (кері транскрипция - ПТР). Бұл ПТР нұсқасы геномдық РНК бар вирустарды анықтау үшін қолданылады [347]. Нуклеин қышқылдары үлгіден бөлінгеннен кейін К-ДНК синтезі жүргізіледі, өйткені классикалық термотұрақты полимераздар РНК-матрица көшірмелерін синтездемейді. Кері транскрипциядан кейін реакциялық қоспаны ПТР қою үшін қолданады. Қазіргі уақытта ТТН - полимераза (ревертазды белсенділігі бар термотұрақты ДНК-полимераза) ферменті ашылды. ТТН - мен РНК - сы бар объектілердің ПТР-детекциясын реакциялық қоспамен бір сатыда бір ферментпен жүргізуге болады, бұл процесті айтарлықтай жеңілдетеді. Алайда, ПТР-дың бұл нұсқасы, сезімталдық бойынша классикалық КТ-ПТР-дан кем түседі [347].

- Ұяшықты (англ. *Nested* «ұяшық») ПТР. ПТР-дің сезімталдығы мен ерекшелігін арттыру мақсатында микроағзалардың аз мөлшерін детекциялау үшін «*nest*» (ұяшықты амплификация) деп аталатын нұсқа әзірленді [7]. Процесс екі сатыда жүргізіледі. Бірінші сатыда праймерлердің бірінші жұбы арқылы синтезделген ампликон матрица қызметін атқарады және екінші сатыда праймерлердің екінші жұбын пайдаланаланып амплификацияланады. Екінші кезеңде синтезделген фрагмент өлшемі кіші және бірінші фрагменттің орталық бөлігінің нуклеотидтерінің бірізділігі болып табылады. Процестің екі стадия есебінен электрофорез әдісіне жеткілікті ДНК саны синтезделеді.

- Ампликонды гибридизация - ферменттік ПТР. Бұл ПТР нұсқада таңбаланған праймерлер қолданылады (белгі - биотин, дигоксигенин және бірқатар басқа топтар). Амплификация өнімдері таңбаланған. Реакциялық қоспаның детекциясында иммобилизацияланған ДНК-зондтары, гомологиялық ампликоны бар планшеттің шұңқырларына енгізіледі. Гибридизация және шаюдан кейін тиісті белгіге сәйкес конъюгатты пайдалана отырып, иммуноферменттік талдау кезеңдеріне сәйкес нәтиже шығарады. Нәтижені

планшеттік фотометр жүргізеді. ПТР-дың осы модификациясының негізінде инфекциялық агентті анықтауға арналған тест-жүйелер әзірленген [7].

- Мультиплексті ПТР. Зерттеу құнын төмендету және тиімділігін арттыру мақсатында бір реакцияда бірнеше жұқпалы агенттерді анықтау үшін ПТР тест-жүйелері әзірленген. Бұл ретте бір емес, бірнеше дана праймерлер пайдаланылады. Бұл нұсқа мультиплексті ПТР деп аталды.

Праймерлер әр түрлі ұзындықтағы фрагменттер синтездейтіндей таңдалады, бұл гель-электрофорез кезінде анықталған объектілерді сәйкестендіруге мүмкіндік береді.

Мультиплексті жүйелерде әрбір инфекция әр қоздырғышты анықтайтын жұп праймерлермен анықталады. Микроорганизмдердің бірнеше генетикалық жақын түрлері анықталған кезде праймерлердің бірі ортақ болып табылатын және әрбір түр үшін бөлек праймер бар нұсқа қолданылуы мүмкін.

Анықталған микроорганизмдер қауымдастық құрмаған кезде мультиплексті жүйелерді пайдалану тиімді. Микроорганизмдер қауымдасқан жағдайда жалған нәтижелер болуы мүмкін. Амплификацияда бірнеше матрицалардың болуы фермент, субстрат үшін бәсекелестікке әкеліп соғуы мүмкін, ал жалпы праймерлерді пайдалану кезінде - фермент, субстрат, праймерлер үшін бәсекелестікке әкеледі. Нәтижесінде матрицасы сынамада үстемдік еткен фрагмент синтезделінеді.

Тәжірибе үшін ең перспективалы биочиптер әдісімен амплификация өнімдерін анықтауда мультиплексті ПТР болып табылады. Мұндай детекция анықталған микроорганизмдердің шексіз санын және «тақырыптық» диагностика жасауға мүмкіндік береді: ТМА-ның неғұрлым кең тараған және маңызды қоздырғыштарын анықтауға арналған жүйелер; герпес тобының барлық вирустары, онкогенді генотиптердің папилломавирустары, ЖИИ-ның негізгі бактериялық және вирустық қоздырғыштары және басқалар.

Минипулды ПТР. Бұл әдіс Еуропа және АҚШ елдерінің қан банктеріндегі АИТВ-ға, В, С вирусты гепатиттеріне зерттеу құнын төмендету мен зерттеуді жеделдету үшін үлгілерді тексеру кезінде қолданылады [48]. Әдістің қарапайым нұсқасында донорлық қанның 100 үлгісінен 200 мкл-дан алынады, араластырады, бұл 200 мкл қоспаны ПТР - да талдайды. Оң нәтиже алған кезде алғашқы пул әрқайсысында 10 сынамадан он шағын пулға бөлінеді. Қайталама минипулдарда инфекциялық агенттің болуын тексереді. Оң нәтижелері бар минипулда әрбір үлгі жеке зерттеледі.

Нақты уақыттағы ПТР (Real time PCR). ПТР дамуындағы соңғы жылдардың ең маңызды жетістігі нақты уақыттағы ПТР (*Real time PCR*) атауын алған технологияның әзірленуі. Нұсқаның классикалық ПТР-ден айырмашылығы амплификация өнімін анықтау кезеңі жоқ.

Тест - жүйелер деректерінің реакциялық қоспасы ампликондар санының өсуімен қатар флюоресценция сигналы ұлғаятындай етіп жинақталған [127]. ПТР жүргізуге арналған амплификаторлар температуралық - уақыттық режимді ұстап тұру функциясынан басқа флюоресценция мөлшерін тіркейді.

Нақты уақыттағы ПТР мынадай артықшылықтарға ие:

- инфекциялық агент санын бағалауға мүмкіндік;
- ампликондармен контаминация болмайды, себебі реакциялық қоспалармен пробиркалар беті ашылмайды;
- зерттеудің ұзақтығы азаяды.

«*End point*» атауын алған нақты уақыттағы ПТР және классикалық ПТР технологияларын, элементтерін өзіне біріктірген нұсқа бар. Бұл жағдайда нақты уақыттағы ПТР тест - жүйелері қолданылады, ал реакция қарапайым амплификаторда жүргізіледі. ПТР аяқталғаннан кейін флюоресценцияның соңғы деңгейін микроробиркалар форматына сәйкес әзірленген флюориметрде өлшейді, алынған нәтижені теріс бақылаумен салыстырады.

«*End point*» қол жетімді, өйткені амплификатор мен флюориметрдің құны нақты уақыттағы ПТР амплификаторына қарағанда айтарлықтай төмен.

ПЦР-дан басқа нуклеин қышқылдарын амплификациялау принципін пайдаланатын басқа технологиялар бар, оның бірі лигазды тізбекті реакция (ЛТР) [7,152]. Транскрипциялық амплификация (Q β -амплификациясы, NASBA және т.б.) [48, 152], бірақ олардың практикалық маңызы айтарлықтай төмен.

Осылайша, зерттеудің сезімталдығын, ерекшелігін, объективтілігін және технологиялығын арттыру есебінен заманауи амплификациялық және гибридизациялық технологиялар инфекциялық аурулардың диагностикасын жаңа деңгейге көтеруге мүмкіндік береді. Осыған байланысты клиникалық-биохимиялық, микробиологиялық, иммунологиялық және молекулалық - генетикалық зерттеулерді жоғары деңгейде орындауға қабілетті көп ғылыми - әдістемелік кешендер перспективалы.

1.2 Бактериялық және вирустық инфекциялардың заманауи зертханалық диагностикасы

1.2.1 Бактериялық ЖИИ диагностикасы

ЖИИ бактериялық қоздырғыштарының басым бөлігі - *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Yersinia* бактериялары медициналық микробиология лабораторияларының классикалық объектілері болып табылады. Олар зертханалық жағдайда культивирленеді.

Осыған байланысты бактериологиялық әдіс ЖИИ бактериялық қоздырғыштарын детекциялау үшін негізгі әдіс болып табылады. Оқшаулағыштардың туыстық пен түрлік тиістілігін анықтау биохимиялық тест бойынша жүргізіледі, әр түрге сәйкес қоректік орталар таңдалады. Штамдарды маркерлеу қосымша биохимиялық тестілер есебінен жүзеге асырылады. Энтеробактериялардан туындаған аурудың микробиологиялық диагностикасын реттейтін ресми әдістемелік нұсқаулықтар бар.

ЖИИ бактериялық қоздырғыштарының арасындағы жалғыз күрделі культивирленетін микроорганизмдер *Campylobacter* өкілдері. Зертханалық

жағдайларда оларды өсіру үшін күрделі, қымбат қоректік орта және анаэроустаттар қажет.

Микробиологиялық әдіс ЖИИ қоздырғыштарын анықтауда негізгі және көп қолданылатын әдіс. Сонымен қатар, оның мүмкіндіктерін шектейтін сипаттамалар бар. Бактериологиялық талдаудың кемшіліктерінің бірі ұзақтығы 4-5 күнді құрайды. Сондықтан энтеробактерияларды жылдам анықтау әдістерін әзірлеу өзекті.

ЖИИ бактериялық қоздырғыштарын диагностикалаудың молекулярлы-биологиялық әдістері. ЖИИ бактериялық қоздырғыштарын жедел анықтау молекулалық - биологиялық әдістер, ПТР қолданудың арқасында мүмкін болды. Олардың көмегімен зерттеудің дәстүрлі әдістерімен шешілмеген энтеробактерия штаммдарының патогенділігін анықтау проблемасын шешу мүмкін болды.

Энтеробактерияларды детекциялау үшін ПТР қолдану туралы алғашқы деректер 20 ғасырдың 80-ші жылдар соңында пайда болды. Жаңа тест-жүйелер патогенді факторларының болуы бойынша шигеллаларды тез және тиімді анықтауға мүмкіндік берді: шигатоксин гендерді [206]. Кейіннен ПЦР тест-жүйесі энтеротоксигендік *E.Coli*-де шигаға ұқсас токсин генін анықтауға әзірленді [207].

Бұл науқастар мен қоршаған орта объектілерінде токсинпродукциялаушы *E.coli* анықтауға мүмкіндік берді [247].

Көптеген жұмыстар *E.coli 0157-H7*-дің ПЦР детекциясына арналған, олар геморрагиялық синдромы бар ЖИИ өршуін көптеген елдерде тудырып, ауырғандардың өлуіне себебі болады [266]. Stx1 және stx2 шигатоксиндер гендерін диагностикалауға мультиплексті нақты уақыттағы ПТР экспресс нұсқасы әзірленді. Ол ЖИИ-мен ауыратын науқастардың фекалий сынамасын тестілеу үшін қолданылады және культуралды зерттеу кезінде теріс нәтиже берген үлгілерде токсигенді *E.Coli* анықтауға мүмкіндік береді [116].

ПТР әдісі «саяхатшылар диареясы» деп аталатын ЖИИ диагностикасында қолданылады. Оның қоздырғышы – термолабильді (LT) және термостабильді (ST) уыттарды өндіретін *E.coli*. Амплификация кезінде нысана ретінде осы токсиндер гендерінің фрагменттері қолданылады [104].

90-шы жылдардың басында сальмонелл детекциясына ПТР әдісін қолдану туралы жарияланымдар пайда болады [95]. WayJ.S. бірлескен авторлармен *Salmonella* тектес бактерияларды анықтау үшін мультиплексті ПТР тест-жүйесі құрылды [369]. Онда 3 жұп праймер қолданылады: олардың бірі геннің фрагментіне тән, сальмонелл, шигелл және эшерихий үшін ортақ үш түр энтеробактерияларын детекциялау үшін қызмет етеді. Басқа екі жұп *Salmonella* бактериялар гендеріне тән. Осылайша, үлгіде *Enterobacteriaceae* өкілдері және жеке - сальмонеллалар анықталады.

