

**СОЗДАНИЕ НОВОЙ ПЦР (ПОЛИМЕРАЗНЫЕ ЦЕПНЫЕ РЕАКЦИИ)
СИСТЕМЫ (REAL-TIME) ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ LISTERIA
MONOCYTOGENES В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И В ОКРУЖАЮЩЕЙ
СРЕДЕ**

<https://doi.org/10.5281/zenodo.7885026>

Рузиева Комила Эрназаровна

доцент,

Бухарский инженерно-технологический институт,

Республика Узбекистан, г. Бухара

Мухамадиев Баходир Темурович

доцент,

Бухарский инженерно-технологический институт,

Республика Узбекистан, г. Бухара

Введение.

Listeria monocytogenes является пищевым патогеном для человека, который вызывает листерию, наносящий потенциальный вред здоровью иммуноослабленных людей, пожилых, беременных женщин (группы риска). Традиционные методы обнаружения данного патогена требуют до 7 дней в случае позитивного результата. Были разработаны ПЦР методы для сокращения этого времени, но они имеют некоторые осложнения из-за множества стадий обнаружения. Эти стадии нуждаются в различных манипуляциях и могут генерировать контаминанты. Во избежании этих проблем и для сокращения времени обнаружения мы разработали ПЦР – систему, которая использует простые реагенты, конечный циклер, соединенный с камерой и чистой посудой (Био-Ряд) [1]. Эта система может обнаруживать *L.mon.* в пищевых продуктах (ПП) и в окружающей среде. Она состоит из 3-х стадий: культура предварительно обогащается, экстрагируются образцы ДНК и стадию амплификации ПЦР в режиме реального времени (real-time)(в реальном времени) [2].

1. Последовательность нуклеотидов в целевом гене. Ген амплифицируется и детектируется в ходе ПЦР, используя специфические праймеры и пробы. Этот ген *h/u A*. Он кодирует детерминант для листериолизина *O*, который вовлекается в процесс вируленции и является

высоко специфичным для L.mon. Этот концевированный ген патентуется.

2. Флуоресцентная проба. Обнаружение производится в ходе амплификации, используя специфически флуоресцирующие олигонуклеотиды, названные молекулярным образцом, который гибридизируется с амплифицированным продуктом и окруженный двумя участками, которые комплементарны друг другу. Флюорофоры привязываются к 5' концу, проба прикрепляется к 3' концу молекулы ДНК. Эта проба построена таким образом, что при отсутствии целевой последовательности, два комплементарные участки гибридизуются друг с другом и проба не флуоресцирует, т.к. флюорофор и маркер теперь находятся близко друг к другу. Если L.mon. присутствует в образце, то ген h/y А амплифицируется и молекулярный образец гибридизуется с амплифицированным продуктом. В этом случае флюорофор и маркер отделяются друг от друга и проба будет флуоресцировать.

3. Промежуточный контроль. Такой контроль проводится с каждым реакционным сосудом, в качестве монитора успешной амплификации ДНК в каждой реакции. Амплификация проводится в одно и то же время, что и целевой ген L.mon., но детектируется вторым флюорофором.

Анализ является специфическим, чувствительность и разрешающая способность этой системы приводится в данной статье.

Материал и методы.

Бактериальные штаммы были получены из лаборатории многофункционального диагностического центра. Для специфических проб они культивировались в течении 18 г при 37°C в соответствующей питательной среде.

Предварительное обогащение: 25 г испытуемого образца инкубировалась в 225 мл культуральной среды в течении 24 ± 2 г при 30°C.

Экстракция ДНК: 1 мл обогащенной культуры центрифугировалась 6 мин при 12000 об/мин. В тубик добавляли 200 μ л лизирующего реагента А, перемаскивали, инкубировали 15 мин при 54°C, нагревали 6 мин при 100°C и центрифугировали 6 мин при 12000 об/мин супернатант брали для ПЦР анализа.

ПЦР анализ: в 96 луночное плато ПЦР добавляли по 5 μ л образца и смешивали с 5 μ л реагента. В (специальная флуоресцентная проба) и 40 μ л реагента С (оптимизированная смесь для амплификации, содержащая

целевую полимеразу, специальные праймеры, gHTФ, промежуточный, внутренний контроллер и буфер). Затем проводили ПЦР анализ.

Результаты и их обсуждение

1. Специфичность метода определяли тестированием реакции 50 штаммов *L.mon.* и 39 других штаммов. Результаты сведены в табл.1. Все тестированные штаммы *L.mon.* давали положительный результат, а все остальные штаммы показали отрицательный результат. Таким образом, эти данные показывают высокую специфичность предложенного нами теста.

Таблица 1.

