

« М.А. Гендельманнның 110 жылдығына арналған «Сейфуллин окулары – 19» халықаралық ғылыми-практикалық конференциясының материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения – 19», посвященной 110 - летию М.А. Гендельмана» - 2023.- Т.І, Ч.ІІ.- С.218-221

ТЕХНОЛОГИЯ ДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ МАСТИТА КРС STAPHYLOCOCCUS AUREUS НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

УДК 636.09:579.861.2(043.2)

*Зейнулин М.Қ. магистрант Курса
Казахский агротехнический исследовательский
университет им. С. Сейфуллина, г. Астана*

Мастит – это заболевание вымени и молочных желез, характеризующееся патологическими изменениями в области секрета и ткани молочных желез. Субклинический мастит – вид мастита, при котором внешние признаки заболевания выражены слабо или полностью отсутствуют. При подобных случаях заболевания патологические процессы в молочных железах происходят слабее. В редких случаях они могут вызывать уплотнения ткани вымени, но чаще подверженные заболеванию области уменьшаются в объеме с пониженным тургором ткани. Качество производимого молока у пораженных коров изменяется, а также понижается его количество. Диагностика субклинических маститов основывается на обнаружении данных изменений [1].

Возбудителями мастита у крупного рогатого скота могут являться как организмы бактериального (*Staphylococcus aureus*, spp; *Streptococcus uberis*, *agalactiae*, *dysgalactiae*; *Escherichia coli*; *Mycoplasma* spp и др.) так и грибного происхождения (*Aspergillus* spp; *Candida*; *Cryptococcus neoformans*). У заболевшего поголовья скота выявляются нетипичные показатели производимого молока. Другим признаком является повышение соматических клеток в количестве. Лечение антибиотиками вызывает благоприятный эффект при заболевании грамположительными организмами. Вызванные микоплазмами симптомы особенны тем, что происходит одновременное поражение нескольких четвертей вымени животного, а также отеки суставов. Антибиотикотерапия слабо эффективна в отношении большинства патогенных микоплазм. Лечение может отсутствовать в случаях заражения распространенным возбудителем мастита *M. Bovis* [2].

Золотистый стафилококк (лат. *Staphylococcus aureus*) на сегодняшний день является возбудителем опасных заболеваний как животных так и человека. Данный микроорганизм может быть обнаружен во внешней среде, а также способен заражать ткани молочных желез животных. Золотистый стафилококк является одним из основных возбудителей мастита у коров.

Потребление зараженных продуктов может вызвать пищевые отравления человека, которые обусловлены присутствием энтеротоксинов вырабатываемых стафилококками при определенных условиях. Заболевания при данных инфекциях происходят при потреблении мясных, молочных и иных продуктов. Однако в большинстве случаев отравления происходят при употреблении молочных продуктов [3].

Наряду с детекцией золотистого стафилококка в пищевых продуктах, немаловажной ролью играет его выявление в молоке на фермах при диагностике мастита у животных. Подобного рода проблемы требуют больших исследований в области обнаружения данного микроорганизма. На сегодняшний день существуют разные методы детекции золотистого стафилококка. Они основаны на применении бактериологических, серологических методов или на современных методах диагностики. Минусом данных методов является длительное время необходимое для получения результата. Наиболее быстрыми и чувствительными методами являются методы основанные на диагностике ДНК патогена. Отличительной особенностью данного метода является возможность проведения анализа, в присутствии других организмов без предварительного обогащения материала [4].

Изотермическая амплификация - это новый метод амплификации ДНК при постоянной температуре, обеспечивающий простые, быстрые и экономически эффективные методы обнаружения биологических мишеней, особенно для несильно оборудованных лабораторий, а также для обнаружения в полевых условиях [5]. Изотермические технологии в основном включают петлевую изотермическую амплификацию (LAMP), амплификацию со смещением нити (SDA), амплификацию с множественным смещением (MDA), амплификацию по вращающемуся кругу (RCA), изотермическую геликазозависимую амплификацию (HDA) и рекомбиназную полимеразную амплификацию (RPA) [6,7].

Молекулярные методы, такие как обычная полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ПЦР в реальном времени, использовались для быстрой идентификации большинства патогенов, включая *S. aureus*. Анализ петлевой изотермической амплификации (англ. Loop mediated isothermal amplification, LAMP), был впервые опубликован Notomi et al. [8]. Это метод амплификации ДНК с высокой специфичностью и чувствительностью, который может быть проведен в изотермических условиях с диапазоном температур от 60 до 75 °C в течение 1 часа. Методология LAMP требует четырех (F3, B3, FIP и BIP) или шести олигонуклеотидных праймеров (F3, B3, FIP, BIP, LoopF и LoopB) для распознавания шести-восьми различных областей в гене-мишени. В настоящее время анализы LAMP широко используются для выявления вирусных, бактериальных и паразитарных патогенов. Бактериальные идентификационные тесты, основанные на технологии LAMP, уже доступны

для широкого спектра бактерий, включая *Arcanobacterium pluranimalium*, *Campylobacter jejuni* и *Campylobacter coli*, *Mycobacterium tuberculosis* и *Vibrio parahaemolyticus* [9,10].