20 ғасырдың 90-шы жылдарында *Campylobacter* тектес бактерияларды және *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* бактерияларын анықтау үшін ПТР тест жүйесі әзірленді [152].

Қазіргі уақытта ЖИИ диагностикасында бірнеше жұқпалы агенттерді анықтауға мүмкіндік беретін мультиплексті форматтағы тест-жүйелер жиі қолданылады [97].

Кореяда фекалиялардағы *virA* генді *Shigella flexneri* және *invA* генді *Salmonella typhimurium* бір мезгілде анықтау үшін бояғыш *sybre Green* пайдалана отырып, ПТР «*Real time*» нұсқасы әзірленді. ДНҚ бөлу кезеңі жоқ. Әдістің сезімталдығы 40 кл/гр фекалий құрады [364]. Мао Н. басқа авторлармен *uidA E.coli 0157-H7, Salmonella spp., Shigella spp.* геніндерін анықтау үшін мультиплексті ПТР тест-жүйесі ұсынды. ПЦР өнімдерін бөлу акриламидті геледе капиллярлы электрофорез әдісімен жүзеге асырылады [254].

Үндістанда мультиплексті ПТР - ны қолдана отырып, мектепке дейін жастағы науқастардан (780сынама) нәжіс сынамасында диарегендік бактериялар анықталды. Ең жиі энтероинвазивті *E.coli* (8,2%), энтеропатогенді *E.coli*(3,5%), энтеротоксигленген *E.coli* (1,3%). Энтерогеморергиялық *E.coli**Shigella spp, Vibrio cholerae* және *Salmonella* бактериялары бірлі-жарым жағдайларда ғана табылған [106].

Мексикадағы диареямен ауыратын балалардың 300 нәжіс сынамасын мультиплексті ПЦР әдісімен зерттегенде *Salmonella* 53,5% - да, *E.coli* диарегенді - 33,2% - да, *Shigella* бактериялары - 2,6% анықталды. Барлық зерттелген үлгілерде қоздырғыштардың бір немесе бірнеше түрі бар [296].

Бактериологиялық әдіс пен ПТР әдісінің тиімділігін салыстыру жүргізілді. Бангладеште дизентериямен ауыратын науқастардың нәжісіне бактериологиялық әдіспен қоса параллель ПТР талдау жүргізілді. ПТР-да шигеллалар үшін оң нәтиже алынды. ПТР әдісімен оң нәтиже берген сынамалар бактериологиялық талдауда теріс нәтиже көрсетті. Бактериологиялық зерттеудің сезімталдығы 72%, ал ПТР-100% құрады. ПЦР әдісі ішек инфекцияларын диагностикалау үшін ұсынылды [205].

Таиландта науқастарды антибиотикотерапияның тиімділігін бақылау кезінде бактериологиялық әдіс пен ПТР салыстыру жүргізілді. ПТР әдісі сезімтал және дәлірек болды. Ол диарея болмаған кезде антибиотикотерапия аясында науқастарда шигеллаларды анықтады [329].

Палестинадағы жіті гастроэнтериті бар 150 баланы тексеру кезінде дәстүрлі әдіспен және ПТР нәтижелері сәйкес келді. Бактериялық ЖИИ қоздырғыштары 17.3% үлгіден табылған (*Shigella spp* - 6,0 %), *Campylobacter coli/jejuni* - 4.7%, *Escherichia coli 0157-H7* - 4.7 %, *Salmonella spp* - 2,0 %). Бактериялық гастроэнтерит диагностикасында дәстүрлі және молекулалық әдістерді біріктірген жөн [296].

ПТР әдісі азық-түлік өнімдерінің, тамақ шикізатының, судың энтеробактериялармен контаминациясын тексеру үшін белсенді қолданылады.

Мультиплексті тест-жүйе Грециядағы моллюскалардың сальмонелл және шигелл детекциясында қолданылған [357].

Сальмонелланы анықтау үшін ПТР әдісін қолдану туралы бірнеше хабарлама жарияланды. Олар: [Widjojoatmodjo M.N, Fluit A.C., Torensma R., et all 1991, Rahn K, De Gandís S.A., Clarke R.C. et al,1992, Cohen HJ., Mechanda

S.M., Lin W., 1996, S.D. Oliveira, L.R. Santos, D.M.T. Schuch, A.B. Silva, C.T.P. Salle, C.W. Canal. 2002]. RAHN K. амплификацияда нысана ретінде инвазия үшін қажетті геннің *invA* ішкі сегментін пайдаланды, бұл жасушалар мәдениетінде эксперимент ретінде көрсетілді [Calan J.e., CurtissR., 1991]. Алайда, зерттеушілердің 630 жабайы штаммдарын сальмонеллаға тексергенде, 4 жалған теріс нәтиже тіркелді.

Cohen амплификация үшін сальмонелланың суб бірлігін кодтайтын *FimA* ген фрагментін қолданды. Авторлар таңдалған фрагмент сальмонелланың барлық өкілдеріне тән бірегей аймақтары бар деп санайды. Осылайша, олар *S.pullorum* сияқты жгуттері жоқ серотоптарда бұл ген бар, демек, ПТР әдісімен анықтауға болады. Әртүрлі серотоптар мен сероварлардың 376 сальмонелл штаммдары, сондай-ақ басқа микроорганизмдердің 15 штаммдары сыналды. Зерттеу қолданылған праймерлердің 100% дәлдігін көрсетті, яғни сальмонеллалар барлық штаммдарын тестілеу кезінде оң нәтижелер алынды және басқа микроорганизмдер ДНҚ тестілеу кезінде жалған нәтижелер тіркелген жоқ.

Осылайша, қолжетімді болып табылатын микробиологиялық әдістердің үстемдігіне қарамастан, ПТР әдісі ЖИИ диагностикасында кеңінен қолданылады [65]. Ол аса қауіпті болатын уларды және патогендіктің басқа да факторларын өндіретін штаммдарды анықтау үшін, тамақ өнімдері, сыртқы орта объектілері мен науқастардан алынған материалдар сынамаларының көп санын зерттеу кезінде таптырмайтын диагностика болады.

1.2.2 Сальмонеллез қоздырғыштарының морфо - функционалды сипаттамасы

Сальмонеллез - сальмонеллез тудыратын жануарлар мен адамның жіті ішек инфекциясы. Сальмонеллар түр ретінде энтеробактериялар тобына жатады, олардың мекен ортасы адамның немесе омыртқалы жануарлардың ішектері. Сальмонелланың кейбір түрлерімен зақымданған тамақ өнімдерін қолдану нәтижесінде пайда болатын жіті ішек аурулары белгілі.

Бұл аурулардың бірінші қоздырғышы - *S.choleraesuis* - 1885 ж.д. Сальмонеллез ауру шошқалардан бөлініп алынды. Сальмонеллалар 4 топқа бөлінеді. Бұл микроорганизмдерге ұзындығы 1-5мкм, қалыңдығы 0,4-0,8мкм таяқша тәрізді пішін тән. Олар анилин бояғыштарымен жақсы боялады, грамм теріс. Олардың көпшілігі қозғала алады, жіпшелері мен капсулалары бар. Спора түзбейді. Сальмонеллалар анаэробтар болып табылады, ет пептонды ортада жақсы культивирленеді. Кейбір сальмонелдерге тән белгі - қоректік агарда өскен колонияның айналасындағы шырыштың қалыптасуы. Сальмонеллалар ферментативті белсенді бактериялар болып табылады және күрделі антигендік құрылымы бар. Олардың құрамында О-антиген (соматикалық) және Н-антиген (жіпше) бар. Әртүрлі сальмонеллалардың құрылысын жүйелі түрде Ф. Кауфман жүргізді, ол 1934 жылы осы

бактериялардың серологиялық жіктелуін ұсынды. Сол кездегі барлық белгілі сальмонеллалар (шамамен 700) 44 серологиялық түрге бөлінді.

Сальмонеллез қоздырғышын жұқтырғанда инкубациялық кезең 6 сағаттан 3 тәулікке дейін. Сальмонеллалар аш ішекте орналасады және токсин бөледі. Токсиннің әсері ішек арқылы судың жоғалуы, қан тамырлары тонусының бұзылуы, жүйке жүйесінің зақымдануы, температураның жоғарылауы, әлсіздік, іштің ауруы, сұйық нәжіс.

Сальмонеллездің диагностикасы зертханалық жағдайларда жүзеге асырылады. Оның қарапайым әдісі гипериммунды сарысуларды пайдалану, бірақ қазіргі уақытта моноканалды антиденелерді пайдаланады.

20 ғасырдың 40-шы жылдарына дейін тағамдық жолмен сальмонеллез тудыратын басым түрлері: *S.Typhimurium*, *S.Enteritidis*, *S. Thompson*, *S.Newport*, *S.Bovismorbificans*, *S.Choleraesuis* болды. *S.Typhimurium* осы сәтке дейін сальмонеллездің жетекші қоздырғыштарының бірі болып саналады, ал ауру қоздырғыштардың қалған түрлері «бірінші ондық» ішінде үнемі өзгеріске ұшырап отырды. 1960 жылдары *S.Agona* түрі шошқа мен үй құстарының арасында тарала бастайды. Оның себебі Перуден импортталатын балық жемінің интродукциялануы. 1970 жылы *S.Hadar* адамдар арасында сальмонеллездің қоздырғышы арасында екінші болды. 1961-1980 жылдар аралығында сальмонеллездердің этиологиялық құрылымында PT8 фаготипінің *S.Enteritidis* үлесінің біртіндеп өсуі байқалады, олар күркетауық етін пайдалануға байланысты сальмонеллез ауруының бірнеше ошақтарының өршуіне әкеп соқты. 1975 жылдан бастап *S.Enteritidis* бойынша сальмонеллез қоздырғыштарының арасында екінші орында болды, 1981 жылдан 1991 жылға дейін оның үлесі 10-нан 70%-ға дейін артты, фаготипі PT8-ден PT4-ке өзгерді. *S.Enteritidis*-ті белсенді таратушы жақсы сатылатын коммерциялық өнім тауық жұмыртқалары, себебі жұмыртқаларға оңай ену қабілеттілігі.

S.Gallinarum, балапандар мен тауық ауруларының жиі қоздырғышы, үй жануарларына бейімделгендіктен адамдарда сирек ауру тудырады. Бірнеше онжылдық бұрын *S.Choleraesuis* көптеген елдерде кездесіп, шошқада сальмонеллездің қоздырғыштары арасында көшбасшы болды. Осы штамм Оңтүстік - Шығыс Азия үшін өзектілігін қазіргі уақытқа дейін сақтайды. *S.Choleraesuis* Тайвань мен Тайландта жиі адамдарда сальмонеллез тудырады. 2007 жылы ірі қара мал мен адамдарда ауру тудыратын ауыл шаруашылығы малдарынан *S.Dublin* жұғу жиілігі *S.Typhimurium*-нің Бельгия, Дания, Ирландия, Голландия, Ұлыбритания бойынша жұғу деңгейінен 66.3, 52.3, 82.5, 63.6, 65.1% асып түсті [7].

2009 жылы Еуропалық Одақ елдерінде адамдарда *Enteritidis*, *Typhimurium*, *Infantis*, *Newport*, *Virchow*, *Derby*, *Hadar*, *Kentucky*, *Saintpaul*, *Bovismorbificans* штаммдары сальмонеллез таратты. Америка Құрама Штаттарында 4 штамм сальмонеллездің жетекші қоздырғыштары болды: *S.Typhimurium* (19%), *S.Enteritidis* (14%), *S.Newport* (9%), *S.Javiana* (5%). 2012 жылы Германияда сальмонеллезбен халықтың 42% *S.Typhimurium* штаммы арқылы ауырған. Адамдар мен шошқалардан бөлінген қоздырғыштардың

көпшілігі *S.Typhimurium* фаготипі DT193 жатады. 2012 жылы Францияда *S.Typhimurium* фаготипі DT193 тудырған 127 оқиға тіркелді. Антибиотиктерге төзімділігі *S.Typhimurium* жиі анықталады, сонымен қатар резистенттік *S.Hadar*, *S.Enteritidis*, *S.Blockley*, *S.Heidelberg*, *S.Kentucky*, *S. Bovismorbificans*, *S.Panama*, *S.Rissen* арасында да тіркелген.