Штаммы бактерий тестированных на наличие реакции (+ или -)

Роды/виды	Серовар	Количество проверенных пятен	Полученные результаты
Листерия моноцитогенная	ND	8	+
Листерия моноцитогенная	1/2	2	+
Листерия моноцитогенная	1/2 a	10	+
Листерия моноцитогенная	1/2 b	3	+
Листерия моноцитогенная	1/2 c	2	+
Листерия моноцитогенная	3 a	2	+
Листерия моноцитогенная	3 b	3	+
Листерия моноцитогенная	3 c	3	+
Листерия моноцитогенная	4 a	2	+
Листерия моноцитогенная	4 b	9	+
Листерия моноцитогенная	4 c	2	+
Листерия моноцитогенная	4 da	1	+
Листерия моноцитогенная	4 c	1	+
Листерия	7	2	+

моноцитогенная			
Листерия серая	ND	2	-
Листерия невинная	ND	2	
Листерия невинная	6 a	1	-
Листерия невинная	6 b	1	-
листерия винная	ND	1	-
листерия винная	5	1	-
Листерия силигери	ND	3	-
Листерия силигери	1 / 2 b	2	-
Листерия вельшими	ND	1	-
Листерия вельшими	4 c	1	-
Листерия вельшими	6 b	1	-

2. Чувствительность данного метода в отношении *L.mon.* проверялась использованием серии разбавлений частой целевой ДНК, чистую суспензию культуры *L.mon.* и множество образцов ПП Spiked с различными концентрациями *L.mon.* Результаты показывают, что данный метод имеет уровень чувствительности в 5 копий целевого гена, или может детектировать 10^2 *L.mon.* КФЕ/мл, а также от 1 до 10 КФЕ в 25 г образца различных ПП (табл.2).

Таблица 2.

Чувствительность образцов

Матрицы	КФЕ / 25 g
Копченый лосось	2 до 20
паштет	2 до 20
Влажный корм для кошек	2 до 20
Непастеризованное коровье молоко	2 до 20
Морковь	1 до 10
Сыр-1	1 до 10
Сыр-2	1 до 10
Сыр-3	1 до 10
Пастеризованное коровье молоко-1	1 до 10
Пастеризованное коровье молоко-2	1 до 10
Пастеризованное овечье молоко	1 до 10
Непастеризованное овечье молоко	1 до 10

3. Разрешающая способность метода.

Данный метод сопоставлялся с двумя другими методами. 1-й, PROBELLA ТМ, который принадлежит AFNOA [2]. Он является ПЦР методом, который

проводится после стадии предварительного обогащения, подобно наш метод. В соответствии с ним амплифицированные ПЦР – продукты детектируются в 96-луночном плато после сэндвич гибридизации и колориметрического определения. 2-й метод, используемый для сравнения относительной разрежающей способности является иммуно-ферментативный типа ELISA [3]. Подобно PROBELLA и метод ELISA, наш метод способен обнаруживать 3-4 КФЕ L.mon. в 25 г сыра (табл.3).

Таблица 3.

Сравнение результатов двух методов на пробах из молока

Уровень заражения L.mon. КФЕ/ 50 г	Наш метод	PROBELL однократное обогащении	PROBELL двойное обогащение
- 70	+	+	+
- 50	+	+	+
6 – 8	+	+	+
2 - 3	+	+	+
0	0	0	0

Однако, метод ELISA предусматривает дополнительное 24 г обогащение для получения чувствительного эквивалента к методу PROBELLA. Метод ELISA также менее чувствительна по сравнению с нашим методом при обнаружении L.mon. в 50 г голубого сыра, даже после проведения дополнительного 24 г обогащения (табл.4.).

Таблица 4.

Сопоставление двух методов на образцах 24 г , 48 г

Уровень заражения L.mon. КФЕ/ 50 г	Наш метод	PROBELL ELISA однократное обогащении	PROBELLA двойное обогащение
- 100	+	+	+
- 20	+	+	+
- 10	+	+	+
- 5	+	+	
- 3	+	0	+
- 1	+	0	0
0	0	0	0

По сравнению с PROBELLA наш метод способен обнаруживать также в образце, содержащей 5 КФЕ и даже с 1-2 КФЕ L.mon. в 25 мл непастеризованного молока (табл.5). Поэтому наш метод показывает

чувствительность такую же, или лучше, чем PROBELLA и ELISA при обнаружении L.mon. [5,6,7].

Таблица 5.

Сопоставление результатов анализа по двум методам на примере образцов рыбных кормов

Уровень заражения L.mon. КФЕ/ 25 мл	Общие число проб	PROBELLA			
		+	-	+	-
30 – 60	5	4	0	4	0
10 – 20	12	11	0	11	-
5 – 10	12	10	1	10	2
1 – 4	12	11	2	11	2
1 – 2	12	8	4	7	5
0	12	0	11	0	13

Далее, 5 неизвестных образцов тестировались, используя наш метод или другие методы при лабораторном исследовании. Результаты совпадают с полученными в других исследовательских центрах (табл.6), использующие методы, отличающиеся от нашего.

Таблица 6.

Результаты, полученные из анализа 5 неизвестных проб в различных лабораториях

Пробы	Результаты анализа	Результаты, полученных другими методами в разных центрах	Совпадении
1	+	+	100 %
2	+	+	100 %
3	+	+	100 %
4	+	+	100 %
5	+	+	100 %

Исследование матрикса. Наш метод успешно подтверждался на многих образцах ПП (табл.7).

Таблица 7.

