

Чужебаева Г.Д., кандидат ветеринарных наук, **основной автор**, <https://orcid.org/0000-0002-0091-8888>

НАО «Костанайский региональный университет имени А. Байтурсынова», г. Костанай, ул. А.Байтурсынова, 47, 110000, Казахстан, gulzhandoc@mail.ru

Байменов Б.М., магистр ветеринарных наук, <https://orcid.org/0000-0001-9063-7651>

НАО «Костанайский региональный университет имени А. Байтурсынова», г. Костанай, ул. А.Байтурсынова, 47, 110000, Казахстан, bahytbajmenov@gmail.com

Алиева Г.К., магистр ветеринарных наук, <https://orcid.org/0000-0002-0550-6639>

НАО «Костанайский региональный университет имени А. Байтурсынова», г. Костанай, ул. А.Байтурсынова, 47, 110000, Казахстан, gukan.83@mail.ru

Муканов Т.М., <https://orcid.org/0000-0002-0015-1322>

НАО «Костанайский региональный университет имени А. Байтурсынова», г. Костанай, ул. А.Байтурсынова, 47, 110000, Казахстан, tamerlan.mukanov@gmail.com

Chuzhebaeva G.D., Candidate of Veterinary Sciences, **the main author**, <https://orcid.org/0000-0002-0091-8888>

NJSC «Kostanay Regional University named after A. Baitursynov», Kostanay, st. A. Baitursynov 47, 110000, Kazakhstan, gulzhandoc@mail.ru

Baimenov B.M., Master of Veterinary Sciences, <https://orcid.org/0000-0001-9063-7651>

NJSC «Kostanay Regional University named after A. Baitursynov», Kostanay, st. A. Baitursynov 47, 110000, Kazakhstan, bahytbajmenov@gmail.com

Alieva G.K., Master of Veterinary Sciences, <https://orcid.org/0000-0002-0550-6639>

NJSC «Kostanay Regional University named after A. Baitursynov», Kostanay, st. A. Baitursynov 47, 110000, Kazakhstan, gukan.83@mail.ru

Mukanov T.M., <https://orcid.org/0000-0002-0015-1322>

NJSC «Kostanay Regional University named after A. Baitursynov», Kostanay, st. A. Baitursynov 47, 110000, Kazakhstan, tamerlan.mukanov@gmail.com

**ОЦЕНКА ПРАЙМЕРОВ И ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕННЫХ ЗОНДОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* И ИХ ГЕНОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ
EVALUATION OF PRIMERS AND FLUORESCENTLY LABELED PROBES FOR THE IDENTIFICATION OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* AND THEIR ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES**

Аннотация

Ранее проведенными исследованиями установлено, что стрептококки и стафилококки у животных чаще выделяются при заболевании коров маститом [1,2,3,4,5]. Этиологическое значение имеют контагиозные, высокопатогенные *Streptococcus agalactiae* и *Staphylococcus aureus*, они вызывают маститы тяжелой степени и провоцируют хроническое воспаление при высоком показателе соматических клеток, что делает молоко непригодным для использования. При инфицировании антибиотикоустойчивыми формами патогенных микроорганизмов наблюдаются тяжелые формы пищевых инфекций, с большим трудом поддающиеся лечению.

Одним из перспективных направлений в идентификации микроорганизмов и диагностике их антибиотикорезистентности является использование молекулярно-генетических подходов – полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В статье приведены результаты по оптимизации циклирования ПЦР: экспериментально подобрана оптимальная температура отжига праймеров, выбраны оптимальные временные промежутки этапов денатурации, отжига, элонгации для детекции выбранных генов, на основе чего разработан протокол мультиплексной ПЦР-РВ для идентификации *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* и генов их резистентности к антибактериальным препаратам. Приведены результаты экспериментов по эффективности разработанной ПЦР: аналитической чувствительности и специфичности.

ANNOTATION

Earlier studies have found that streptococci and staphylococci in animals are more often isolated when cows have mastitis [1,2,3,4,5]. The etiological significance is contagious, highly pathogenic *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus*, they cause severe mastitis and provoke chronic inflammation with a high index of somatic cells, which makes milk unusable. When infected with antibiotic-resistant forms of pathogenic microorganisms, severe forms of food infections are observed, which are very difficult to treat.

One of the promising directions in the identification of microorganisms and the diagnosis of their antibiotic resistance is the use of molecular genetic approaches - polymerase chain reaction (PCR).

The article presents the results of PCR cycling optimization: the optimal temperature of primer annealing was experimentally selected, optimal time intervals of denaturation, annealing, elongation stages were selected for the detection of selected genes, on the basis of which a multiplex PCR-RV protocol was developed for the identification of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* and their resistance genes to antibacterial drugs. The results of experiments on the effectiveness of the developed PCR: analytical sensitivity and specificity are presented.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, гены, резистентность, мультиплексная ПЦР, праймеры, чувствительность, специфичность

Key words: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, genes, resistance, multiplex PCR, primers, sensitivity, specificity

Введение. Из практики лабораторных исследований известно, что мультиплексная ПЦР имеет ряд преимуществ перед стандартной, более простой униплексной ПЦР: снижение риска контаминации образца, возможность контроля ложноотрицательных результатов, уменьшение расхода реактивов, сокращение времени подготовки, более высокое качество эталона, количество которого можно определить в образце [6,7,8,9,10]. Мультиплексная ПЦР стала «золотым стандартом» дифференциальной диагностики, которая позволяет детектировать одновременно несколько возбудителей.