21 ғасырдың басында ауыл шаруашылығы жануарлары мен құстарының популяциясына бұрын сирек кездесетін штаммдардың интродукциясы болды. *S.Mikawasima*, *S.Typhimurium*, *S.Stanley* сияқты штаммдар тудыратын сальмонеллездер жиілігінің өсуі байқалады.

2009 жылдан бастап 2013 жылға дейін Еуро Одағының бірнеше елдерінде *S.Mikawasima* штаммы шақыратын инфекциялар санының артуы тіркелді, олар алғаш рет 1967 Түркияда тасбақалардан табылған, ал 1976 жылы Нидерландыда және басқа да Еуро Одақ елдерінде оларды шошқалардан да табылған. 2004-2012жж. аралығында Еуро Одақтың сегіз елінде 120 *S.Mikawasima* изоляттары бөлінді, көбінесе үй құсы мен шошқалардан, кей жағдайларда көкөністерден, шұжықтардан, жаңғақтардан, үй жануарларына арналған жемдерден, мұздатылған кальмардан. *S.Mikawasima* ауру жағдайларының көпшілігі Испанияда тіркелді, онда бұл штамм тұщы су үлгілерінен, шошқалар мен жабайы қабандардан, ауруханалардан шыққан. 2012 жылы Чех Республикасының алты облысында *S.Mikawasima* тудырған сальмонеллез жағдайлары тіркелді. 2009 жылы Германияда *S.Mikawasima* табылды [5].

Соңғы уақытта *S.Stanley* тудыратын сальмонеллездер жиілігінің артуы тіркелді. 2006-2012 жылдар арасында Еуро Одақта осы серотиппен байланысты сальмонеллездің 2926 жағдайы анықталды. 2001-2007 жылдары *S.Stanley* Жапония, Малайзия, Филиппин, Хорватия, Дания, Финляндия, Нидерланды және Канадада жиі бөлінетін жиырма изоляторлардың арасында болды. Тайландта олар сальмонеллез тудырудан екінші орын алды және олардың үлесіне сальмонеллездің 11%-ға жуығы келді. Еуроодақта бастапқы кезеңдерде *S.Stanley* салдарынан туындаған аурулардың көпшілігі оңтүстік-шығыс Азияға саяхаттармен байланысты болды, негізінен Таиландқа. Қазіргі уақытта 2012-2013 жылдары Бельгияда, Венгрияда және Германияда тіркелген жағдайлар туристік сапарлармен байланысты емес және генетикалық, фенотиптік белгілері бойынша бір типті қоздырғыштан туындаған. *S.Stanley* штаммына байланысты халықаралық өршу 1995 АҚШ-та, Финляндияда люцерна өсімдіктерін пайдалануға негізделген, Канада, Англия және Уэльс, Шотландия және Австралия, импортталған жержаңғақ пайдалануға байланысты. 2006 жылдың қыркүйегінен 2007 жылдың ақпанына дейін Швейцарияда ауру өршуі тіркелген, өршу себебі Швейцарияның батысында өндірілген жұмсақ ірімшіктің белгілі бір сортын тұтынуға байланысты тіркелді. *S.Stanley* Тайланд, Германия, Нидерланды, Вьетнам, Бразилия және Қытай өнімдерінен шығуы мүмкін: үй жануарлары, жержаңғақ, мұздатылған сиыр еті, кептірілген тай саңырауқұлақтары, балғын жалбыз, мұздатылған балапан еті, тәтті базилик, жаңа піскен ақжелкен [6].

2013 жылы тіркелген өршулер тірі үй құстарымен байланыста болғандар арасында кездесті, мұндай жағдайларда емделушілерден *S.Typhimurium*, *S.Infantis*, *S.Lille*, *S.Newport*, *S.Mbandaka*, сондай-ақ қияр (*S.Saint-paul* бөлінген), сиыр еті (*S.Typhimurium*), кішкентай тасбақалар (*S.Sandiego*, *S.Pomona*, *S.Poona*) тұтынумен байланысты болды. Өршу кезінде 2009-2012 жж. сальмонеллаларды жержаңғақ майынан (*S.Bredeney*, *S.Typhimurium*, *S. Tennessee*), мангодан (*S. Braenderup*), мускусты қауыннан (*S. Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Panama*), сиыр фаршынан (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*), үй құсы етінен (*S.Hadar*, *S. Montevideo*, *S.Newport*, *S.Lille*, *S.Infantis*), құрғақ ит жемінен (*S.Infantis*), шикі балық етінен (*S.Bareilly*, *S.Nchanga*), кішкентай тасбақалардан (*S.Sandiego*, *Pomona*, *Poona*), қуырылған тауық бауырынан (*Salmonella Heidelberg*), түрік самырсын жаңғынан (*S.Heidelberg*), папаядан (*S.Agona*), африкалық бақалардан (*S.Typhimurium*), жоңышқа және дәмді өскіндерінен (*S.Enteritidis*, *S.Newport*, *S.Saintpaul*, *S.Salmonella*) [5], үйректен (*S.Altona*, *S. Johannesburg*), күркетауық гамбургерлерінен (*S.Hadar*), жұмыртқадан (*S.Enteritidis*), бидай кебегінен (*S.Agona*).

2 ЖЕКЕ ЗЕРТТЕУЛЕР

2.1 Құрал-жабдықтар мен әдістер

Қазақ ұлттық аграрлық университеті қарамағындағы Қазақстан - Жапон инновациялық орталығының жасыл биотехнология және клеткалық инженерия зертханасында дипломдық жұмыс 2019-2020 жылдары орындалды.

Жұмыста қолданылған олигонуклеотидті праймерлердің барлығы АҚШ-тан алынған, ПТР өткізуге арналған құрал – амплификатор «Nexus» фирмасы тиесілі Германияда жасалған.

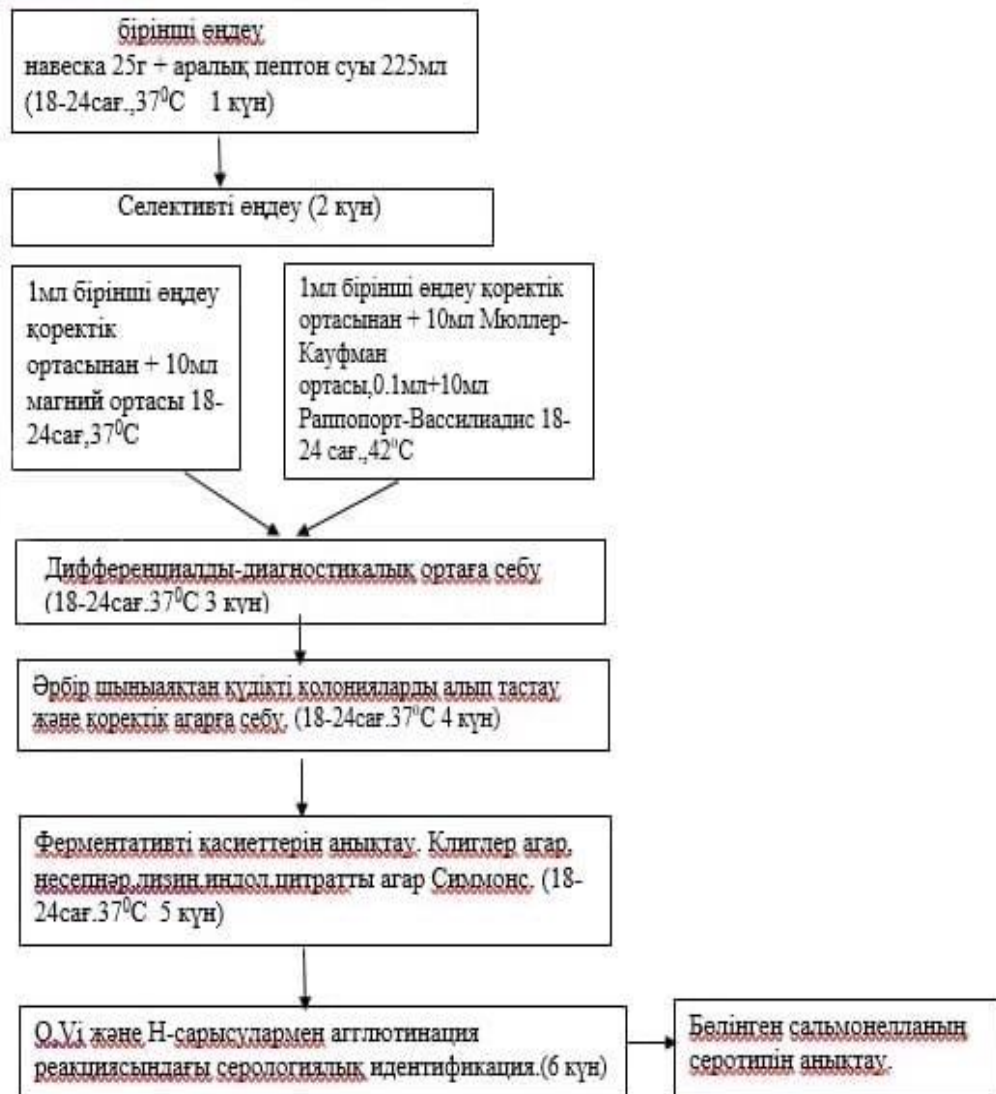
Жұмыс барысында 10 құс ұшасынан алынған, 25 құс фекалий үлгілері қолданылды. Өңдеу әдісі ретінде 15 - 20% фекалий суспензиясы қолданылған. ДНҚ бөліп алуға 100 мкл бактериялық фракция қолданылды.

Молекулалық - генетикалық әдістерге байланысты барлық жұмыстар құрамында *Salmonella* микроорганизмдері бар материалды зерттеу санитарлық-эпидемиялық шараларды сақтай отырып жүргізіледі, «III-IV патогендік (қауіптілігі) топтары мен паразиттік ауру қоздырғыш микроорганизмдермен жұмыс істеу қауіпсіздігі» БК1.3.2322-08 ережесі бойынша, БК2.1.728-99 «Емдеу, профилактикалық алдын алу мекемелерінің қалдықтарын жинау, сақтау және жою ережесі» мен «патогендігі III-IV топтағы патогенді биологиялық агенттер жұқтырған материалды ПТР әдісімен зерттеу кезінде жұмысты ұйымдастыру» ТМ1.3.1888-04 әдістемелік нұсқаулары бойынша жүргізілді.

Salmonella текті микроорганизмдердің ДНҚ - сын анықтау үшін клиникалық және биологиялық материалдарда белгіленген тәртіппен қолдануға рұқсат етілген диагностикалық тест жүйесі қолданылады. Бұл ретте контаминациялық қауіпсіздіктің ең жоғары дәрежесіне ие диагностикалық тест-жүйелерге (гибридизациялық - флуоресцентті детекциялы тест - жүйелер) көңіл бөлінуі тиіс.