В настоящее время рекомбиназная полимеразная амплификация (англ. Recombinase Polymerase Amplification, RPA, РПА) является самым быстрым методом амплификации, который может быть легко адаптирован для использования в устройствах для тестирования на месте. Технология RPA обеспечивает умножение генетического материала менее чем за 15 минут, а сама реакция осуществляется в изотермических условиях. При добавлении обратной транскриптазы к реакционной смеси посредством РПА возможно определять РНК, так же как и ДНК, без необходимости в отдельной процедуре получения кДНК. Поскольку реакция может быть проведена при температуре от 37 до 42 °С в течение 20 мин, она считается наиболее близкой к так называемой изотермической амплификации. В последние годы RPA использовался для быстрого обнаружения в областях медицины человека и ветеринарии, пищевой промышленности и сельского хозяйства. Продукты RPA можно визуализировать с помощью различных методов обнаружения, таких как электрофорез в агарозном геле, количественная флуоресценция в реальном времени и полоски с боковым потоком [7, 11].

Системы на основе коротких палиндромных локусов CRISPR и кластера генов Cas уже давно стали известны людям. На сегодня они применяются в разных целях. Изначально они были найдены у бактерий, в последующем они были выявлены и у других микроорганизмов. Во время работы с CRISPR/Cas исследователь способен создавать единые гидовые РНК в которые способен задавать необходимую последовательность элементов, для возможности в последующем обнаруживать и влиять на определенные мишени. Это стало причиной их широкого интереса среди исследователей. Применение данных систем в диагностике инфекционных заболеваний считается наиболее перспективным на сегодняшний день. Применение CRISPR/Cas в диагностике способно обнаруживать низкие концентрации опасных возбудителей за счет считывания их нуклеотидных последовательностей. Данный метод является точным, быстрым и простым в использовании. Для работы не требуется дорогостоящее оборудование по причине наличия методов быстрой подготовки проб и применения современных методов амплификации [12].

Современные методы обнаружения нуклеиновых кислот в низких концентрациях имеют значимое место в развитии детекции патогенных организмов способных вызывать заболевания животных и людей. Молекулярные анализы, основанные на полимеразной цепной реакции, не могут быть применены в полевых условиях или в ограниченных условиях в связи с необходимостью сложного оборудования. По этой причине интерес к дешевым, но в то же время не менее эффективным методам выявления

патогенов растет с каждым годом. Изотермические методы детекции генного материала на сегодняшний день наряду с ПЦР применяются в лабораториях и облегчают амплификацию некоторых нуклеиновых кислот.

Сравнивая петлевую изотермическую амплификацию и рекомбиназную полимеразную амплификацию можно прийти к заключению, что оба метода имеют свои преимущества при работе в разных условиях и для достижения разных целей. На основе данных технологий разработаны тест-системы для различных распространённых патогенов бактериального и вирусного происхождения. Преимущества методов - это прежде всего простота в применении и высокая специфичность, а также дешевизна, высокая скорость и лёгкость визуализации результатов анализа.

Анализ данных литературы говорит о требовании дальнейшего детального изучения применения изотермических методов амплификации в лабораторной диагностике. Усовершенствование методов детекции необходимо для разработки на их основе более чувствительных и эффективных методов диагностики, для применения на практике [13].

Данное исследование было профинансировано Министерством сельского хозяйства Республики Казахстан (BR10764944).

Список литературы

- 1 Григорьева В. В. и др. Диагностика и лечение субклинического мастита [Текст] // Перспективы развития аграрных наук. – 2020. – С.- 135-137.
- 2 Черненко В. В. Методы диагностики и лечения мастита у коров [Текст] / Черненко В. В., Хотмирова О. В., Черненко Ю. Н. // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. – №. 4. – С. 40-43.
- 3 Горяинова Г. М. Индикация *Staphylococcus aureus* методами ДНК-диагностики в молоке и молочных продуктах [Текст] / Горяинова Г. М. – 2004.
- 4 Piccinini, R. Relationship between *S. aureus* gene pattern and dairy herd mastitis prevalence [Текст] / Piccinini, R., Borromeo, V., Zecconi, A. // *Veterinary Microbiology*, -2010- 145(1-2), P.-100-105.
- 5 Chang C.C. Diagnostic devices for isothermal nucleic acid amplification. Sensors [Текст] / Chang C.C., Chen C.C., Wei S.C., Lu H.H., Liang Y.H., Lin C.W. // 2012 12-P.-8319–8337.
- 6 Deng H. Bioanalytical applications of isothermal nucleic acid amplification techniques [Текст] / Deng H, Gao Z. // *Anal Chim Acta* -2015-853-P.-30–45.

7 Du X. et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* via recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip[Текст]/ //Food Analytical Methods. – 2018. – Т. 11. – С. 2296-2306.

8 Notomi T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. [Текст]/ Nucleic Acids Res. -2000.- 28.-P.-68.

9 Полиданов М. А. И др. Технология петлевой изотермической амплификации нуклеиновых кислот [Текст]/ //Modern Science. – 2020. – №. 3-2. – P. 51-58.

10 Lim K. T. Loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of *Staphylococcus aureus*[Текст]/ Lim K. T., Teh C. S. J., Thong K. L. //BioMed research international. – 2013. – 3.- P.-201.

11 James A, Macdonald J. Recombinase polymerase amplification: emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics[Текст]/James A, Macdonald J. //ExpertRevMolDiagn-2015- 15-P.-1475–1489.

12 Волков А. А. Молекулярные диагностические платформы, созданные на базе систем CRISPR/Cas [Текст]/ Волков А. А., Долгова А. С., Дедков В. Г. //Инфекция и иммунитет. – 2022. – Т. 12. – №. 1. – С. 9-20.

13 Чемисова О. С. Сравнительный анализ методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот [Текст]/ Чемисова О. С. и др. //Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2022. – №. 1. – С. 126-138.