Накопленные данные о формировании множественной антибиотикорезистентности и приобретении детерминант патогенности у широкого круга микроорганизмов, способность вызывать заболевания не только у широкого круга млекопитающих, но и человека, делают неотложной необходимость внедрения молекулярно-генетических методов видовой идентификации в работу бактериологических лабораторий [11,12,13,14,15].

Цель настоящего исследования - оценка разработанных праймеров и флуоресцентно меченных зондов для идентификации *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* и генов их резистентности к антибактериальным препаратам, в объектах ветеринарно-санитарного надзора в формате ПЦР Real Time.

Материалы и методы исследований. Поиск последовательностей генов, специфичных для генома *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae*, а так же локусов антибиотикорезистентности, произведен в биоинформационной базе данных NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, NCBI, США). Полученные участки генов проанализированы с помощью инструмента «Run BLAST», в результате выравнивания которых получены необходимые последовательности и подобраны специфичные олигонуклеотидные последовательности праймеров и флуоресцентномеченные зонды [16].

Поиск гомологии для выбранных праймеров и зондов проведен посредством поисковой системы «BLAST» в биоинформационной базе данных NCBI. Компьютерное моделирование реакции амплификации произведено с использованием онлайн приложения Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) и «Oligo Analyzer Tool» (eu.idtdna.com).

Для оптимизации температурного режима зжигания праймеров и зондов использован 5-ти канальный термоциклер «QuantStudio5» фирмы «Applied Biosystems» США с использованием температурного градиента с вертикальным перепадом температур.

При конструировании амплификационной тест-системы для оценки аналитической специфичности и чувствительности праймеров и зондов, а также определения локусов их антибиотикорезистентности проведена серия экспериментов с использованием ДНК стафилококков, стрептококков. Для определения чувствительности ПЦР со сконструированными праймерами и зондами использованы кратные разведения ДНК в концентрациях от 1×10^1 до 1×10^7 м.к./мл.

Результаты и их обсуждение. Для подбора праймеров и флуоресцентно-меченых зондов использовали полученные после выравнивания последовательности специфические для *S.aureus*: участок гена термостабильной нуклеазы (*nuc*), гены резистентности к антибиотикам группы бета-лактамов (*BlaZ*), макролидов (*ermC*) и тетрациклинов (*TetK*); для *Str.agalactiae*: кодирующий глюкокиназу (*Glck*), гены резистентности к антибиотикам группы бета-лактамов (*pbp*), макролидов (*Erm*) и тетрациклинов (*tetM*).

Выбранный специфический участок гена *nuc* для *S.aureus*, кодирует внеклеточную термостабильную нуклеазу, которая часто используется для быстрого и специфичного обнаружения *S.aureus* [17,18,19,20].

Ген *Glck* – кодирует глюкокиназу *Str.agalactiae*, и является одним из наиболее стабильных эталонных генов для изучения экспрессии *Str.agalactiae* в режиме реального времени [21].

Были отобраны консервативные участки вышеперечисленных генов, обладающие достаточным количеством оснований и оптимальным GC-составом для дизайна праймеров и флуоресцентно-меченых зондов.

Для подбора праймеров и зондов к выбранным участкам нуклеотидных последовательностей, использовали инструмент для поиска конкретных праймеров «Primer-BLAST». Далее выбранные нами праймеры были проверены в программе «Oligo Analyzer Tool» [16], которая дает более точные данные о свойствах праймеров и зондов (длина, содержание GC, температура плавления, молекулярная масса, ΔG шпильки, T_m шпильки). Физические характеристики подобранных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов, указаны в таблицах 1-2.

При проведении гомо- и гетеродимерного анализа подобранных праймеров, димерные последовательности с максимальными значениями дельты G (свободной энергии связывания олигопоследовательности с ее совершенным комплементом), являлись относительно низкими, либо при высоких значениях дельты G, 3' концы праймеров оставались свободными, что исключает дальнейшую репликацию ДНК и образование неспецифических продуктов ПЦР.

Таблица 1 – Физические характеристики праймеров и флуоресцентно меченых зондов для идентификации специфического для *S. aureus* участка гена термостабильной нуклеазы (*nuc*), генов резистентности к антибиотикам групп бета-лактамаз (*BlaZ*), макролидов (*ermC*) и тетрациклинов (*TetK*).