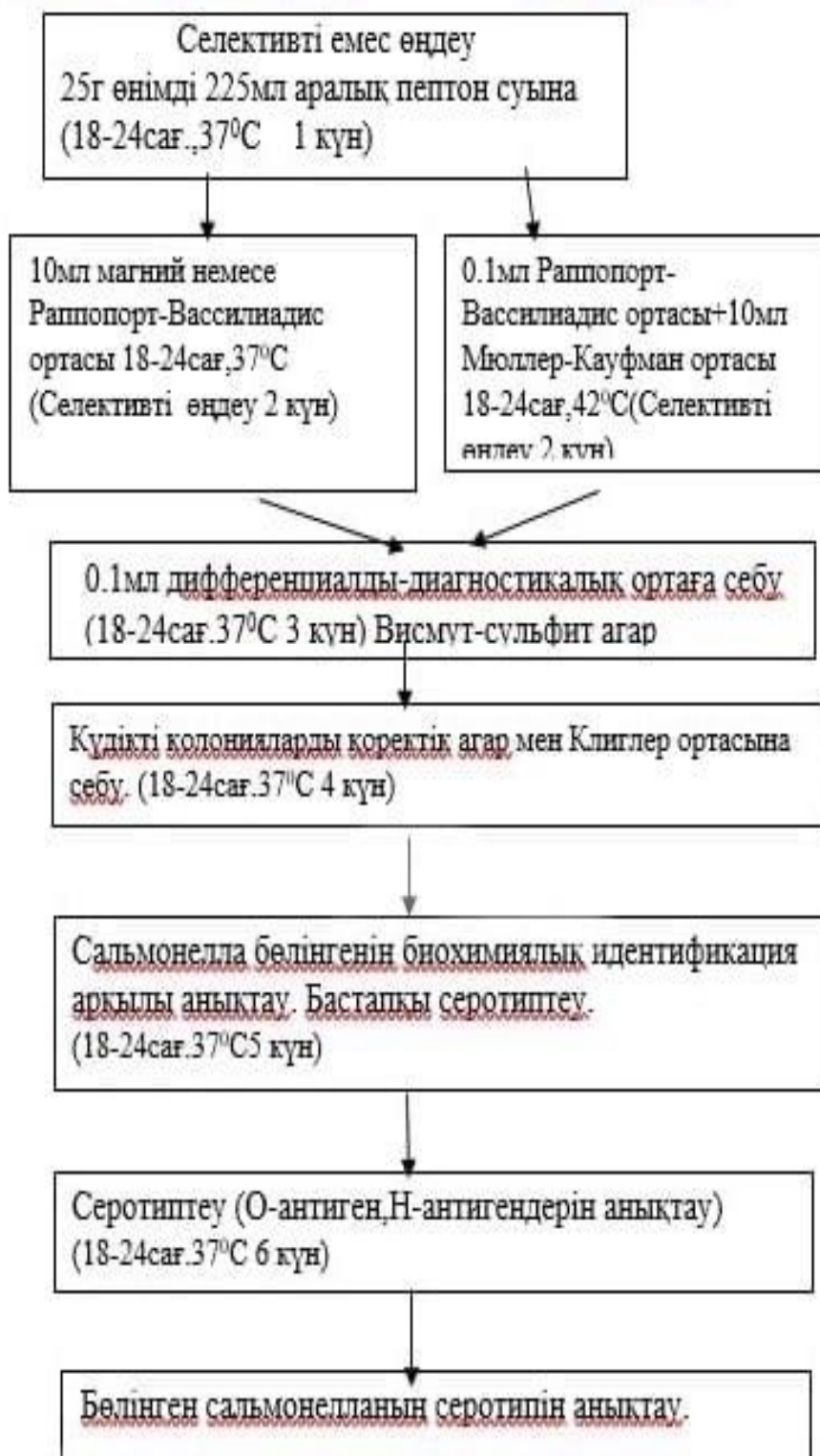
Зерттеуге арналған клиникалық материалды нәжіс (фекалии) дезинфекцияланған ыдыстарға ДНҚ контаминациясына жол бермей алу керек (стерильді Петри, дефекация алдында салынатын бір реттік пластикалық пакеттерді пайдалану, памперстерден немесе автоклавталған көп реттік ыдыстарға жинау).

Сальмонеллды бөлуге арналған блок-схема (сальмонелдаларды халықаралық қадағалау материалдары бойынша, курстарда оқытындардың зертханалық хаттамалары, 5-ші басылым, 2007ж.)



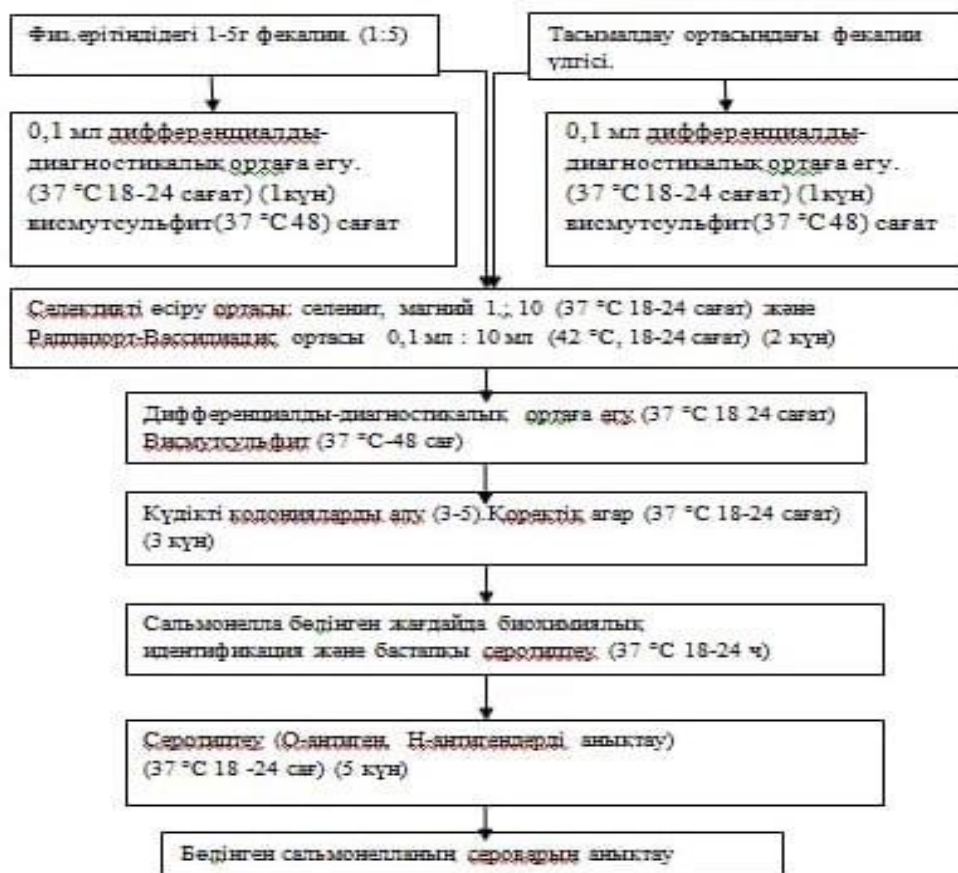
1 Сурет – Сальмонеллды бөлуге арналған блок-схема

Азық-түлік өнімдерінен сальмонелл бөлу схемасы



2 Сурет – Азық - түлік өнімдерінен сальмонелл бөлу схемасы

Сальмонелланы фекалийден бөлу сызбасы



3 Сурет – Сальмонеллды фекалийден бөлу схемасы

2.2 Үлгілерден ДНҚ бөлу

Әр түрлі үлгілерден ДНҚ бөлу гуанидинтиоцианатта алдыңғы сынаманы лизирлеу арқылы силикагельде аффинды сорбция әдісімен жүргізілді [Boom R. et al., 1990].

Зерттелетін үлгінің 100мкл-не 300мкл лизирлейтін ерітіндіні (62% гуанидин тиоцианат, 10 мМ Трис-НС 1,1 мМ ЭДТА, 1%Тритон-Х-100) қосады, мұқият араластырады, пробирканы 65°C кезінде 7 мин қыздырады, тағы да мұқият араластырады. Сынаманы үстел центрифугасында 14x10 айн/мин 5 минут бойы центрифугалайды. Тұндыру сұйықтығын аэрозольдік барьері бар жеке дозатор ұштығымен өте ұқыпты алып, жаңа пробиркаларға құяды. Сорбенттің 20 мкл суспензиясын (40% SiO₂) қосады, пробирканың ішіндегісін жақсы араластырып болған соң, сорбентті тұндыру үшін 2 мин штативте қалдырады, қайта араластырады, 10-12 мин тұндырады. Сорбентті 30 с бойы 5x10 айн/мин үстел центрифугасында тұндырады және әрбір пробиркадан жеке дозатор ұштықтарымен супернатантты алады. Ерітіндіге 300 мкл-ден №1 жуу ерітіндісін (48% гуанидин тиоцианат, 10 мМ Трис-НС1, 1 мМ ЭДТА, 0,1%

Тритон-Х-100) енгізеді, мұқият ресуспендиялайды және бұрынғы режимде қайтадан тұндырады. Супернатантты алып тастайды. 500 мкл-ден №2 жуу ерітіндісін енгізеді (50% этанол, 50 мМ NaCl, 10 мМ Трис-НС1, 1 мМ ЭДТА) ресуспендиялайды, 30 с бойы 10×10^3 айн/мин үстел центрифугасында тұндырып болған соң супернатантты алып тастайды. Жуу процедурасын №2 ерітіндімен қайталайды. Супернатантты мұқият алып, сорбенттің шөгінділерін 10 мин бойы термостатта 65°C температурада пробиркалардың қақпақтарын ашық күйде кептіреді. Пробиркаларға ДНҚ элюциясы үшін 50 мкл буфер (10 мМ Трис-НС1, 1 мМ ЭДТА) енгізеді, ресуспендияланады, 65°C температурада 5-6 мин термостатқа орналастырады. Әр минут сайын шайқап тұрады. 1 минут бойы 14×10^3 айн/мин үстел центрифугасында тұндырады. Тазартылған ДНҚ бар супернатантты ПТР қою үшін қолданады.

Молекулалық -генетикалық типтеу жұмысында ҚазҰАУ микробиология және вирусология кафедрасының коллекциясындағы штаммдар қолданылды: *S.enteritidis* S7, *S.enteritidis* R6.

RAPD/RFLP әдісінің көмегімен сальмонелл штамдарын типтеуді жүргізу үшін ДНҚ бөлу протеиназды өңдеу және алдын ала фенолды экстракциямен этанолмен тұндыру әдісімен жүргізілді:

100-200 мкл көлеміндегі бактериялардың суспензиясына (1:10-ға қатынасындай) экстракциялайтын буферді қосу (10 мМТрис-НС1, 1 мМ ЭДТА, 0,5% натридің додецилсульфаты), жақсы араластырып 0,1-0,5 мг/мл соңғы концентрациясына дейін протеиназды енгізу. Тағы бір рет араластырып, 60°C 1 сағат инкубациялау. Бактериялардың өңделген суспензиясын фенол-хлороформ (1:1 қатынасындай) қоспасының көлемі 1,5 мл болатындай пробиркаға құйып араластыру. Эмульсия пайда болғанға дейін вортесте араластыру. Үстел центрифугасында (максималды қуатта 15-30секундта) су фазасы органикалық фазадан бөлінгенге дейін центрифугалау. Үстіңгі су қабатын жаңа пробиркаға алып, фенол - хлороформ қоспасының тең көлемін қайта қосу, сол параметрлерде қайта араластырып центрифугалау. Содан кейін беткі фазаға хлороформның тең көлемін қосу, араластыру және центрифугалау. Су фазасын алу, натрий ацетаты 3М оннан бір көлемін қосу, рН 5,2 және жақсылап араластыру. Мұзда салқындалатын екі есе көлемде 96% этанол қосу, араластыру, 0°C температурасында 10 минут инкубациялау. Центрифугалау

(10 минут 12000 айн/мин), шөгінді үстіндегі сұйықтықты алып тастау. ДНҚ тұнбаларын 70% этанолмен жуып құрғату керек, кейін 100 мкл буфер TE еріту.

2.4 RAPD/RFLP талдау

Модификацияланған RAPD/RFLP талдауын жүргізу үшін 15 жұп нуклеотид көлеміндегі праймер қолданылды, эндонуклеаза MseI (taa) рестрикция сайтына 3'-ұшынан комплементарлы, энтеробактериялар геномында жиі кездесетін, селективті 3' ұшынан нуклеотид қосылуымен. Праймерді күйдіру жұмсақ температуралық жағдайларда жүргізілді. ПЦР фрагменттері 1,5% агарозды геледе талданды.



4 Сурет – Үлгілерді амплификацияға дайындау.

2.4.1 SpaO ген фрагменттерін амплификациялау

Секвенирлеу әдісімен типтеу үшін *invA* мен *SpaO* гендерінің фрагменттерін амплификациялауға арнайы праймерлер қолданылды.

SpaO генінің амплификациясы үшін *Salmonella* түрлеріне тән келесі құрамдағы праймерлер қолданылды:

- 1) 5'- atg tc(t/a) ttg cgt gtg aga cag-3'.
- 2) 5'- caa agt tag cgc ctt taa caa ac-3'

25 мкл көлемімен реакциялық қоспа құрамында 66мМ Tris-HCl pH 8,3, 16,7 мМ (NH₄)₂SU₄, 0,05 мг/мл БСА, 0,01% Tween-20, 8% глицерин, 1 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTPs, 0,4 мкМ әрбір праймер, 2,5 бірлік/100мкл Taq - полимераза және 10-50 нг ДНК бар.

