

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктора философии (Ph.D) по специальности 6D070100 – Биотехнология

БАРМАК САБЫРХАН МУХИТУЛЫ

Разработка ПЦР тест-системы для типирования сальмонелл в клиническом материале, пищевом сырье и продуктах питания

Общая характеристика диссертационного исследования.

Диссертационная работа относится к области биотехнологии и посвящена разработке экспресс-тестов пригодных выявлять и типировать сальмонеллы в различных образцах. В работе представлены результаты сбора образцов клинических материалов, пищевого сырья и продуктов питания, реализуемых на рынках в различных регионах, данные по подбору специфических олигонуклеотидов, отработке условий постановки ПЦР, выделению ДНК, определению специфичности, чувствительности и диагностической эффективности разработанных тест-систем. С использованием разработанных тест-систем показана распространенность и генетическая гетерогенность сальмонелл в Казахстане. Полученные данные легли в основу рекомендаций и нормативно-технической документации на тест-систему.

Актуальность исследования.

В республике Казахстан заболеваемость сальмонеллезом, остается одной из наиболее актуальных проблем для здравоохранения. Анализ статистических данных министерства здравоохранения показывает, что показатель заболеваемости сальмонеллезом на 100 тыс населения в 2019-2021гг был в пределах 2,59-6,01. В 2017-2021гг в микробном пейзаже культур сальмонелл, выделенных от больных, превалировала *S.enteritidis* и *S.typhimurium*. По данным санитарно-эпидемиологической службы от 70 до 90% случаев сальмонеллеза происходит в результате потребления недоброкачественной продукции.

Обнаружение и идентификация возбудителей бактериальных патогенов в пищевой промышленности играет важную роль в предотвращении пищевых вспышек. В республике Казахстан наиболее часто используемым методом обнаружения сальмонеллы является традиционный микробиологический метод. Эти методы как правило, трудоемки и требуют минимум 4–6 дней, что увеличивает риск заражения или передачи патогенов. Необходимость получения своевременных результатов привела к разработке многих быстрых методов обнаружения с высокой специфичностью и чувствительностью, среди них ПЦР является мощным методом, обеспечивающим быстрое, чувствительное и специфичное обнаружение патогенов. В доступной литературе имеется лишь одно сообщение казахстанских исследователей о разработке ПЦР для выявления сальмонел с использованием гена вирулентности *fimA* (Даугалиева А.Т. и др., 2015). Авторы показали возможность обнаружения сальмонелл у больных животных, но не сообщают о возможностях данного метода для обнаружения сальмонелл в продуктах питания. Недавно по результатам анализа полного генома 145 штаммов различных видов сальмонелл Ну, L. с соавторами (2021) показали, что ген *fimA* имеет сомнительные сайты

для использования в качестве мишени при разработке метода обнаружения сальмонеллы.

Таким образом разработка ПЦР для обнаружения и типирования сальмонелл в клиническом материале, пищевом сырье и продуктах питания в Республике Казахстан является актуальным.

Объекты исследования: Серотипы *Salmonella enterica subsp. enterica*. Пробы из клинического материала больных, страдающих острой кишечной инфекцией. Пробы из пищевого сырья и полуфабрикатов, суточные пробы готовой пищи и другие подозреваемые в качестве фактора передачи возбудителя инфекции.

Предмет исследования. Классические ПЦР и ПЦР РВ тест системы для выявления *Salmonella enterica subsp. enterica* (*S. enterica*) и типирования сальмонелл *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis* (*S. Enteritidis*), *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium* (*S. Typhimurium*), *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Virchow* (*S. Virchow*) в клиническом материале, пищевом сырье и продуктах питания. РАПД ПЦР для серотипирования *S. enterica*.

Цель исследования. Создание ПЦР тест-систем для типирования сальмонелл в клиническом материале, а также в пищевом сырье и продуктах питания, реализуемых в Республике Казахстан.

Задачи исследования:

1. Разработка ПЦР тест-систем для выявления и типирования сальмонелл в клиническом материале, пищевом сырье и продуктах питания.
2. Определение специфичности, чувствительности и диагностической эффективности ПЦР тест-систем для выявления и типирования сальмонелл в клиническом материале, пищевом сырье и продуктах питания.
3. Определение распространенности и генетического разнообразия сальмонелл, выделенных из клинического материала, в пищевом сырье и продуктах питания.
4. Разработка рекомендаций по использованию ПЦР для типирования сальмонелл в клиническом материале, пищевом сырье и продуктах питания.