Праймер	Последовательность	Длина	Содержание GC пар	T^0 плавления	Молек. масса	ΔG шпильки	T^0 m шпильки
Nuc3-F	AATATGGACGTGGCTTAGCGT	21	47,6	64	6501,3	-1,52	46,8
Nuc3- R	AGCCAAGCCTTGACGAACTAA	21	47,6	64,1	6408,2	-0,92	39,4
Nuc3- OI	TGCTGATGGAAAAATGGTAAACGAAGC	27	40,7	66,4	8405,5	-0,19	27,3
BlaZ-F	AAGACGGTGTTCCAAAAGACT	21	42,9	62,2	6463,3	-0,99	37,8
BlaZ-R	ACACTCTTGGCGGTTTCACT	20	50	64,1	6059	-0,11	26,7
BlaZ1- OI	AGG TTGCTGATAAAAAGTGGTCAAGCA	26	42,3	66,9	8083,3	-1,6	41,7
ermC2- F	ATCGTGGAATACGGGTTTGCT	21	47,6	64,2	6492,3	-2,41	51,8
ermC2- R	GTGAGCTATTCACCTTAGGTTTAGG	25	40	61,2	7718	-2,56	49,9
ermC2-OI	CGCTCATTGGCATTACTTTAATGGCA	27	40,7	66,5	8240,4	-5,21	55,9
ermC2- F	TCGATAGGAACAGCAGTATATGGA	24	41,7	62,7	7449,9	-0,95	37
ermC2-R	GCAGATCCTACTCCTTGTAATAACC	25	48	63,6	7536,9	-0,59	34,5
ermC2-OI	TGAGCTGTCTTGGTTCATTGATTGCT	26	42,3	66,9	7989,2	-1,33	37,7

Таблица 2 – Физические характеристики праймеров и флуоресцентно меченых зондов для идентификации специфического для *Str. agalactiae* гена, кодирующего глюкокиназу (*Glck*), генов резистентности к антибиотикам групп бета-лактамаз (*BlaZ*), макролидов (*ermC*) и тетрациклинов (*TetK*).

Праймер	Последовательность	Длина	Содержание GC пар	T^0 плавления	Молек. масса	ΔG шпильки	T^0 m шпильки
Glck1- F	AGATGACTTCTCGGTATCGGT	22	45,5	62,8	6756,4	-1,01	39,2
Glck1-R	CCTACTTCTTGAGTATCA GCCCA	23	47,8	63,2	6934,5	-1,61	45,3

Glck1-OI	TGGGTCTCCAGGAGCTGTGA	22	54,5	67,2	6797,4	-1,29	43,1
pbp1- F	AGCAGGTGCCCCAGTTATTC	20	55	64,3	6093	-1,14	41,2
pbp1- R	TGCAGATAACCACCACCACC	20	55	64,2	6000	1,83	-11
pbp1- OI	ACTGCCCAAATCGCCAGGA	20	60	68,4	6056	-0,96	35,2
Erm1- F	TGAAAATACCCAACGAGCTTT	22	40,9	63,6	6687,4	-0,34	29,5
Erm1- R	TGAAAATATGCTCGTGGCACT	21	42,9	62,6	6445,2	-2,24	54,4
Erm1-OI	AGGTTTGCTGTTAATGGTGGAAATGGA	27	40,7	67,1	8449,5	0,31	17,9
tetM1-F	GACACGCCAGGACATATGGA	20	55	63,6	6160,1	-1,72	45,8
tetM 1-R	CGAGTTTGTGCTGTACGCC	20	55	63,6	6115	-0,24	28,5
tetM1-OI	TGGGGCAATCTACTGATTTCTGCAA	26	42,3	66,8	7976,2	-1,38	39,9

Из таблицы видно, что праймеры и зонды подобраны со сходными физическими характеристиками, позволяющими проводить одновременную амплификацию и гибридизацию в мультиплексной реакции. Максимальные значения дельты G и температуры образования шпилек значительно ниже температуры отжига праймеров и флуоресцентно меченых зондов, что исключает образование шпилек.

По результатам анализа полученных праймеров и флуоресцентно меченых зондов на возможность образования гомо- и гетеро-димерного комплексов, путем расчета максимальных значений дельты G, димерные последовательности с максимальными значениями свободной энергии связывания олигопоследовательностей с ее совершенным комплементом в большинстве случаев являлись низкими, и возможность образования неспецифических продуктов реакции была исключена. В остальных случаях димерные структуры с высокими значениями ΔG не представляли опасности, так как 3' концы праймеров оставались свободными, либо наблюдался отжиг 3' конца зонда (3' концы зондов всегда заблокированы).

Для оптимизации температурного режима отжига праймеров и зондов использовали температурный градиент с вертикальным перепадом температур от 63 до 65 градусов в редакторе программ амплификации (таблица 3).

Таблица 3 – Температурно-временной режим амплификации

№ блока	Т, °С	Время		Ко-во циклов	Режим оптических измерений	Тип блока
		мин.	сек.			
1	95	5	00	1		цикл
2	94	0	10	40	FAM/ROX/CY5/VIC	цикл
	63-65	0	20			

Концентрация праймеров и зондов в реакционной смеси является стандартной и составляет: для зондов – 200 nM/l, для праймеров – 400 nM/l (таблица 4).

Таблица 4 – Расчет реакционной смеси

Компонент	Объем, мкл
Смесь праймеров	4
5x ПЦР-буфер	4
Деионизированная вода (ОКО)	8
Исследуемый образец	4
Суммарный объем реакции	20

По результатам проведенного эксперимента установили, что оптимальной температурой отжига праймеров является 65 °С, так как при анализе оптических измерений при данной температуре наблюдался максимально ранний выход реакции на пороговый цикл (Ct) (рис. 1, таблица 5).