ПТР келесі бағдарлама бойынша жасалды: 95°C- 1 мин, 55°C-30 секунд, 72°C - 1 мин; циклдар саны-30.

Реакция өнімі 1200 жұп нуклеотид HinfI рестриктазасымен өңделген pUC19 маркер-плазмидаымен 1,5% агарозды геледе талданды.

2.5 *invA* ген фрагменттерін амплификациялау

Ген *invA* фрагменттерін амплификациялау үшін *Salmonella* түріне тән келесі құрамды праймерлер қолданылды:

- 1) 5'- atg gtc ttg teg ccc aga tc-3'.

2) 5'- egg ate tea tta ate aac aat ac-3'.

3) 5'- gta ttg ttg att aat gag ate cg-3'.

4) 5'- gag ate cat caa att age gga-3'.

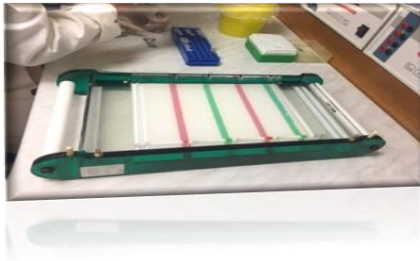
25 мкл көлемімен реакциялық қоспа құрамында 66мМ Tris-HCl pH 8,3, 16,7 мМ (NH₄)₂SU₄, 0,05 мг/мл БСА, 0,01% Tween-20, 8% глицерин, 1 мМ MgCl, 0,2 мМ dNTPs, 0,4 мкМ әрбір праймер, 2,5 бірлік/100мкл Таq - полимераза және 10-50 нг ДНК бар.

ПТР келесі бағдарлама бойынша жасалды: 95°C- 1 мин, 55°C-30 секунд, 72°C - 1 мин; циклдар саны-30.

547 жұп нуклеотид және 648 жұп нуклеотид реакция өнімдері 1,5% агарозды гельде талданған.

ПТР фрагменттерін детекциялау

Амплификация өнімдері 1,5-1,8% агарозды гельде және IX ТБ буферде көлденең электрофорез әдісімен талданды, құрамында 0,25 мкг/мл бромды этидий бар гельде жүреді.



5 Сурет – Электрофорез жүргізу

ДНК концентрациясын анықтау

Rapd/RFLP жүргізу үшін геномдық ДНК концентрациясын және ПТР өнімдерін секвенирлеуді жүргізу үшін флюориметрия әдісімен (Hoefer Scientific instruments) аспабын дайындаушылар нұсқаулығы бойынша жүргізілді.

ДНК секвенирлеу

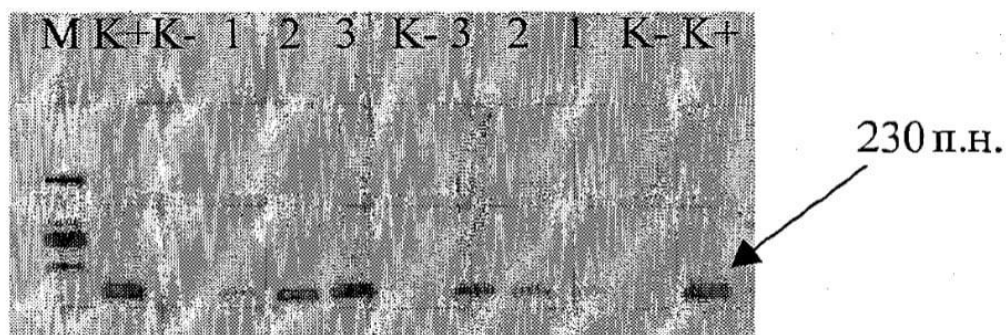
Амплификация фрагменттерін секвенирлеу амплификаторда Сенгер әдісі бойынша циклдық секвенирлеуді қолданумен жүргізілді. Секвенирлеу реакциясы келесі бағдарлама бойынша жүргізілді: 1 минут 96⁰С-та, содан кейін 25 цикл: 96⁰С - 10сек, 55⁰С - 5 сек, 60⁰с - 4 мин және 4⁰С сақтау. Секвенирлеуге арналған праймерлер ретінде ПТР-да пайдаланылған праймерлер қолданылды.

3 ЗЕРТТЕУ НӘТИЖИЕЛЕРІ

3.1 ПТР-ге оңтайлы параметрлерін таңдау

Тест-жүйеде *Salmonella Enterica* бактерияларын анықтау үшін фимбриялардың негізгі суббірлігін кодтайтын *FimA* геніне комплементарлы спецификалық праймерлер қолданылған. Бұл ген *Salmonella Enterica* барлық өкілдерінде бар және ДНҚ амплификациясы үшін таңдалған сальмонеллаға консервативті аймақтары бар.

Әдістемені өңдеу барысында реакцияның сезімталдығы мен ерекшелігін анықтайтын ПТР оңтайлы параметрлері анықталды: праймерлер концентрациясы және Mg (taq-полимераза ферментінің кофакторы) праймерлерді күйдірудің оңтайлы температурасымен амплификация бағдарламасы.



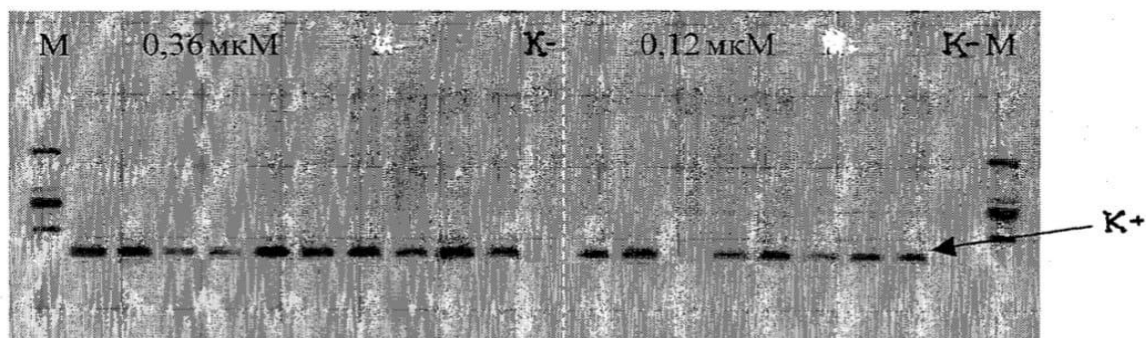
6 Сурет – Mg²⁺ оңтайлы концентрациясын таңдау

Амплификация фрагменттерінің 1.5% агарозды гелдегі электрофореграммасы:

М – маркер өлшемі: 1200 ж.н., 670 ж.н., 550 ж.н., 345 ж.н.;

К+ – ПТР оң бақылауы (ДНҚ *S.typhimurium*) амплификация фрагментінің өлшемі-230 ж.н.;

К- – ПТР теріс бақылауы (ТЕ-буфер), 1,2,3 Mg²⁺ [мМ.] концентрацияда.



7 Сурет – Праймерлердің оңтайлы концентрациясын таңдау.

Амплификация фрагменттерінің 1.5% агарозды гелдегі электрофореграммасы:

М – маркер өлшемі: 1200 ж.н., 670 ж.н., 550 ж.н., 345 ж.н.; 0,12 мкМ мен 0,36 мкМ - праймерлердің тест концентрациялары;

К- – ПТР теріс бақылауы

6–сурет ПТР өнімі санының реакциядағы Mg иондарының концентрациясына тәуелділігін бейнелейді. Экспериментте *S.enteritidis* ДНҚ-сы ПТР реакциясына ДНҚ 5 көшірмесі мөлшерінде қолданылған.

ПТР-да Mg²⁺ иондарының саны 0,5 мМ-ден 3,5 мМ-ге дейін өзгеруі мүмкін. Концентрация ұлғайған кезде, әдетте, реакция өнімі концентрациясының артуы байқалады, бұл осы жағдайға да тән.

Алайда, кейбір праймерлер үшін кофактор концентрациясының артуы реакциялардың күшеюі есебінен өнімнің концентрациясының төмендеуіне әкелуі мүмкін. Қосымша спецификалық емес фрагменттерсіз реакцияның өнімінің жоғары шығуын қамтамасыз ететін тестіленетін праймерлер үшін Mg²⁺ оңтайлы концентрациясы 3мМ таңдалды.

ПТР маңызды параметрі праймерлердің оңтайлы концентрациясы болып табылады, өйткені олардың жетіспеушілігі реакцияның сезімталдығын төмендетеді, ал олардың артық болуы спецификалық емес реакция өнімдерінің пайда болуына әкелуі мүмкін.

7 - суретте ПТР-да праймерлердің оңтайлы концентрациясын таңдау бойынша эксперимент нәтижелері көрсетілген. Экспериментте *S.enteritidis* ДНҚ көлемі 25 мкл болатын реакцияға ДНҚ-ның 5 көшірмесі мөлшерінде қолданылды. Эксперимент 0,36 мкМ праймерлердің концентрациясы кезінде ДНҚ реакция (10 қайталауда 100%) ПТР-5 гэ (геномдық эквиваленттер немесе көшірмелер) оңтайлы сезімталдығына қол жеткізетінін көрсетті.

Осылайша, реакциялық қоспаның келесі оңтайлы құрамы анықталды: 66мМ Tris-HCl рН 8,3, 16,7 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,05 мг/мл BSA, 0,01% Tween-20, 8% глицерин, 3 мМ MgSO₄, 0,2 мМ dNTPs, 0,36 мкМ әрбір праймер, 2,5 бірлік/100мкл Taq-полимераза, реакция 25 мкл көлемінде жүргізіледі. Амплификация бағдарламасы 1-кестеде көрсетілген. InvA и SpaO сальмонелл гендерінің фрагментін амплификациялау үшін тәжірибелік жолмен таңдалған күйдіру температурасы 65°C құрады.

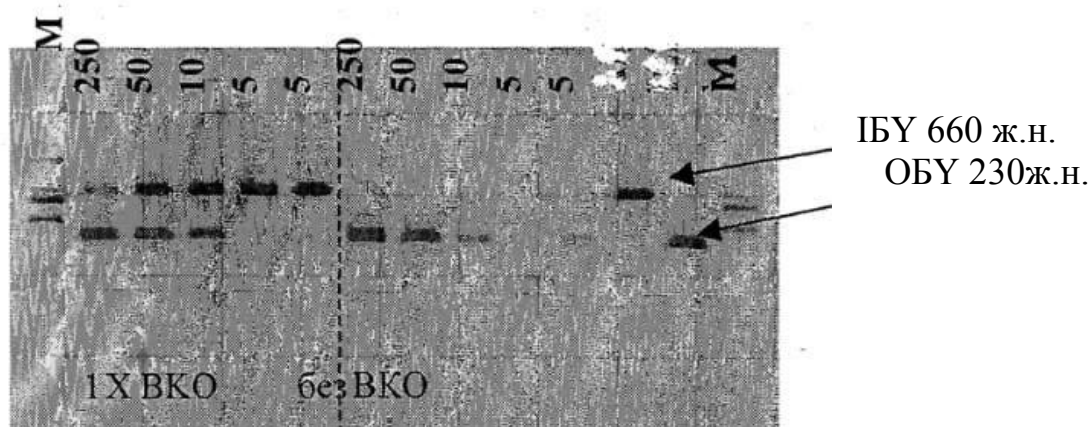
ПТР ерекшелігіне қол жеткізуге мүмкіндік беретін маңызды фактор «ыстық старт» қолдану болып табылады. Бұл ретте ПТР компоненттері реакция басталғанға дейін «жоғарғы» және «төменгі» қоспаларға бөлінген, ол қыздыру кезінде бұзылады. ПТР үшін дайындалған «ыстық старт» әсеріне жету үшін пробиркаларды 95 °C дейін қыздырылған амплификатор блогына (үзіліс кезінде) орнатады. Осылайша, реакциялық қоспаның компоненттері праймерлерді спецификалық емес күйдіру және праймерлер димерлерінің, сондай-ақ ПТР спецификалық емес фрагменттерінің түзілуін болдырмайтын температурада қосылады.

