

АҒЗАДА БЦЖ ВАКЦИНАСЫНЫҢ ТУБЕРКУЛЕЗ ШТАММЫНЫҢ БОЛУ МЕРЗІМІН АНЫҚТАУ ҮШІН МОЛЕКУЛЯРЛЫҚ-БИОЛОГИЯЛЫҚ ПТР ӨДІСІН ҚОЛДАНУ

Қ. Ж. Кушалиев, вет. ғылымдарының докторы, профессор
М. Г. Какишев, Г. А. Джанузакова, магистрант

Жәңгір хан атындағы Батыс Қазақстан аграрлық-техникалық университеті

Мақалада туберкулездің ауылшаруашылыққа зияны және оның таралу жолдары көрсетілген. ДНК-ның бөліну әдісі қарастырылды. ПТР көмегімен жануарлар қанында микобактерия вакциналық штамының ДНК-сы бар екендігі көрсетілген. Экспериментте зерттеу объектісі ретінде теңіз шошқалары алынған.

В статье приведено эпизоотическое состояние по туберкулезу КРС. С помощью ПЦР в крови животных выявлена ДНК вакцинного штамма микобактерии. Описана методика выделения ДНК. В качестве объекта исследования использовались морские свинки.

Epizootically condition of cattle tuberculosis is given. The technique of DNA allocation is described. By means of PCR in blood of animals DNA vaccinal shtamme is revealed. Object of research were cavia porcellus.

Ірі қара малдардың туберкулез ауруына шалдығуымен байланысты, мал шаруашылықтарына үлкен экономикалық шығын әкеледі, ал оның етін, сүтін пайдаланатын халыққа қауіп төнеді.

Қазақстан әр түрлі табиғи-климаттық жағдайдағы үлкен территорияны қамтиды, осыған байланысты мал шаруашылығын жаңа шартпен жүргізудегі жануарлар туберкулезінің эпизоотикалық жағдайы және Қазақстан Республикасының әр түрлі облыстарындағы осы инфекциямен күресу жолдарының жасалынуы бақылауға алынады [1, 2].

Эпизоотияны сақтап қалу – қажетті шаруашылықаралық, өлкеаралық және мемлекеттік байланыстарды дамытып, сол қалпында сақтап тұрады, ал адамзат үшін қауіпті жануарлар ауруымен сәтті күресу – еліміздегі халық денсаулығының қорғалуын және сақталуын қамтамасыз етеді [3].

Ірі қара туберкулезі ауруы бойынша мониторингі тері ішілік туберкулинизациямен жүргізіледі, 2007 жылы 12 454,7 мың бас тексеріліп, 593 бас оң көрсеткіш анықталды немесе 4,6 % (0,01 %), 2008 жылы 12 474 мың бас тексеріліп, 399 бас белгіленді немесе 3,1 % (0,0064 %) [4, 5].

Үй және жабайы жануарлардың, кәсіпшіл аңдардың, құстардың (сүтқоректілердің 55 түрі және құстардың 25 түрі) көптеген түрлері туберкулезді қабылдауға бейім болады. Бұл ауру көбінесе ірі қара малында, шошқада, тауықта және құндызда жиі кездессе, ешкіде, итте, үйрек және қазда сирек, ал қой, жылқы және мысықта өте сирек кездеседі. Маймылдардың туберкулезге сезімталдығы жоғары болады. Жабайы тұяқтылардың ішінде маралдар жиі ауырады. Адам да туберкулезбен жиі ауырады.

Инфекцияның қоздырғыш көзі туберкулезге шалдыққан жануарлар болып табылады, қоздырғыш ағзадан сүтпен, фекалиймен, мұрын ағынымен, кейде шәуітпен бөлініп шығады. Сиырлар туберкулез микобактериясының кез келген түрімен зақымданған кезде, қоздырғыш сүтпен бөлініп шығады.

Туберкулез қоздырғышының факторлары ауру жануарлардың азығы, суы, мал жайылымдары, көң төсеніші және т.б. арқылы таралады. Жас төлдер туберкулезді көбінесе ауру жануарлардың сүтінен және көк сүт арқылы жұқтырады. Құрсақ ішінде де бұзаулар зақымдалуы мүмкін. Егер, жануарлар туберкулезге шалдыққан адамдармен байланысса, қоздырғыштың адамдық түрімен де зақымдануы мүмкін.

Жануарлар туберкулезбен көбінесе алиментарлық жолмен зақымдалады, сонымен қоса аэрогендік зақымдануы да болады, бұл әсіресе ауру және сау жануарларды жабық, шамалы желдетілген жерде ұстаған кезде болады. Шошқалар асханалық шикі қалдықтармен азықтанғанда, сонымен қатар туберкулезбен ауыратын құстармен байланыста болғанда жиі ауырады. Құстар алиментарлық жолмен зақымдалады, бірақ тауықтарда туберкулездің трансвариальді түрі де болады. Туберкулезбен ауыратын құстар зақымдалған жұмыртқа береді. Зақымдалған жұмыртқаларды инкубациялау кезінде көптеген эмбриондар өліп қалады, ал шыққан балапандардың тең жартысы туберкулез қоздырғышының көзі болып табылады. Жабайы құстар туберкулез қоздырғышының барлық үш түрін де алып жүруі мүмкін.