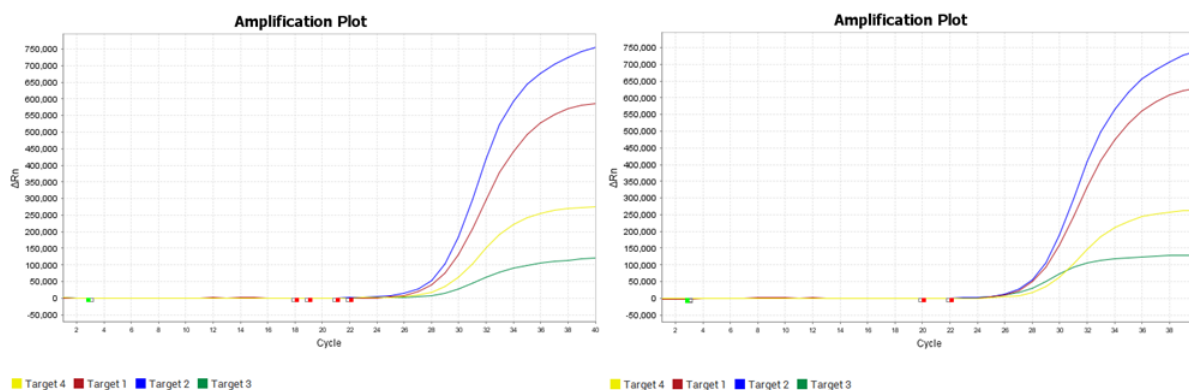


Рисунок 1 – Анализ оптических измерений

Таблица 5 – Результат анализа оптических измерений с помощью температурного градиента с вертикальным перепадом температур от 63 до 65

T ⁰	Пороговый цикл реакции (Ct)	
	<i>S. aureus</i>	<i>Str. agalactiae</i>
63	29.9	29.8
64	29.5	29.5
65	29.3	29.4
66	29.5	29.6
67	29.7	29.8

Как видно из таблицы, наилучшая эффективность ПЦР наблюдалась при температуре 65°C, так как пороговый уровень амплификации наблюдался уже на 29,3 цикле для участка гена термостабильной нуклеазы (*nuc*) *S.aureus*, наиболее ранний выход реакции так же наблюдался при температуре 65°C для гена, кодирующего глюкокиназу (*Glck*) *Str. agalactiae* (на 29.4 цикле).

Аналитическая чувствительность (предел обнаружения). Для определения аналитической чувствительности тестовых праймеров и зондов к выбранным целевым участкам генов – *nuc* для *Staphylococcus aureus*, *Glck* для *Streptococcus agalactiae*, произвели последовательные разведения выделенной ДНК (таблица 6), рассчитав процент геномов *S.aureus* и *Str.agalactiae*. Предел обнаружения, представляет собой наименьшее количество анализируемого вещества, которое может быть обнаружено и определено с помощью анализа кривых ПЦР с приемлемым уровнем точности.

Таблица 6 – Расчет ДНК, копий/мкл *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae*

Источник ДНК	<i>S.aureus</i>	<i>Str.agalactiae</i>	
1	2	3	
Длина ДНК, п.о.	2821361	2074179	
Спектрофотометрия нг/мкл	38,72	27,61	
Моль/мкл	2,0794E-17	2,0169E-17	
1	2	3	
Копий /мкл	12 522 287,14298	12 145 828,42802	
Разведения	-1	1 252 229	1 214 583
	-2	125 223	121 458
	-3	12 522	12 146

	-4	1 252	1 215
	-5	125	121
	-6	13	12
	-7	1	1
	-8	0	0
	-9	0	0

Как видно из таблицы, нами были приготовлены последовательные разведения ДНК *S.aureus* от 1 252 229 копий ДНК/мкл (-1) до 1 копий ДНК/мкл (-7) и *Str.agalactiae* от 1 214 583 (-1) копий ДНК/мкл до 1 копий ДНК/мкл (-7). Интерпретацию результатов проводили на основании наличия (отсутствия) пересечения кривой накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией, что определяло значение порогового цикла (Ct). Кривые накопления флуоресцентного сигнала наблюдались в диапазонах разведения исследуемой ДНК от -1 до -6 степени, в диапазонах разведения от -7 до -9 степени, флуоресцентный сигнал отсутствовал (см. рисунок 2).

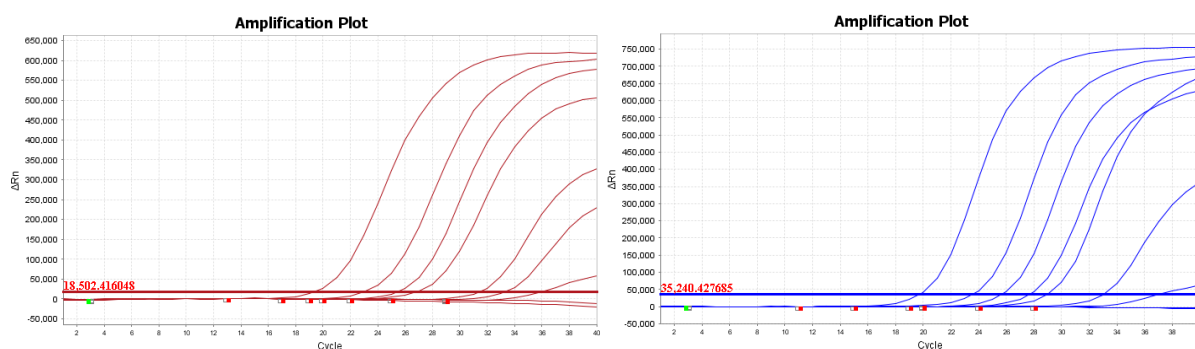


Рисунок 2 – Кривые накопления флуоресцентного сигнала последовательных разведений выделенных ДНК копий/мкл *Staphylococcus aureus* слева и *Streptococcus agalactiae* справа.