1 Кесте – FimA генін амплификациялауға арналған бағдарлама

Белсенді реттегіштері бар амплификаторлар (пробиркадағы ерітінді көлемі бойынша): «Nexus» амплификаторы				
Қадам	Атауы	Температура	Уақыт	Цикл саны.
0	Үзіліс «ыстық старт»	95 °С		
1	ДНҚ денатурациясы	95 °С	2 минут	1
2	ДНҚ денатурациясы	95 °С	10 секунд	42
	Праймерді күйдіру	65 °С	10 секунд	
	ДНҚ элонгациясы	72 °С	10 секунд	
3	ДНҚ элонгациясы	72 °С	1 минут	1
4		10 °С	Сақтау	

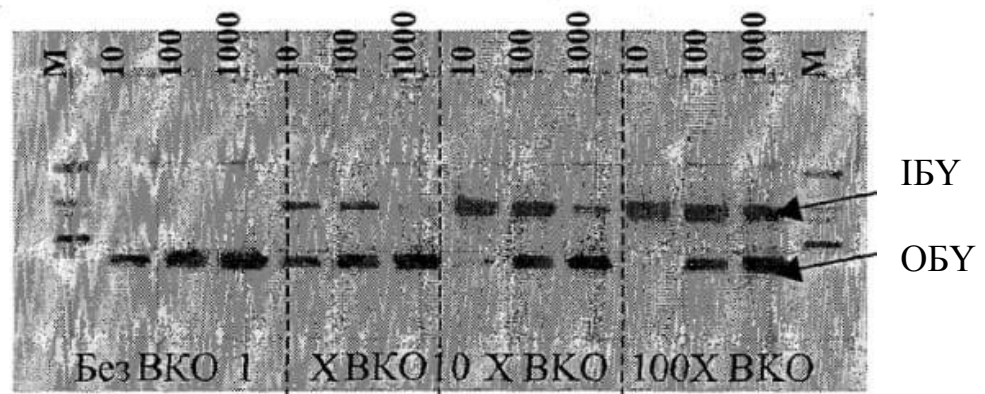
ДНҚ ішкі бақылау үлгісін құру (ІБҮ)

Талдау сапасын бақылауды қамтамасыз ету үшін құрастырылған әрбір сынамаға қосылатын ДНҚ (ІБҮ) ішкі бақылау үлгісі ДНҚ бөлу сапасын бақылау үшін ДНҚ бөлу кезеңінде және әрбір сынамада ПТР жүргізуге қолданылады. ІБҮ-да гендік инженерлік құрылыс - *EcoRI* сайты бойынша фаг *λgt10* клондалған фрагмент. *Fim* ½ амплифицирленген праймер өлшемі 660 ж.н. ІБҮ фрагменті. ПТР процесінде оның амплификациясы кезіндегі артықшылығы: керек нысанамен араласып кету қаупі жоқ. ІБҮ жұмыстағы концентрациясы клиникалық материалдан ДНҚ бөлінген кезде ІБҮ тұрақты тестіленуі ПЦР сезімталдығын төмендетпейтіндей іріктелді, ол ПТР-да ДНҚ-ның 10 геномдық эквивалентін құрайды.



8 Сурет – ІБҮ енгізу кезінде тест-жүйенің сезімталдығын анықтау

ПЦР өнімдерінің 1,8% агарозды геледегі электрофореграммасы: М - маркер мөлшері: 1200 ж.н., 670ж.н., 550ж.н., 345ж.н.; ОБҮ - ДНҚ -ның оң бақылау үлгісі, 5, 10, 50, 250-ПЦР-дағы гЭ саны; ІБҮ-ДНҚ ішкі бақылау үлгісі; 1X - ІБҮ жұмыс концентрациясы



9 Сурет – ПЦР-да ІБҮ артық қосумен ОБҮ бәсекелестігін тексеру

ПЦР өнімдерінің 1,8% агарозды геледегі электрофореграммасы: М - маркер мөлшері: 1200 ж.н., 670ж.н., 550ж.н., 345ж.н.; 10, 100, 1000 - ПЦР-дағы ОБҮ гә саны; 1Х, 10Х, 100Х - ПТР-дағы ІБҮ саны

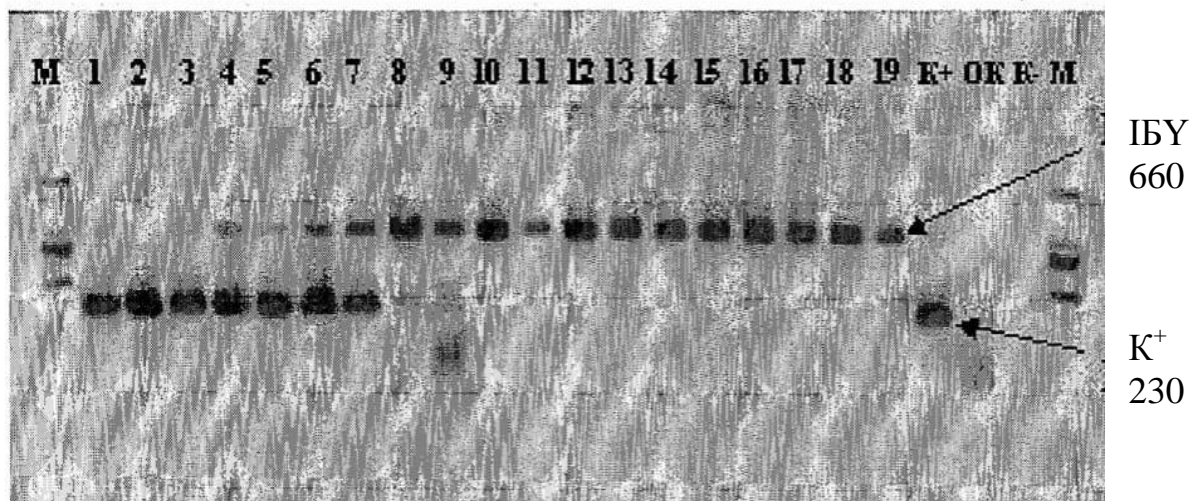
8 – суретте үлгілерді тестілеу нәтижелері көрсетілген, құрамында ОБҮ бар, (ДНҚ *S. enteritidis* геномы) ІБҮ қосумен белгіленген жұмыс концентрациясында. Гельдің оң жағында ОБҮ сынамаларының ПТР фрагменттері жазылған, ДНҚ бөлініп шығу ІБҮ-сыз жүргізілген. Құрамында ОБҮ 250, 50 және 10 геномдық эквивалентте бар жолдарда 230ж.н. тізбек кездеседі, ОБҮ 5 геномдық эквиваленті бар жолда 230ж.н. тізбек кездеспейді, яғни ІБҮ қосылмай ДНҚ *s. enteritidis* тест - жүйесінің сезімталдығының шегі 10 геномдық эквивалент болып табылады. Гельдің сол жағында ОБҮ сынамаларының ПТР фрагменттері жазылған, ДНҚ бөлу ІБҮ пайдалануымен жүргізілді. ІБҮ енгізу кезінде тест-жүйенің сезімталдығы төмендемейді және де ПТР сынамасында *S. enteritidis* ДНҚ-ның 10 геномдық эквивалентін құрайтынын көруге болады.

9 – суретте ПТР ықтимал тежелуі талдауының нәтижелері көрсетілген ІБҮ артық кезде. Тестілеу нәтижелері ІБҮ 100Х концентрациясында тест - жүйесінің сезімталдығы ПТР сынамасында шамалы ауытқуын көрсетті. ДНҚ бөлінгеннен кейін ІБҮ осы концентрациясын алуға болмайды. ПТР-дың нақты жағдайында ІБҮ-ны пайдалану реакцияны тежеуге, тест-жүйенің сезімталдығын төмендеуге әкелуі мүмкін емес.

3.2 Тест-жүйелердің аналитикалық ерекшелігі мен сезімталдығын анықтау

Тест – жүйенің аналитикалық ерекшелігі мен сезімталдығы суспензия үлгілер панелінде анықталды, олар *Salmonella* коллекциялық штаммдар мен басқа микроорганизмдер, сондай-ақ фекалидің бактериялық фракцияларының үлгілерінен алынды.

Үлгілерді тестілеу нәтижелері 10-суретте көрсетілген. Мұнда: *Salmonella* коллекциялық штамдары мен басқа микроорганизмдер. 1-7 жолдарда 230 ж.н. тізбек болуы үлгілерде сальмонелла ДНҚ-сы болуын көрсетеді. Ал 8-19 жолдарда 230 ж.н. тізбегі жоқ.



10 Сурет – Тест - жүйенің аналитикалық ерекшелігі мен сезімталдығын анықтау

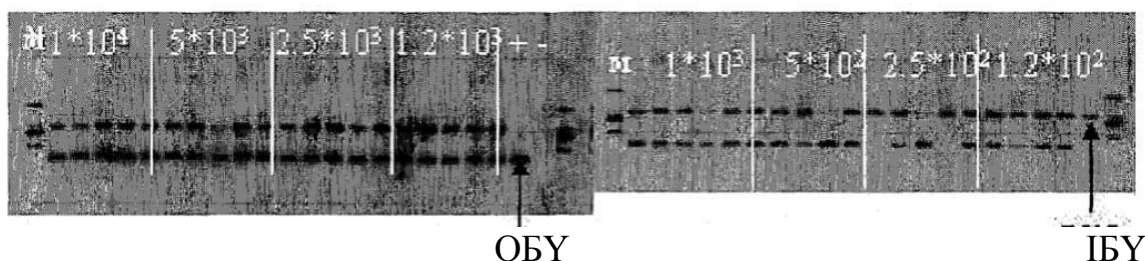
ПЦР өнімдерінің 1,8% агарозды геледегі электрофореграммасы: М - маркер мөлшері: 1200 ж.н., 670ж.н., 550ж.н., 345ж.н.; 1-*S.enteritidis*, 2 - *S.choleraesuis*, 3-*S. typhimurium*, 4 - *S.dublin*, 5 - *S.typhi*, 6- *S.abortusovis*, 7 - *S.gallinarum-pullorum*, 8 - *Shigella Flexneri*, 9 - *Campylobacter Fetus*, 10 - *Campylobacter Jejuni*, 11-*Klebsiella SW4*, 12- *E. coli*, 13 - *Listeria monocitogenes*, 14 - *Proteus vulgaris*, 15-*Pseudomonas aeruginosa*, 16 - *Staphilococcus aureus*, 17 - *E.coli OIII*, 18-*Morganella Morganii*, 19 - *Enterobacter faecalis*.; К+ - ПТР оң бақылауы; ОК-микроорганизмдердің теріс бақылауы; К- ПТР теріс бақылауы (ТЕ-буфер).

Тест жүргізілетін штамдардың суспензияларынан ДНҚ бөлуге ІБҮ пайдаланылды, оның амплификациядан кейін көлемі 660 ж.н. фрагмент құрайды. Электрофореграммада 6-19 жолдарда бейнеленген. Сынамадағы ІБҮ фрагментінің болуы ДНҚ бөлінуінің және ПТР реакциясының дұрыс жүргізілгенін көрсетеді. ІБҮ әлсіз амплифицирленуі немесе сынамадарда мүлдем болмауы мүмкін, егер сынамада сальмонелла ДНҚ-сы көп мөлшерде болған жағдайда. Панелде аналитикалық сезімталдықты тестілеу кезінде *Salmonella* коллекциялық штамдарының сигналы барлық жағдайларда 100% алынған.