Бұл инфекциямен күресу жолдарының дұрыс дамымауы және аурудың әлеуметтік қауіптілігі – шаруашылық түрлерінің көп тәсілділігін және мал шаруашылық технологиясы есебімен пәрменді шаралардың өңдеуін талап етеді.

Біздің жұмысымыздың мақсаты теңіз шошқалар ағзасында микобактерияның болу мерзімін анықтау болып табылады.

Теңіз шошқалары тері астымен, оң шабының медиалдық бетінде 2 млрд. м. т дозасымен (лайланудың оптикалық бактериялық стандарты бойынша) БЦЖ вакцинасымен иммунизирленді.

ПТР (полимераздық тізбекті реакция) – зерттеудің молекулярлық-генетикалық әдісі. ПТР әдісі арқылы тікелей клиникалық материалдағы (цервикалды арнадан алынған эпителиальды жасушалардың соскобтары, уретрлар, көздердің, жұтқыншақтың артқы қабырғасының конъюнктивтері, зәр, шәует тұнбалары және т.б.) қоздырғышты анықтауға болады. Инфекциялардың тек асқынған түрлеріне ғана емес, сонымен бірге латенттік түрлеріне де диагностика жүргізуге мүмкіндік береді. Әдістің негізі *in vitro*-да әр түрлі ферменттерді пайдаланып, ДНҚ-н анықталған бөлігін көшіру болып табылады. ПТР 3 кезекті стадиялардан тұрады (денатурация, жасыту, элонгация) (Mullis, 1987) [6].

Әдетте зерттеуде қандай да бір ағзаның идентификациясы төзімділік генінен, промотордан, сонымен қатар геннен болады. Консервативті гендер, орташа консервативті гендер және төмен консервативті гендер бөлініп алынады. Консервативті гендер, бұл – эволюцияда ақырын ауысып тұратын тізбектілік. Консервативті гендер клетканың генетикалық аппаратын кодтайды. Ағзада консервативті гендерді талдай келе, біз ағзаны класс бойынша идентифицирлей аламыз. Орташа консервативті гендер – бұл, мысалы, үй шаруашылығының гендері. Орташа консервативті гендерді зерттеу арқылы ағзаның туыстасын анықтай аламыз. Сонымен қатар, төмен консервативті гендер (кератиндер) және күшті вариабельді гендер (МНС), олар бойынша ағзаның түрін де анықтауға болады.

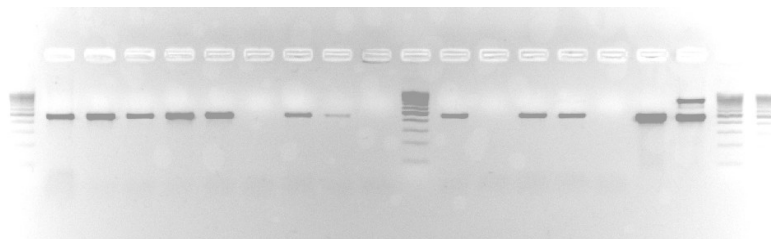
Ішкі транскрибирлік спейсер деп (ITS) – РНҚ рибосомасының құрылымдық бірліктері арасында орналасқан функционалдық емес РНҚ бөлігін атайды. рРНҚ генінің кластерінен РНҚ-полимераза I арқылы ақпарат оқу үрдісінде 5'-транскрибирлеу спенсерімен (5' ETS) аяқталатын 5'-тан 3' бағытындағы біріншілік транскрипт – 45S РНҚ және 18S рРНҚ, ITS1, 5.8S рРНҚ, ITS2, 28S РНҚ, 3'ETS түзіледі. ITS пісіп жетілу үрдісінде тізбектіктер қиылып, деградирленеді, ал РНҚ-н құрылымдық бірліктері рибосома суббірліктерін жинақтауына қолданылады.

ITS тізбектерін салыстыру таксономияда және молекулярлы филогенияда кеңінен пайдаланылады, өйткені ДНҚ аз мөлшерде болса да олар жылдам амплифицирленеді және жақын туыс түрлер арасында өзгерудің жоғары деңгейіне ие болады.

Біздің жұмыста түр идентификациясы үшін ядрошықтық рДНҚ-н ITS тізбектері қолданылады. Берілген мақсатқа олардың пайдалану мүмкіндігі жақында білінді [Soltis D.E., Soltis P.S., 2000]. Бұл – орташа консервативті гендер. Полицистрон эукариотының прерибосомалық РНҚ – 45S рРНҚ-негізін салушы деп аталады. Бұлар эукариот ядрошықтарында рибосомалық ген кластерінен түзіледі [7].