По результатам проведенного эксперимента, диагностическая чувствительность тест системы для целевого гена *pus* *Staphylococcus aureus*, составила 13 копий ДНК/мкл, для целевого гена *Glck* *Streptococcus agalactiae* 12 копий ДНК/мкл, что указывает на отсутствие существенной разницы в пределах обнаружения между двумя исследуемыми генами. Таким образом, данный метод может служить надежным инструментом скрининга, особенно в образцах, с низким содержанием исследуемых патогенов.

Аналитическая специфичность. В биоинформационной базе данных NCBI с помощью ресурса BLAST, произведен анализ специфичности и чувствительности подобранных праймеров к продуктам, имеющим целевые последовательности, комплементарные ранее выбранным нами участкам генов, специфическим для *S.aureus* и *Str.agalactiae*. В данном эксперименте не обнаружено последовательностей разработанных праймеров в геноме других организмов, что говорит об их высокой специфичности.

Так же, для определения диагностической чувствительности и специфичности тестируемых участков генов *pus* и *Glck*, было случайно отобрано и проанализировано 64 изолята, выделенных из смывов, биоматериала животных, и продуктов животного происхождения (*S.aureus*, *S.haemolyticus*, *S.epidermidis*, *Str.pyogenes*, *Str.agalactiae*, *Enterococcus faecium*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter*, *S.chromogenes*, *S.simulans*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*); а так же штаммов *S.aureus*, полученного из Республиканской коллекции микроорганизмов (РК) и *Str.agalactiae* (ATCC®13813, «Lofilchem» Италия)

Все изоляты *S.aureus* и *Str.agalactiae* были правильно идентифицированы по выбранным целевым участкам генов *pus* и *Glck*. Изоляты, не относящиеся к *S.aureus* и *Str.agalactiae*, дали отрицательный результат. Таким образом, присутствие ДНК нецелевых видов бактерий никак не влияет на идентификацию *S. aureus* и *Str. agalactiae* по выбранным специфичным генам.

Заключение. Методом множественных выравниваний отобраны консервативные участки генов специфические для *S.aureus* и *Str.agalactiae*, а так же гены резистентности к антибиотикам группы бета-лактамов, макролидов, тетрациклинов, обладающие оптимальными характеристиками

для дизайна праймеров и флуоресцентно-меченных зондов. Разработаны праймеры и флуоресцентно-меченные зонды со сходными физическими характеристиками для идентификации *S.aureus* и *Str.agalactiae* и их генов резистентности к антибактериальным препаратам, позволяющие проводить одновременную амплификацию и гибридизацию в мультиплексной реакции. Экспериментально подобрана температура отжига праймеров для детекции выбранных генов – 65⁰, выбраны оптимальные временные промежутки этапов денатурации: отжига, элонгации и на этой основе разработан протокол мультиплексной ПЦР-РВ. Диагностическая чувствительность реакции для гена *pus S.aureus* составила 13 копий/мкл, для целевого гена *Glck Str.agalactiae* 12 копий/мкл, специфичность реакции -100%.

Информация о финансировании. Работа выполнена в рамках программы BR10764944:

«Разработка методов аналитического контроля и проведения мониторинга безопасности пищевой продукции» по теме: «Разработка мультиплексной ПЦР в реальном времени для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определение локусов антибиотикорезистентности».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Kadariya J., Smith T.C., Thapaliya D. Staphylococcus aureus and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health / J. Kadariya, T.C. Smith, D. Thapaliya // BioMed Research International – 2014. – Vol. 2014. - p.1-9.

2 Balaban N., & Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins / N. Balaban, A. Rasooly // International Journal of Food Microbiology – 2000. – Vol. 61 (1). - p.1-10.

3 Mead P. S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L. F., Bresee J. S., Shapiro C., Tauxe R. V. Food-Related Illness and Death in the United States / P. S. Mead, L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, R. V. Tauxe // Emerging Infectious Diseases – 1999. – Vol. 5(5). - p. 607–625.

4 Абаев И.В., Скрябин Ю.П., Кисличкина А.А., Коробова О.В., Мицевич И.П., Мухина Т.Н., Богун А.Г., Дятлов И.А. Геномный анализ штаммов *Staphylococcus aureus* клональной линии 30 — возбудителей пищевой инфекции в Российской Федерации / И.В. Абаев, Ю.П.Скрябин, А.А. Кисличкина, О.В.Коробова, И.П. Мицевич, Т.Н. Мухина, А.Г. Богун, И.А. Дятлов // Вестник РАМН. – 2017. - N 72 (5). – С. 346–354.

5 Poyart C., Tazi A., Reglier-Poupet H., Billoet A., Tavares N., Raymond J., & Trieu-Cuot P. Multiplex PCR Assay for Rapid and Accurate Capsular Typing of Group B Streptococci. / Poyart, C., Tazi, A., Reglier-Poupet, H., Billoet, A., Tavares, N., Raymond, J., & Trieu-Cuot, P. // Journal of Clinical Microbiology. – 2007. – Vol. 45, No. 6. p. 1985–1988.