Тест-жүйенің аналитикалық сезімталдығының шегін анықтау

Аналитикалық сезімталдықтың шегін анықтау үшін әзірленген әдістемелермен үлгілер панелін тестілеу жүргізілді. Тестілеуде фосфат буферінде дайындалған сальмонелла ДНҚ-лары мен құрамында сальмонелла жоқ фекалий сынамадары қолданылды. *S.enteritidis* R6 және *S.gallinarum*-

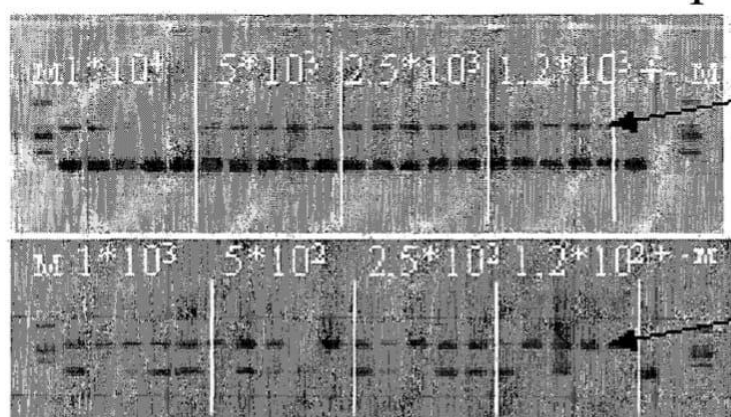
pullorum Gallii штамдар суспензиясының концентрациясын анықтау үшін «ұя» ПТР екі пар праймер қолданылатын, *Salmonella spp* рестрикциялық фрагментінің ген учаскесін амплификациялайтын тәсіл қолданылды [Aabo S. et al., 1992.]. Әрбір үлгі бес рет сыналды. Фосфат буферінде үлгілер панелін тестілеу нәтижелері 11-суретте көрсетілген. Амплификацияның фрагменті 1 мл үлгідегі *Salmonella* ДНК геномдық эквиваленттері бар үлгіні тестілеу кезінде 100% жағдайда байқалды. Осылайша, фосфатты буфердегі тест-жүйенің аналитикалық сезімталдығы *Salmonella* ДНК-ның 5 геномдық эквивалентінде болды.



11 Сурет – Тест-жүйенің аналитикалық сезімталдығын анықтау

Амплификация өнімінің 1,8% агарозды геле электрофореграммасы: М - маркер мөлшері: 1200 ж.н., 670ж.н., 550ж.н., 345ж.н.; + - ПТР оң бақылауы; - - ПТР теріс бақылауы; $1 \cdot 10^4$ - $1,2 \cdot 10^2$ - *S. enteritidis* S-6 /мл ДНК гә саны.

Бактериялық дақылдарды өсірудің тестілеу нәтижелері 12-суретте көрсетілген. Амплификация фрагменті құрамында ДНК *Salmonella* $1 \cdot 10^4$ -ден $1,2 \cdot 10^3$ -ге дейін ДНК-ның геномдық эквиваленті бар 100% сынамаларда байқалды. Сонымен, тест-жүйенің аналитикалық сезімталдығы *Salmonella* ДНК-ның $1 \cdot 10$ геномдық эквивалентіне тең болды.



12 Сурет – Тест-жүйенің аналитикалық сезімталдығын анықтау

Амплификация өнімінің 1,8% агарозды геле электрофореграммасы: М - маркер мөлшері: 1200 ж.н., 670 ж.н., 550 ж.н., 345 ж.н.; + - ПТР оң бақылауы; - - ПТР теріс бақылауы; $1 \cdot 10^4$ - $1,2 \cdot 10^2$ - *S. enteritidis* S-6 /мл ДНҚ гә саны.

3.3 Сальмонелл штамдарын молекулалық-генетикалық типтеу

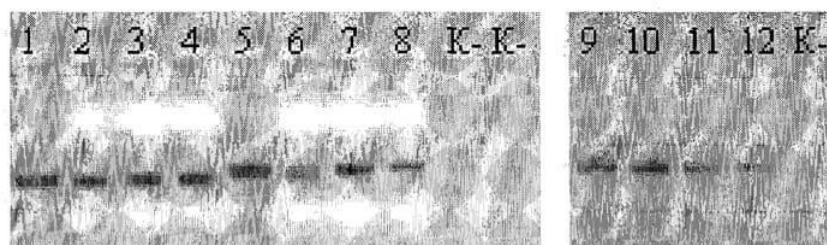
Сальмонелла геномы бір сақиналы 4,8 млн. ж.н. хромосомадан және 3-тен 100 ж.н. дейінгі әртүрлі плазида көшірмелерінен тұрады. ДНҚ/ДНҚ гибридизациясын зерттеу деректері сальмонелл түрлі штамдары геномдарының гомология қасиетіне ие, бұл олардың көпшілігін *Salmonella enterica* бір түріне жатқызуға мүмкіндік береді және *Salmonella* 2 туыстан құралады деген жіктемені растайды: *enterica* және *bongori*.

Серотип деңгейінде сальмонеллалар генетикалық типтеуін жүргізу үшін ДНҚ секвенирлеу әдісі пайдаланылды. Әдіс нуклеотидті тізбектер бойынша салыстыру жүргізеді және RAPD/RFLP модифицирленген әдісі штамдарды геном деңгейінде салыстырады.

ДНҚ секвенирлеу әдісімен генетикалық типтеу

Salmonella штамдарының генетикалық туыстығына қатысты маңызды ақпаратты инвазия гендерінің - хромосома сегментін зерттеу береді. Бұл аудан көлемі 40 ж.н. 15-тен астам гендерді кодтайды, олардың өнімдері эпителиалды жасушалар арқылы сальмонелл инвазиясы үшін қажет. Олардың ішіндегі ең танымалдары: *invA*, *invE*, *sraO*, *sraP*, *sraQ*. Типтеу үшін ең қолайлы болып табылады *SPAO* протеині мен *invA* генін кодтайтын ген, өйткені олар сальмонеллге тән. Мысалы, сальмонелланың *sraO* ген нуклеотидті тізбектері энтеробактерияның гендерімен тек 24%-ы ұқсас. Осы зерттеуді жүргізуге вариабельді фрагменттерді амплификациятын, секвенирлейтін праймерлер таңдалды.

13 – суретте амплификация фрагменттерінің электрофореграммалары көрсетілген. Амплификация параметрлері амплификацияланатын фрагмент таза алынуына негізделді, яғни секвенирлеу алдында амплификация өнімдерін қосымша тазартуды талап етпейтіндей.



13 Сурет – *invA* және *sraO* гендердің 1,8% агарозды гелегі амплификация өнімінің электрофореграммасы

1-4 - 5' амплификация фрагменттері- invA 547ж.н. ген соңы; 5-8 - 3' амплификация фрагменттері- invA 648ж.н. ген соңы; 9-12-амплификация фрагменттері SpaO гені 1200ж.н.; К - - ПТР теріс бақылауы (ТЕ-буфер).

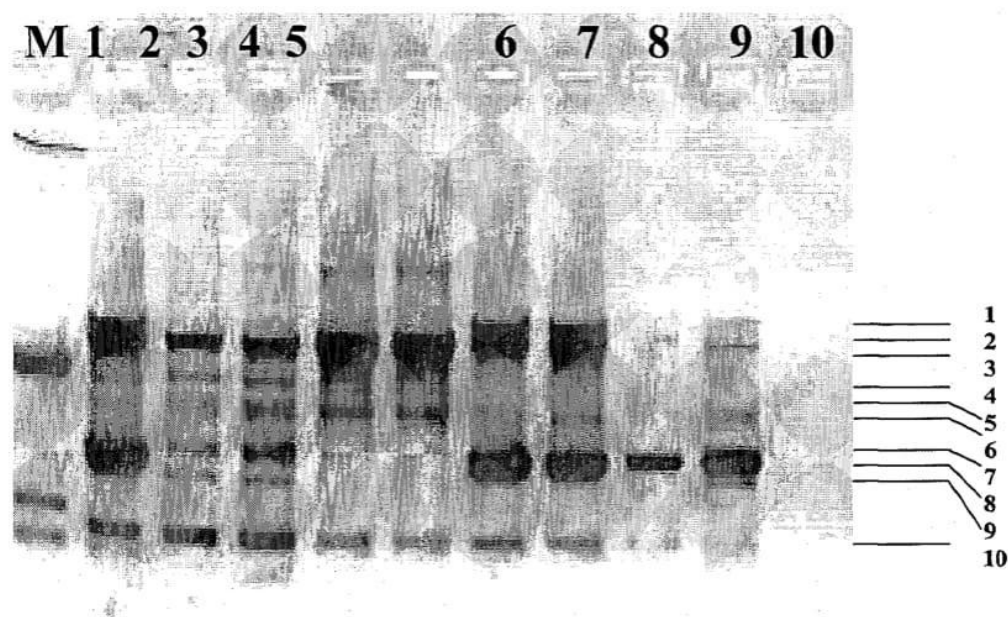
Rapd/RFLP әдісімен генетикалық типтеу

Біз қолданған модификацияланған RAPD/RFLP әдісі сальмонелла штамдарын сероварлар деңгейінде дифференциациялауға мүмкіндік берді. Бұл зерттеу үшін энтеробактерияның геномында жиі кездесетін MseI (ttaa) 15 ж.н. көлеміндегі праймер құрастырылды. Отжиг жұмсақ температуралық жағдайларда жүргізілді. Rapd әдісте микроорганизмдердің геномдық ДНҚ амплификациясы әдетте мөлшері 100-ден 2000 ж.н. дейінгі фрагменттер жиынтығын береді. Біздің сальмонелла штамдарының ДНҚ зерттеулерінде 450-ден 3000 ж.н. дейінгі фрагменттер жиынтығы алынды. Әдістемені өңдеу кезінде біз RAPD талдауының нәтижелерін алуға ПТР үшін буферлік реакциялық қоспасын дайындауда концентрация сақтау өте маңызды деген қорытындыға келдік, әсіресе Mg²⁺ концентрациясына қатысты, зерттелетін үлгілер барлық ДНҚ мөлшері бірдей болуы тиіс, реакция көлемі 25 мкл. Амплификация бағдарламасы 2 - кестеде көрсетілген.

2 Кесте - RAPD/RFLP бағдарламасы

Белсенді реттегіштері бар амплификаторлар (пробиркадағы ерітінді көлемі бойынша): (технологиясы).				
Қадам	Атауы	температура	уақыт	Цикл саны
1	үзіліс «ыстық старт»	95°C	2 минут	1
2	ДНҚ денатурация	95°C	1 минут	35
	Праймеров күйдіру	36°C	1 минут	
	ДНҚ элонгация	72°C	1 минут	
3	ДНҚ элонгация	72°C	7 минут	1
4	Сақтау	10°C	Сақтау	

Өзгертілген сальмонелл штамдарының тестілеу нәтижелері RAPD/RFLP әдісімен 14 - суретте көрсетілген. Егер амплификацияның барлық пайда болған фрагменттері кему тәртібімен нөмірленсе, онда әрбір штам үшін RAPD немесе оған тән фрагменттер жиынтығын қалыптастыруға болады. Әрбір серотипке көлемі мен қарқындылығы бойынша ерекшеленетін амплификация фрагменттерінің жиынтығы тән, яғни RAPD - профилі сәйкес келеді. Бұл ретте, байқалатын фрагменттердің арасында барлық штамдарға ортақ және тек белгілі бір сальмонелл сероварына тән фрагменттер бар.



14 Сурет – RAPD/RFLP әдісін пайдалану нәтижелері

Амплификация фрагменттерінің 1.5% агарозды гелдегі электрофореграммасы: М-маркер өлшемі: фрагменттер (жоғарыдан төмен) 1500ж.н., 520ж.н., 400ж.н, рестрикция (pUC19) кезінде алынған; 1- *S.typhimurium* 3, 2- *S.choleraesuis* 370, 3- *S.choleraesuis* TS177, 4- *S. gallinarum-pullorum* Tn10, 5- *S. gallinarum-pullorum*, 6- *S.enteritidis* 204, 7- *S.enteritidis* R6, 8- *S. dublin* 6, 9- *S.abortusovis* 125. 10 - теріс бақылау-ДНҚ (TE буфер).

Бір серотипке қатысты штаммдарда бірдей RAPD-профиль: *S.typhimurium*- 1,3,4,5,8,10, *S.choleraesuis*-2,7,9,10, *S.gallinamm-pullorum*-2,5,10, *S.enteritidis* - 1,3,6,8,10, *S.dublin* - 2,7,8,10, *S.abortusovis* - 2,6,8,9,10.

Осылайша, ұсынылған RAPD/RFLP белгісіз талданатын штаммның қай серотипке жататындығын анықтауға мүмкіндік береді.