Методы исследования. В работе использованы современные методы исследования молекулярной биологии и микробиологии: отбор биологических образцов от больных детей в медицинских учреждениях, сбор пищевого сырья и продуктов питания в сети их реализации, подбор праймеров и зондов с использованием биоинформационной базы данных NCBI, синтез праймеров и зондов, выделение ДНК изолятов бактерий сальмонелл, постановка ПЦР анализа для выявления бактерий сальмонелл, определение специфичности и чувствительности классической ПЦР и ПЦР РВ, постановка РАПД ПЦР, определение нуклеотидной последовательности по методу с помощью NGS технологии (MiSeq, Illumina), анализ олигонуклеотидных последовательностей с помощью биоинформатической программы Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) из базы данных NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Научная новизна исследования заключается в том, что впервые в Казахстане для молекулярной диагностики сальмонеллеза разработаны тест-

системы на основе классической ПЦР и ПЦР РВ для выявления *S. enterica* и его распространённых серотипов *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *S. Virchow*.

Впервые с использованием разработанных современных методов показано, что распространённость *S. enterica* в различных продуктах питания в 2018 г. составила 5%, а в 2019 г. 2,34%. Подтверждено 65 клинических случаев заражения сальмонеллой. Всего выделено и подтверждено с помощью ПЦР 99 образцов, из них 21 (21,2%) изолят отнесен к *S. Enteritidis*, 43 (43,4%) изолята к *S. Typhimurium* и 26 (26,3%) изолятов к *S. Virchow*.

Получено 2 патента РК на набор новых олигонуклеотидов для выявления ДНК *S. enterica* и его типов, а также на метод ПЦР для выявления *S. enterica*, что подтверждает научную новизну диссертационной работы.

Впервые с использованием разработанной РАПД ПЦР показано генетическое разнообразие сальмонелл в продуктах питания и клиническом материале выделенных на территории Казахстана. ПЦР-анализ геномной ДНК бактерий *S. enterica* полученных из цепи пищевых продуктов и клинических материалов с RAPD-праймером показал генетическое родство изолятов *S. Enteritidis*, и генетическую гетерогенность изолятов *S. Typhimurium*, *S. Virchow*.

Впервые определена и депонирована нуклеотидная последовательность полного генома казахстанского штамма QazSL-4 *S. enterica* в международной базе данных GenBank.

Практическая значимость исследования

Показана возможность использования разработанных ПЦР-тест-систем для анализа клинических материалов, выделенных от больных детей и пищевого сырья, продуктов питания, контаминированных *S. enterica* и типами *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *S. Virchow*.

Разработан пакет нормативно-технической документации (НТД): Стандарт организации, инструкция по изготовлению и контролю, наставление по применению «Тест-система для выявления *Salmonella enterica* методом ПЦР в режиме реального времени».

По материалам диссертационной работы составлена «Рекомендация по использованию ПЦР для типирования сальмонелл в клиническом материале, пищевом сырье и продуктах питания». Собранные данные исследований позволят разработать меры для снижения распространённости сальмонеллеза.

Установленный полный геном казахстанского штамма QazSL-4 *S. enterica*, изолированный из филе курицы, является важным дополнением к существующей базе геномов бактерии сальмонелл, что позволяет использовать их в определении изменчивости генома сальмонелл, циркулирующих в Казахстане.

Теоретическая значимость состоит в оценке распространённости и разнообразия изолятов сальмонелл на территории Республики Казахстан. В результате работы в базу данных NCBI GenBank была депонирована полногеномная последовательность казахстанского изолята QazSL-4 *S. enterica*.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Созданы ПЦР тест-системы, позволяющие быстро обнаруживать *S. enterica* и идентифицировать серотипы *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *S. Virchow* в клиническом материале, пищевом сырье и продуктах питания.

2. Показана высокая специфичность, чувствительность и диагностическая эффективность ПЦР тест-систем для выявления и типирования сальмонелл

3. Распространенность и генетическая гетерогенность серотипов сальмонелл в клиническом материале, пищевом сырье и продуктах питания в Казахстане.

4. Высокая диагностическая эффективность разработанных ПЦР тест-систем позволило сформулировать рекомендации по раннему обнаружению сальмонелл. Разработанный комплект нормативно-технической документации открывают путь к внедрению препарата в производство.