6 Amundson N. R., Flores A. E., Hillier S. L., Baker C. J., & Ferrieri P. DNA Macrorestriction Analysis of Nontypeable Group B Streptococcal Isolates: Clonal Evolution of Nontypeable and Type V Isolates / N. R., Amundson, A. E., Flores, S. L., Hillier, C. J., Baker, & P., Ferrieri // Journal of Clinical Microbiology. – 2005. – Vol. 43, No. 2. p. 572–576.

7 Borchardt S. M., Foxman B., Chaffin D. O., Rubens C. E., Tallman P. A., Manning S. D., Marrs C. F. / S. M., Borchardt B., Foxman D. O., Chaffin C. E., Rubens P. A., Tallman S. D., Manning C. F. Marrs. // Comparison of DNA Dot Blot Hybridization and Lancefield Capillary Precipitin Methods for Group B Streptococcal Capsular Typing. Journal of Clinical Microbiology. – 204. –Vol. 42, No. 1. p. 146–150.

8 Zmantar T., Chaieb K., Ben Abdallah F. et al. Multiplex PCR detection of the antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from auricular infections. / T. Zmantar, K. Chaieb, Abdallah Ben. // Folia Microbiol. – 2018. – Vol. 53, No. 4. p. 357–362.

9 Marshall S. A., Wilke W. W., Pfaller M. A., & Jones R. N. Staphylococcus aureus and Coagulase-Negative Staphylococci from Blood Stream Infections: Frequency of Occurrence, Antimicrobial Susceptibility, and Molecular (*mecA*) Characterization of Oxacillin Resistance in the SCOPE Program / S. A. Marshall, W. W. Wilke, M. A. Pfaller, & R. N. Jones // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 1998. – Vol. 30, No. 3. p. 205–214.

10 Sigmund I.K., Renz N., Feihl S. et al. Value of multiplex PCR for detection of antimicrobial resistance in samples retrieved from patients with orthopaedic infections./ I.K. Sigmund, N. Renz, S. Feihl et al // BMC Microbiol. – 2020. – Vol. 20, No. 88. p. 1–8.

11 Zimmerli W., Trampuz A., & Ochsner P. E. Prosthetic-Joint Infections / W., Zimmerli, A., Trampuz, & P. E. Ochsner, // *New England Journal of Medicine*. – 2004. – Vol. 351, No. 16. p. 1645–1654.

12 Del Pozo J. L., & Patel R. Infection Associated with Prosthetic Joints / J. L., Del Pozo, & R., Patel // *New England Journal of Medicine*. – 2009. – Vol. 361, No. 8. p. 787–794.

13 Holinka J., Bauer L., Hirschl A. M., Graninger W., Windhager R., & Presterl E. Sonication cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological diagnostics improve pathogen detection / J., Holinka, L., Bauer, A. M., Hirschl, W., Graninger, R., Windhager, & E., Presterl // *Journal of Orthopaedic Research*. – 2010. – Vol. 29, No. 4. p. 617–622.

14 Gomez E., Cazanave C., Cunningham S. A., Greenwood-Quaintance K. E., Steckelberg J. M., Uhl J. R., Patel R. Prosthetic Joint Infection Diagnosis Using Broad-Range PCR of Biofilms Dislodged from Knee and Hip Arthroplasty Surfaces Using Sonication / E., Gomez, C., Cazanave, S. A., Cunningham, K. E., Greenwood-Quaintance, J. M., Steckelberg, J. R., Uhl, R., Patel // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2012. – Vol. 50, No. 11. p. 3501–3508.

15 Байменов Б.М., Чужебаева Г.Д., Ермагамбетова С.Е. Идентификация *Staphylococcus aureus* в объектах ветеринарно-санитарного надзора методом ПЦР Real Time / Б.М. Байменов, Г.Д. Чужебаева, С.Е. Ермагамбетова // Многопрофильный научный журнал КПУ им. А. Байтурсынова «3 i: intellect, idea, innovation - интеллект, идея, инновация». Костанай. – 2020. - № 2. - с. 8-17.

16 Gan C., Hu J.F., Cao Q., Zhao R.K., Li Y.C., Wang Z.G., et al. Rapid identification of pathogens involved in pediatric osteoarticular infections by multiplex PCR. / C. Gan, JF Hu, Q Cao, RK Zhao, YC Li, ZG Wang, et al. // *Ann Transl Med*. Vol. 8, No. 203. 2020, p. 1–8.

17 Lee N., Kwon K.Y., Oh S.K., Chang H.J., Chun H.S., and Choi S.W. A Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean Ready-to-Eat Food. / N Lee, KY Kwon, SK Oh, HJ Chang, HS Chun, SW Choi. // *Foodborne Pathog Dis*. Vol. 11, No. 7. 2014, p. 574–580.

18 Coppens J., Heirstraeten L.V., Ruzin A., Yu Li., Timbermont L., Lammens C., et al. Comparison of GeneXpert MRSA/SA ETA assay with semiquantitative and quantitative cultures and nuc gene-based qPCR for detection of *Staphylococcus aureus* in endotracheal aspirate samples. / J Coppens, LV Heirstraeten, A Ruzin, Li Yu, L Timbermont, C Lammens, et al. // *Antimicrob Resist Infect Control*. Vol. 8, No. 1. 2019, p. 1–7.