Тестируемые материксы ПП (образцы ДНК разбавлялись 1/10)

	Матрикс
1	Копченая колбаса
2	Непастеризованное молоко
3	Марковь

4	Сыр
5	Пастеризованное коровье молоко
6	Пастеризованное козье молоко
7	Непастеризованное козье молоко
8	Яйцо
9	Мясо
10	Пирожное

Заключение.

Приведенные в статье результаты показывают высокую специфичность и чувствительность нашей системы для обнаружения *L.mon.* в различных образцах ПП. Детекция проводится в режиме реального времени, делая метод быстрым, чем другие ПЦР-системы. Риск контаминации значительно уменьшается, т.к. и амплификация и детекция проводятся в закрытом сосуде. Этот метод прост для применения, т.к. использует простые реагенты и приборы. Анализ проводится в 96-луночном плато, очень простой формат для анализа. Разрабатываются другие форматы для применения.

Ключевые слова: патогенные бактерии, *L.mon.*, детекция, ПЦР –анализ, ELISA, чувствительность, специфичность, разрешающая способность.

Резюме. Предлагаемый метод является коммерчески доступным средством ПЦЗ анализа в режиме реального времени для обнаружения листерии в пищевых продуктах и в пробах из окружающей среды. Этот анализ состоит из амплификации и обнаружении высоко концентрированных генов листерии, используя флуоресцентные пробы.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Shindler V et. all. "Bio-Rod" PCA Program, ITBV, Marnes la Conguctte, France, 2018.
2. Cossard et al. Infection and Immunity, 106, 122-128, 2018.
3. Tyagi et al. Nature Biotechnology, 44, 101-108, 2016.
4. Мухамадиев Б.Т. «Эндогенные токсиканты пищевых продукты», *Proced.Int.Con.,Germany, V.I., Issue 5, Nov. 2021.*
5. Mukhamadiev B.T. "Immune-enzyme method of food safety analysis." *IOP Cons.ser. 848, 012185, pp. 1-7, 2021*
6. Mukhamadiev B.T. "Implementatin ELISA method in food safety analysis", *Int.Congr. Food Science and Technobogy, Brisban, Australia, 104, 2009*

7. Mukhamadiev B.T. "Chemical Risk analysis of foods by ELISA", Int.ang EEFOST, Budapest, Hungary, 171, 2009
8. Рузиева К.Э., Мухамадиев Б.Т. Определение критических контрольных точек в цепи агрофудов производства. UNIVERSUM: Технические науки (научные журнал) . № 3 (96) март 2022, Часть 4 С. 31-34
9. Бердиева З. М., Касимова Ш. А. ВЛИЯНИЕ ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТЫ, ГЛАБРИДИНА И РЕСВЕРАТРОЛА НА РЕПЛИКАЦИЮ SARS-КОРОНАВИРУСА //Universum: химия и биология. – 2021. – №. 7-1 (85). – С. 52-54.
10. Бердиева З. М., Мухамадиев Б. Т. БЕЗОПАСНОСТЬ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ (ФПП) //БЕЗОПАСНОСТЬ. – 2022. – Т. 95. – №. 2.
11. Бердиева З. М. ЮҚОРИ ТАРКИБЛИ ТРАНС-РЕСВЕРАТРОЛ САҚЛАГАН ҚОРА ТУТ ТАБИИЙ ХОМАШЁ СИФАТИДА //PEDAGOGS journali. – 2022. – Т. 22. – №. 2. – С. 8-12.
12. Mukhiddinovna B. Z., Temurovich M. B. Process Generated Contaminants //Czech Journal of Multidisciplinary Innovations. – 2022. – Т. 4. – С. 17-20.
13. Mukhiddinovna B. Z., Temurovich M. B. Optimization Methodology for Supercritical Co2 Extraction of Resveratrol From Mulberry Leaves //The Peerian Journal. – 2022. – Т. 12. – С. 63-67.
14. Жумаев Ж. Х., Ахмедов В., Шарипова Н. У. Влияние природы и количества катализатора при синтезе морфолиновых ненасыщенных продуктов при участии винилацетилена //Москва. – 2021. – С. 58-61.
15. Ramazanov B., Juraeva L., Sharipova N. Synthesis of modified amino-aldehyde oligo (poly) mers and study of their thermal stability //IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – IOP Publishing, 2021. – Т. 839. – №. 4. – С. 042096.
16. Атоев Э. Х., Гафурова Г. А. Рафинирование и экстракция семян тыквы сверхкритической углекислотой //Universum: технические науки. – 2020. – №. 5-2 (74). – С. 26-28.
17. Атоев Э. Х. ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИЕ ОКСИАЗОСОЕДИНЕНИЯ КАК АНАЛИТИЧЕСКИЕ РЕАГЕНТЫ //Universum: химия и биология. – 2021. – №. 3-2 (81). – С. 4-6.

18. Атоев Э. Х. Строение и свойства внутрикомплексных соединений 8-меркаптохинолина (тиооксина) и его производных //Universum: химия и биология. – 2020. – №. 10-2 (76). – С. 29-32.