Жоғарыда көрсетілгендей, олар түрлерді ажыратуға мүмкіндік береді. Бұл тізбектердің артықшылығы ол олардың өзгермелі болуы, ал рРНҚ гендерінің фланкирлеуші тізбектері жоғары консервативті болады. Мұнда өзгермелі тізбекке таңдалған праймерлерді емес, рРНҚ тізбегіне таңдалған сол праймерлерді ғана қолданғандықтан, салыстырмалы жақын түрлерінің бір уақытта, тек бізге қажетті тізбекті дәл және жоғары нәтижелілікпен амплифицирлеуге мүмкіндік береді.

Теңіз шошқалары қанынан ДНҚ-ны бөліп алу үрдісі Амплисенс «ДНҚ-сорб-Б» атты коммерциялық жиын көмегімен жүргізіледі. 100 мкл *M. Tuberculosis* spp сынамасына 300 мкл лизирленген ерітіндіден құралған алдын ала дайындалған ерітінді және 10 мкл ВКО *Mycobacterium tuberculosis complex* қосылады. Сынамалар 65 °С 5 минутта лизиске ұшырайды, кейін 25 мкл сорбент суспензиясы қосылады. Сорбент 5 мың айн/мин, 30 сек микроцентрифугада тұнбаланып, супернатант бөліп алынады. Бұдан кейін № 1 шайып алу



үрдісі (300 мкл) және № 2 шайып алу (500 мкл) үрдістері орындалады. № 2 шайып алу үрдісі қайталанады. Элюцияны 50 мкл ТЕ-буфермен жүргізеді. ДНҚ-ны бөліп алу сапасы агароздық геледе электрофорез әдісімен анықталады (1-сурет).

1-Сурет – ДНҚ микобактериясын анықтаудағы ПТР нәтижелері

42 циклден тұратын амплификация бағдарламасы жасалынды. Бұл бағдарламада 1 этап «денатурация» 95 °С 3 минут, 2 этап «жасыту» 63 °С 1 минут және 3 этап «элонгация» немесе «талдау» 72 °С 1 минут болады.

Реакциондық қоспаның құрамында келесідей компоненттер болады: праймерлер, ПТР жүргізу үшін буфер, MgCl 1.5 М, дизоксинуклеотидтрифосфат қоспасы dNTP және Taq-полимераза.

Праймерлерді тандау *M. Tuberculosis* spp бойынша қолда бар әдебиеттер негізінде алынды. Әдебиеттер материалдарын өңдеу нәтижесінде туберкулез ауруының қоздырғышын анықтау үшін жұп праймерлер таңдап алынды. Vector NTI бағдарламасы көмегімен компьютерлік талдау негізінде таңдап алынған 2 жұп праймерлер талданды. Талдау нәтижесінде таңдалынған *M. Tuberculosis* spp үшін спецификалық жұп праймерлер IS6110-F 239 (T C A G G T G G T T C A T C G A G G A G G T A C) және IS6110-R 240 (G G T C T T G T A T A G G C C G T T G A T C G T).

ПТР өнімдерін агароздық геледе электрофорез әдісімен зерттеу нәтижесінде біз жануарлар қанында ДНҚ вакцинасы бар екендігін көрсететін ерекше анық жолақтар алдық. ДНҚ жануар қанында 5-7 күн ағымында идентифирленді. Берілген кезеңнен кейін зертханалық жануарлар қанында ДНҚ вакцинасы табылмады.

ӘДЕБИЕТТЕР ТІЗІМІ

1. Аленушкина, А. В. Медицинская микробиология / А. В. Аленушкина. // Ростов-на-Дону : «ФЕНИКС» – 2003. – 51 с.
2. Абуталипов, А. А. Методические указания по проведению анализа ДНК методом полимеразной цепной реакции ПЦР / А. А. Абуталипов, В. Е. Тен. // ДГП «Научно-Исследовательский Ветеринарный Институт» РГП «НПЦ Жив» МСХ РК, Алматы. – 2007. – 38 с.
3. Зиновьева, Н. А. Методы исследований в биотехнологии сельскохозяйственных животных / Н. А. Зиновьева. // ВИЖ – 2002.
4. Авилов, В. М. Актуальные проблемы профилактики особо опасных инфекций у животных [Текст] / В. М. Авилов, В. А. Седов. // Ветеринария. – 1994. – №6. – С. 3-6.
5. Бадашкева, А. Г. Меченные биотином олигонуклеотиды как зонды в методе молекулярной гибридизации / А. Г. Бадашкева. // Молекулярная биология. – 1989. – Т. 23. – Вып. 5. – С. 1221-1226.
6. Mullis, K. B. Process for amplifying nucleic acid sequences. / K. B. Mullis. // U.S. Patent. – 1987. – Vol. 4. – P. 202.
7. Soltis, D. E., Angiosperm phylogeny inferred from 18S rDNA, rbcL, and atpB sequences. / D. E. Soltis, P. S. Soltis, M. W. Chase, M. E. Mort, D. C. Albach, M. Zanis, V. Savolainen, W. H. Hahn, S. B. Hoot, M. F.

Fay, M. Axtell, S. M. Swensen, L. M. Prince, W. J. Kress, K. C. Nixon, J. S. Farris. // Botanical Journal of the Linnean Society – 2000. – Vol. 133. – P. 381-461.