19 Yang F.L., Li X.S., Liang X.W., Zhang X.F., Qin G.S., Yang B.Z. Detection of virulence-associated genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis milk samples in Guangxi. / FL Yang, XS Li, XW Liang, XF Zhang, GS Qin, BZ Yang. // *Trop Anim Health Prod*. Vol. 44, No. 8. 2012, p. 1821–1826.

20 Florindo C., Ferreira R., Borges V., Spellerberg B., Gomes J. P., & Borrego M. J. Selection of reference genes for real-time expression studies in *Streptococcus agalactiae*. / C. Florindo, R. Ferreira, V. Borges, B. Spellerberg, J. P. Gomes, & M. J. Borrego. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 90, No. 3. 2012, p. 220–227.

REFERENCES

1 Kadariya J., Smith T.C., Thapaliya D. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health / J. Kadariya, T.C. Smith, D. Thapaliya // *BioMed Research International* – 2014. – Vol. 2014. - p.1-9.

2 Balaban N., & Rasooly A. Staphylococcal enterotoxins / N. Balaban, A. Rasooly // *International Journal of Food Microbiology* – 2000. – Vol. 61 (1). - p.1-10.

3 Mead P. S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L. F., Bresee J. S., Shapiro C., Tauxe R. V. Food-Related Illness and Death in the United States / P. S. Mead, L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, R. V. Tauxe // *Emerging Infectious Diseases* – 1999. – Vol. 5(5). - p. 607–625.

4 Abaev I.V., Skryabin Yu.P., Kislichkina A.A., Korobova O.V., Miczevich I.P., Mukhina T.N., Bogun A.G., Dyatlov I.A. Genomny`j analiz shtammov *Staphylococcus aureus* klonal`noj linii 30 — vzbuditelej pishhevoj infekczii v Rossijskoj Federaczii [Genomic analysis of *Staphylococcus aureus*

strains of the clonal line 30 — foodborne infection pathogens in the Russian Federation]: / I.V. Abaev, Yu.P.Skryabin, A.A. Kislichkina, O.V.Korobova, I.P. Miczevich, T.N. Mukhina, A.G. Bogun, I.A. Dyatlov // *Vestnik RAMN.* – 2017. - N 72 (5). – St. 346–354.

5 Poyart C., Tazi A., Reglier-Poupet H., Billoet A., Tavares N., Raymond J., & Trieu-Cuot P. Multiplex PCR Assay for Rapid and Accurate Capsular Typing of Group B Streptococci. / Poyart, C., Tazi, A., Reglier-Poupet, H., Billoet, A., Tavares, N., Raymond, J., & Trieu-Cuot, P. // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2007. – Vol. 45, No. 6. p. 1985–1988.

6 Amundson N. R., Flores A. E., Hillier S. L., Baker C. J., & Ferrieri P. DNA Macrorestriction Analysis of Nontypeable Group B Streptococcal Isolates: Clonal Evolution of Nontypeable and Type V Isolates / N. R., Amundson, A. E., Flores, S. L., Hillier, C. J., Baker, & P., Ferrieri // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2005. – Vol. 43, No. 2. p. 572–576.

7 Borchardt S. M., Foxman B., Chaffin D. O., Rubens C. E., Tallman P. A., Manning S. D., Marrs C. F. / S. M., Borchardt B., Foxman D. O., Chaffin C. E., Rubens P. A., Tallman S. D., Manning C. F. Marrs. // Comparison of DNA Dot Blot Hybridization and Lancefield Capillary Precipitin Methods for Group B Streptococcal Capsular Typing. *Journal of Clinical Microbiology.* – 2004. – Vol. 42, No. 1. p. 146–150.

8 Zmantar T., Chaieb K., Ben Abdallah F. et al. Multiplex PCR detection of the antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from auricular infections. / T. Zmantar, K. Chaieb, Abdallah Ben. // *Folia Microbiol.* – 2018. – Vol. 53, No. 4. p. 357–362.

9 Marshall S. A., Wilke W. W., Pfaller M. A., & Jones R. N. *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococci* from Blood Stream Infections: Frequency of Occurrence, Antimicrobial Susceptibility, and Molecular (*mecA*) Characterization of Oxacillin Resistance in the SCOPE Program / S. A. Marshall, W. W. Wilke, M. A. Pfaller, & R. N. Jones // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* – 1998. – Vol. 30, No. 3. p. 205–214.

10 Sigmund I.K., Renz N., Feihl S. et al. Value of multiplex PCR for detection of antimicrobial resistance in samples retrieved from patients with orthopaedic infections./ I.K. Sigmund, N. Renz, S. Feihl et al // *BMC Microbiol.* – 2020. – Vol. 20, No. 88. p. 1–8.

11 Zimmerli W., Trampuz A., & Ochsner P. E. Prosthetic-Joint Infections / W., Zimmerli, A., Trampuz, & P. E. Ochsner, // *New England Journal of Medicine.* – 2004. – Vol. 351, No. 16. p. 1645–1654.

12 Del Pozo J. L., & Patel R. Infection Associated with Prosthetic Joints / J. L., Del Pozo, & R., Patel // *New England Journal of Medicine.* – 2009. – Vol. 361, No. 8. p. 787–794.