Основные результаты и выводы

1. Сконструированы специфические праймеры и разработана ПЦР тест-система для выявления геномной ДНК *S. Enterica* в продуктах питания и клиническом материале.

2. Сконструированы специфические праймеры и разработаны ПЦР тест-системы для идентификации *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Virchow*.

3. Сконструированы специфические праймеры и разработана ПЦР РВ для выявления геномной ДНК *S. Enterica* в продуктах питания и клиническом материале.

4. Сконструированы специфические праймеры и разработаны тест-системы ПЦР РВ для идентификации *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Virchow*.

5. Показана высокая диагностическая эффективность разработанных тест систем. В результате исследования 1020 биологических образцов, собранных в 2018-2019 гг. в г. Алматы было выявлено разработанными методами ПЦР и выделено методом культивирования 99 изолятов.

6. Распространенность *S. enterica* в различных продуктах питания в 2018 г. составила 5%, а в 2019 г. 2,34%. Подтверждено 65 клинических случаев заражения сальмонеллой. Всего выделено и подтверждено ПЦР 99 образцов, из них 21 (21,2%) изолят отнесен к *S. Enteritidis*, 43 (43,4%) изолята к *S. Typhimurium* и 26 (26,3%) изолятов к *S. Virchow*.

7. Разработана РАПД ПЦР для определения генетического полиморфизма различных видов *S. enterica*. ПЦР-анализ геномной ДНК бактерий *S. enterica* полученных из цепи пищевых продуктов и клинических материалов с RAPD-праймером показал генетическое родство изолятов *S. Enteritidis*, и генетическую гетерогенность изолятов *S. Typhimurium*, *S. Virchow*.

8. Полногеномное секвенирование штамма QazSL-4 серовар *S. enterica subsp. Enterica* выделенного из филе курицы купленного на рынке г. Алматы в 2018 году позволило получить последовательность генома длиной 4711816 п.н. охватывающий 49 контигов, со значением N50, равным 491,954 п.н., и значением L50, равным трем контигам. В геноме штамма QazSL-4 имеется в наличии один гомолог гена устойчивости aac(6')-Iaa. Программой PHASTER

выявлено в последовательности генома одна профаговую область, интактные области не обнаружены. Выявлено наличие широко распространенных островов патогенности *Salmonella* SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4, SPI-5, SPI-9, SPI-10, SPI-13 и SPI-14.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа проведена в рамках проекта №AP05131147 «Генотипирование патогенных микроорганизмов в пищевом сырье и продуктах питания, реализуемых на рынках и супермаркетах Республики Казахстан, разработка рекомендаций для снижения риска заболеваемости детей дошкольного и школьного возраста» (2018-2020гг), а также в рамках проекта «Жас ғалым», №AP15473285 «Изучение распространенности и генетического разнообразия сальмонелл в южных регионах Казахстана» (2022-2024 гг.).

Апробация работы. Результаты исследований были опубликованы на международных научно-практических конференциях: VI Международная конференция молодых ученых (Новосибирск, 2019), «VI Международные Фарабиевские чтения» (Алматы, 2019), Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биоразнообразия и биотехнологии» (Астана, 2019), 2021: Proceedings of World Congress on Food Science & Food Safety and for Proceedings of 2nd World congress on Diabetes & Metabolism (2021), международная научная конференция студентов и молодых ученых «Фараби Әлемі» (Алматы, 2022), международная научно-практическая конференция «Биотехнология и биологическая безопасность: достижения и перспективы развития» (Алматы, 2023).

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 16 печатных работах, включая 2 статьи в изданиях, индексируемых в базе данных Web of Science или Scopus с ненулевым импакт-фактором; 4 статьи в республиканских научных журналах, включенных в перечень КОКСОН МОН РК, 1 статья в издании, индексируемом в базе данных РИНЦ, , 7 тезисов в материалах международных конференций, проведенных в Швейцарии, России и Республике Казахстан. По результатам работ получено 2 патента на полезную модель.

Личный вклад докторанта. Все разделы диссертационной работы выполнены при личном участии автора. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно, под руководством научных консультантов. Проведен анализ литературных источников, выполнены лабораторные эксперименты, оптимизированы методики постановки молекулярно-генетических анализов, самостоятельно проанализированы и обработаны полученные результаты, сделаны выводы и сформулированы предложения.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 123 страницах и состоит из обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и заключения, списка использованных источников.