ҚОРЫТЫНДЫ

Әдебиет талдауы көрсеткендей полимеразды тізбекті реакция жұқпалы аурулар қоздырғыштарын ДНҚ көшірмелерінің санын бірнеше рет көбейту есебінен анықтауға мүмкіндік беретін, орындау жылдамдығы мен қарапайымдылықты біріктіреді, сондай-ақ жоғары сезімталдығы бар, сондықтан қазіргі уақытта ең жетілдірілген диагностикалық әдіс болып табылады. Бұл жұмыста фимбрияның негізгі суббірлігін кодтайтын *FimA* генінің фрагменті пайдаланылды, ол Cohen атап өткендей *Salmonella enterica* барлық өкілдерінде кездеседі және сальмонеллге тән бірегейлігі бар. Осылайша, олар *S.pullorum* сияқты жгутіктері жоқ серотоптарда бұл ген міндетті түрде кездесетінін көрсетті, демек, ПТР көмегімен анықтауға болады. Жұмыс барысында әртүрлі серотоптар мен сероварлардың 376 сальмонелл штаммдары, сондай-ақ басқа микроорганизмдердің 15 штаммдары сыналды. Зерттеу 100% ерекшелігін көрсетті, яғни сальмонелланың барлық штаммдарын тестілеуде оң нәтижелер алынды, басқа түрдегі микроорганизмдердің ДНҚ тестілеу кезінде жалған нәтижелер тіркелген жоқ. Біздің зерттеулерде *FimA* генінің өз праймерлерін пайдалана отырып жүргізгенде, жалған немесе күмәнді нәтижелер болған жоқ талдаудың сезімталдығы 100%. Сондай-ақ талдаудың аналитикалық сезімталдығының жоғары $-1 \cdot 10$ ДНҚ *Salmonella* геномдық эквиваленттері тестіленетін үлгінің 1мл (нәжіс, тауық ұшасы) немесе ПТР сынамасында 20 гә көрсетті.

НӘТИЖЕ

1 Әдебиет талдауы көрсеткендей полимеразды тізбекті реакция жұқпалы аурулар қоздырғыштарын ДНҚ көшірмелерінің санын бірнеше рет көбейту есебінен анықтауға мүмкіндік беретін, орындау жылдамдығы мен қарапайымдылықты біріктіреді, сондай-ақ жоғары сезімталдығы бар, сондықтан қазіргі уақытта ең жетілдірілген диагностикалық әдіс болып табылады.

2 Біздің зерттеулерде АҚШ-тың «Salma» фирмасының шетелдік праймерлерін пайдалана отырып, гендік FimA, Inv, Spa-да жалған нәтижелер болмағанын, талдаудың 100% ерекшелігі мен сезімталдығын көрсетті. Сондай-ақ, сыналатын үлгінің 1 мл Salmonella ДНҚ $1 \cdot 10^3$ геномдық эквиваленттеріне тең аналитикалық сезімталдықтың жоғары шегі (құстардың ұшасы, құстардың нәжісі) көрсетілді.

3 Шетелдік тест - жүйенің көмегімен 10 құс ұшасы, 25 фекалий үлгісі талданды. Соның ішінде сальмонеллалар: 10 ұшаның 6-да, 25 фекалий үлгісінің 9-да табылды.

ПАЙДАЛАНЫЛҒАН ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

- 1 Говорун В.М. Молекулярная диагностика и генотипирование *Helicobacter pylori* в биопсиях слизистой оболочки желудка / В.М.Говорун, А.Е. Гуцин, В.А. Исаков // Росс, журнал гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. - 2000. - № 2. - С. 12-15.
- 2 Шагинян Н.А. Идентификация и типирование патогенных бактерий: современные подходы // Вест. РАМН. -2000. - № 1. - С. 22-28.
- 3 Блохина И.Н. Систематика бактерий (с основами геносистематики./ И.Н. Блохина, Г.Ф. Леванова, А.С. Антонов. - Нижний Новгород.: Б.и., 1992. - 170 с.
- 4 Блохина И.Н. Первичная структура ДНК и прикладная геносистематика бактерий с основами молекулярной эпидемиологии / И.Н. Блохина, Г.Ф. Леванова, В.Н. Мазепа // Материалы 2 съезда биохимического общества РАН. - Пушино, 1997. - С.101.
- 5 Батурин В.В. Использование метода молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот для экспресс-дагностики гриппа / В.В. Батурин // Вопросы вирусологии. - 1985. - Т. 30, № 5. - С. 540-544.
- 6 Грановский Н.Н. Обнаружение ДЕК вируса гепатита В методом молекулярной гибридизации у HBs-антигеноносителей и больных анемиями. / Н.Н.Грановский // Вопросы вирусологии. - 1986. - Т.31, № 4. - С. 449-451.
- 7 Keller G.H. DNA probes / G.H. Keller, M.M. Manac // Macmillan Pubiishers Ltd., England , 1993. - 660 p.
- 8 Isenberg H.D. Clinical microbiology procedures handbook / H.D.Isenberg. - American Society for microbiology, Washington: D.C, 1992. - 540 p.
- 9 Новое в клонировании ДНК. Методы / Под ред. Д. Гловера. - М.: Мир, 1989. - 366 с.
- 10 Анализ генома. Методы / Сб. ст. под ред. К. Дейвиса. - М.: Изд-во Мир, 1990. - 247 с.
- 11 Newton C.R. PCR, 2-nd ed. / C.R. Newton, A. Graham. - Bios Scientific Publishers, Oxford, England, 1997. - 190 p.
- 12 Дубинина И.Г. Метод полимеразной цепной реакции в лабораторной практике / И.Г. Дубинина, С.Н. Щербо, В.Б. Макаров // Клиническая лабораторная диагностика. - 1997. - № 7. - С. 4-6.
- 13 Мазепа В.Н. Опыт использования ПЦР-диагностики в санитарно-эпидемиологической практике / В.Н. Мазепа, Н.Ф. Бруснигина, О.М.Черневская и др. // Материалы межрегиональной научно-практической конференции «Экология и здоровье».- Н. Новгород, 1998. - С. 18.
- 14 Радюк С.Н. Полимеразная цепная реакция в диагностике туберкулеза /Н.Радюк, Г.Р. Марцевич // Клиническая лабораторная диагностика. - 1997. -№ 7. -С. 11-13.
- 15 Мазепа В.Н. Метод ПЦР диагностики в обследовании новорожденных и детей первого года жизни при риске внутриутробного инфицирования. Методические рекомендации / В.Н. Мазепа, Н.Ф. Бруснигина, О.М. Черневская и др. - Н. Новгород: 2000.- 15 с.

16 Щербо С.Н. Диагностика хламидийной и гонококковой инфекций методом полимеразной цепной реакции./ С.Н. Щербо, В.Б. Макаров, И.Г. Дубинина //Клин, лабор. диагностика. - 1997. - № 7. - С. 7-9.

17 Diagnostic molecular microbiology: principles and applications./ Ed. by D.H. Pershing. - American society for microbiology.- Washington: DC, 1993. - 664 p.

18 Мазепа В.Н. Опыт работы центра индикации, идентификации и таксономии Нижегородского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной. / В.Н. Мазепа, Н.Ф. Бруснигина, О.М. Черневская и др //Материалы международной конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы медицинской биотехнологии», посвященной памяти академика РАМН И.Н. Блохиной.- Москва, 2000. - С. 64.

19 The PCR technique: RT-PCR. /Ed. by P.Siebert. - Eator publishing Natick, MA, 1998.-330 p.

20 Медицинская лабораторная диагностика. Программы алгоритмы. / Под ред. А.И. Карпищенко. - СПб.: Интермедика, 1997. - 296 с.

21 Белохвостов А.С. Полимеразная цепная реакция и лигазные реакции, принципы, традиционные методики и нововведения / А.С. Белохвостов // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. - 1995. - № 2. -С.2125.

22 Cao X. Real-time TaqMan polymerase chain reaction assays for quantitative detection and differentiation of *Ureaplasma urealyticum* and *Ureaplasma parvum* / X. Cao, Y. Wang, X. Hu et al. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. - 2007. - Vol. 57, № 4. - P. 373-378.

23 Ito K. Genetic analysis of *Shigella* pathogenesis and rapid detection method of *Shigella* virulence gene by the polymerase chain reaction / K. Ito, H. Watanabe, M. Toyosato // Nippon Rinsho. - 1992. - Vol. 50. - P. 368-372.

24 Jackson M.P. Detection of Shiga toxin-producing *Shigella dysenteriae* type 1 and *Escherichia coli* by using polymerase chain reaction with incorporation of digoxigenin-11-dUTP / M.P Jackson // J. Clin. Microbiol. - 1991. - Vol. 29, №9. - P. 1910-1914.

25 Luscher D. Detection of shigellae, enteroinvasive and enterotoxigenic *Escherichia coli* using the polymerase chain reaction (PCR) in patients returning from tropical countries / D. Luscher, M. Altwegg // Mol. Cell. Probes. - 1994. - Vol. 8, №4.-P. 285-290.

26 Meng J. A multiplex PCR for identifying Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* 0157:H7 / J. Meng, S. Zhao, M.P. Doyle et al. // Lett. Appl. Microbiol. - 1997. - Vol. 24, № 3. - P. 172-176.

27 Belanger S.D. Rapid detection of Shiga toxin-producing bacteria in feces by multiplex PCR with molecular beacons on the smart cycler / S.D. Belanger, M. Boissinot, C. Menard // J. Clin. Microbiol. - 2002. - Vol. 40, № 4. - P. 1436-1440.

28 Aabo S. Salmonella identification by the polymerase chain reaction./ S. Aabo, O.F. Rasmussen, L. Rossen et al. // Molecular and Cellular probes. - 1993. - Vol. 10, №3-P. 171-178.

29 Altwegg B. Molecular biology detection and antibiotic sensitivities of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) in patients returning from

the tropics./ B. Altwegg, I. Perschil, E. Gruner // Schweiz Rundsch Med Prax. - 1997. -Vol. 86, № 9 - P. 348-351.

30 Way J.S. Specific detection of Salmonella spp. by multiplex polymerase chain reaction / J.S. Way, K.L. Josephson, S.D. Pillai et al. // Appl. Environ. Microbiol. - 1993.-Vol. 59, №5.-P. 1473-1479.

31 Abu Elamreen F.H. Detection and identification of bacterial enteropathogens by polymerase chain reaction and conventional techniques in childhood acute gastroenteritis in Gaza, Palestine / F.H. Abu Elamreen, A.A. Abed, F.A. Sharif // Int. J. Infect. Dis. - 2007. - Vol. 11, № 6. - P. 501-507.

32 Mao H. Rapid detection of three foodborne pathogenic bacteria by multiplex polymerase chain reaction-capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detector / H. Mao, Y. Li, X. Pei et al. // Se. Pu. - 2007. - Vol. 25, № 4. . p. 473-477.

33 Anvikar A.R. Role of Escherichia coli in acute diarrhoea in tribal preschool children of central India./A.R. Anvikar, C. Dolla, S. Dutta et al. // Paediatr. Perinat. Epidemiol. - 2008. - Vol. 22, № 1.-P.40-46.

34 Sethabutr O. Detection of Shigellae and enteroinvasive Escherichia coli by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery / O. Sethabutr, M. Venkatesan, G.S. Murphy et al. // J. Infect. Dis. - 1993.-Vol. 167, №2.-P. 458-461.

35 Paniagua G.L. Two or more enteropathogens are associated with diarrhoea in Mexican children / G.L. Paniagua, E. Monroy, O. Garcia-Gonzalez et al. // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. - 2007. - Vol. 6, № 1. - P. 17-18.

36 Vantarakis A. Development of a multiplex PCR detection of Salmonella spp. and Shigella spp. in mussels / A. Vantarakis, G. Komninou, D. Venieri // Lett. Appl. Microbiol. - 2000. - Vol. 31, № 2. - P. 105-109.

37 Подколзин А.Т. Изучение этиологии острых кишечных инфекций у детей, госпитализированных в инфекционные отделения стационаров города Москвы / А.Т. Подколзин, А.А. Мухина, Г.А. Шипулин и др. //Генодиагностика инфекционных болезней. - Москва, 2004. - Т.2. - С. 106-108.

38 Islam M.S. Detection of Shigellae from stools of dysentery patients by culture and polymerase chain reaction techniques / M.S. Islam, M.S. Hossain, M.K. Hasan et al. // J. Diarrhoeal. Dis. Res. - 1998. - Vol. 14, №4. -P. 248-251.

39 Афанасьев А.Ю. ИФА-диагностика в разграничении гепатита С острого и хронического течения / А.Ю. Афанасьев, С.В. Зубов, Ю.Е. Жданов и др. // Росс, журнал гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. - 1995. - Т. 5, № 3. - (Прилож. 1). - С. 12.