13 Holinka J., Bauer L., Hirschl A. M., Graninger W., Windhager R., & Presterl E. Sonication cultures of explanted components as an add-on test to routinely conducted microbiological diagnostics improve pathogen detection / J., Holinka, L., Bauer, A. M., Hirschl, W., Graninger, R., Windhager, & E., Presterl // *Journal of Orthopaedic Research.* – 2010. – Vol. 29, No. 4. p. 617–622.

14 Gomez E., Cazanave C., Cunningham S. A., Greenwood-Quaintance K. E., Steckelberg J. M., Uhl J. R., Patel R. Prosthetic Joint Infection Diagnosis Using Broad-Range PCR of Biofilms Dislodged from Knee and Hip Arthroplasty Surfaces Using Sonication / E., Gomez, C., Cazanave, S. A., Cunningham, K. E., Greenwood-Quaintance, J. M., Steckelberg, J. R., Uhl, R., Patel // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2012. – Vol. 50, No. 11. p. 3501–3508.

15 Bajmenov B.M., Chuzhebaeva G.D., Ermagambetova S.E. Identifikatsiya *Staphylococcus aureus* v ob`ektakh veterinarno-sanitarnogo nadzora metodom PCzR Real Time [Identification undeclared Animal Health Surveillance methodom PCR] / B.M. Bajmenov, G.D. Chuzhebaeva, S.E. Ermagambetova // *Mnogoprofil`ny`j nauchny`j zhurnal KRU im. A. Bajtursy`nova «3 i: intellect, idea, innovation - intellekt, ideya, innovatsiya».* Kostanaj. – 2020. - № 2. - st. 8-17.

16 Gan C., Hu J.F., Cao Q., Zhao R.K., Li Y.C., Wang Z.G., et al. Rapid identification of pathogens involved in pediatric osteoarticular infections by multiplex PCR. / C. Gan, JF Hu, Q Cao, RK Zhao, YC Li, ZG Wang, et al. // *Ann Transl Med.* Vol. 8, No. 203. 2020, p. 1–8.

17 Lee N., Kwon K.Y., Oh S.K., Chang H.J., Chun H.S., and Choi S.W. A Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean Ready-to-Eat Food. / N Lee, KY Kwon, SK Oh, HJ Chang, HS Chun, SW Choi. // *Foodborne Pathog Dis.* Vol. 11, No. 7. 2014, p. 574–580.

18 Coppens J., Heirstraeten L.V., Ruzin A., Yu Li., Timbermont L., Lammens C., et al. Comparison of GeneXpert MRSA/SA ETA assay with semiquantitative and quantitative cultures and nuc gene-based qPCR for detection of *Staphylococcus aureus* in endotracheal aspirate samples./ J Coppens, LV Heirstraeten, A Ruzin, Li Yu, L Timbermont, C Lammens, et al. // *Antimicrob Resist Infect Control*. Vol. 8, No. 1. 2019, p. 1–7.

19 Yang F.L., Li X.S., Liang X.W., Zhang X.F., Qin G.S., Yang B.Z. Detection of virulence-associated genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis milk samples in Guangxi. / FL Yang, XS Li, XW Liang, XF Zhang, GS Qin, BZ Yang. // *Trop Anim Health Prod*. Vol. 44, No. 8. 2012, p. 1821–1826.

20 Florindo C., Ferreira R., Borges V., Spellerberg B., Gomes J. P., & Borrego M. J. Selection of reference genes for real-time expression studies in *Streptococcus agalactiae*./C. Florindo, R. Ferreira, V. Borges, B. Spellerberg, J. P.Gomes, & M. J. Borrego. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 90, No. 3. 2012, p. 220–227.

ТҮЙІН

Бұрын жүргізілген зерттеулер малдағы стрептококктар мен стафилококктар сиырлар маститпен ауырған кезде жиі бөлінетіні анықталды [1,2,3,4,5]. Этиологиялық маңызы бар контагиозды, жоғары патогенді *Streptococcus agalactiae* және *Staphylococcus aureus*, олар ауыр маститтерді тудырады және созылмалы қабынуды тудырады, бұл соматикалық жасушалардың жоғары деңгейімен, сүтті жарамсыз етеді. Патогендік микроорганизмдердің антибиотикке төзімді түрлерімен инфекция кезінде тамақ инфекцияларының ауыр түрлері байқалады, оларды емдеу қиынға соғады.

Микроорганизмдерді сәйкестендіру және олардың антибиотикке төзімділігін диагностикалаудағы перспективалы бағыттардың бірі молекулалық-генетикалық тәсілдерді – полимеразды тізбекті реакцияны (ПТР) пайдалану болып табылады.

Мақалада ПТР циклын оңтайландыру нәтижелері келтірілген: праймерлерді тазартудың оңтайлы температурасы эксперименталды түрде таңдалды, таңдалған гендерді анықтау үшін денатурация, жасыту, элонгация кезеңдерінің оңтайлы уақыты таңдалды, соның негізінде *Staphylococcus aureus* және *Streptococcus agalactiae* және олардың бактерияға қарсы препараттарға төзімділік гендерін анықтау үшін мультиплексті НУ ПТР- хаттамасы жасалды. Өзірленген ПТР тиімділігі бойынша эксперименттердің нәтижелері келтірілген: аналитикалық сезімталдық және ерекшелік.