

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы Алиевой Гульнур Козыевны
на тему «Внутривидовые особенности и различия профилей
резистентности штаммов *Staphylococcus* spp., циркулирующих в
Северном регионе Казахстана»
представленной на соискание степени доктора философии (PhD) по
специальности 6D120200 – Ветеринарная санитария

Актуальность темы.

Стафилококковые инфекции разнообразны и включают более 100 нозологических форм. Исследования по анализу видов и свойств стафилококков обитающих в организме животных и домашней птицы, ограничены. Тема диссертационной работы актуальна на сегодняшний день, так как видовой спектр и внутривидовые особенности стафилококков мало изучены в ветеринарной практике, тем более что имеется большое количество работ, доказывающих повышение вирулентных свойств коагулазотрицательных стафилококков (КОС), ранее считавшихся безопасными.

В последние годы основной проблемой является широкое распространение устойчивых видов стафилококков в Казахстане и во всем мире и снижение эффективности ряда антибиотиков. Устойчивые клоны, которые стабильны у животных, могут распространяться на людей через пищевую цепочку или при прямом контакте с животными. Определение устойчивости к антибиотикам микробиологическим и молекулярно-генетическим методами дает четкую картину состояния устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, позволяет прогнозировать возникновение устойчивости к различным группам противомикробных препаратов, а также оценивать распространение устойчивых штаммов на местном и региональном уровнях.

Цель исследования: определить профиль устойчивости и внутривидовых особенности видовой спектра штаммов *Staphylococcus* spp., выделенных из животных, птиц и продуктов животного происхождения в северном регионе Казахстана.

Для выполнения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Выделение и идентификация штаммов *Staphylococcus* spp из животных, птиц и продуктов животного происхождения в северном регионе Казахстана;

2. Изучить основные биологические свойства изолятов стафилококков, выделенных из различных биотопов (факторы вирулентности, персистенции и т.д.), изучить видовой спектр и определить внутривидовые особенности;

3. Определение фенотипической устойчивости к антибактериальным препаратам и проведение отбора резистентных и полирезистентных штаммов стафилококков;

4. Определение генетического профиля устойчивых к антибиотикам штаммов стафилококков;

Объект исследования: бактериальные изоляты стафилококков, выделенные из различных источников циркулирующих в Северном регионе Казахстана.

Предмет исследования: антибиотикорезистентность и молекулярно-генетические механизмы устойчивости штаммов *Staphylococcus spp*

Методы исследования. Работа проводилась в лабораториях микробиологии и молекулярно-генетического анализа на базе Научно-исследовательского института прикладной биотехнологии НАО «КРУ им.А. Байтурсынова», лаборатории микробиологии Института микробиологии и вирусологии Литовского университета наук здоровья (г.Каунас).

Выделение и идентификацию штаммов стафилококков проводили согласно методическим указаниям.

Молекулярно-генетические методы

Типирование штаммов стафилококков проводили по методу Сенгера. Детекцию генов резистентности проводили методом ПЦР с визуализацией продуктов амплификации в агарозном геле. В качестве праймеров использовали олигонуклеотидные последовательности из литературных данных.

Тестирование антибиотикорезистентности

Чувствительность штаммов к антибактериальным препаратам проводили методом диско-диффузии, согласно методическим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Интерпретацию зон задержки роста проводили согласно рекомендациям EUCAST.

Спектрофотометрические методы

Определение способности штаммов стафилококков формированию биопленок на поверхности полистиролового планшета проводили методом окраски кристаллическим фиолетовым. Измерение оптической плотности проводили на многоканальном микробиологическом спектрофотометре Multiskan при длине волны 620 нм.

Основные положения выносимые на защиту.

1. Видовой спектр стафилококков, выделенных из различных биотопов сельскохозяйственных животных и птиц северного региона Казахстана.

2. Виды и совокупность факторов вирулентности коагулаз-положительных и коагулаз-отрицательных видов стафилококков, внутривидовые особенности.

3. Фенотипическая и генотипическая устойчивость видов стафилококков к различным группам антибактериальных препаратов.

Научная новизна

Впервые проведен сравнительный анализ видовых особенностей и биологических свойств различных штаммов стафилококков, выделенных из сельскохозяйственных животных, птиц и продуктов животного происхождения. Установлено, что видовой состав стафилококков отличается значительным разнообразием.

Было показано, что подавляющее большинство изолированных штаммов стафилококков, включая КОС, имеют определенный набор факторов вирулентности независимо от выделенного источника.

Кроме того, среди изученных штаммов часто выявлялись изоляты с определенным набором факторов вирулентности. Большинство изолированных стафилококков способны образовывать биопленку.

Впервые в северных областях республики проведен анализ антибиотикорезистентности штаммов стафилококков, выделенных в животноводческих хозяйствах и продуктах животного происхождения, и получены данные о генетическом профиле вирулентности.

Были обнаружены чувствительные, устойчивые и полирезистентные штаммы. Наибольшее количество изолятов устойчиво к различным антибиотикам группы β – лактамов, в то время как наименее устойчивые изоляты были идентифицированы в группах аминогликозидов и сульфаниламидов.

Практическая значимость работы.

Результаты расширяют представления об экологии стафилококка, особенностях и различиях биологических свойств штаммов стафилококков, выделенных из различных источников.

Работа имеет не только фундаментальное, но и практическое значение в животноводческом производстве: получены данные, показывающие возможность широкого распространения различных видов *S.aureus* и коагулаз-отрицательных стафилококков (КОС). Наличие факторов вирулентности и полирезистентных штаммов среди стафилококков, колонизирующих животных и птиц, представляет потенциальную угрозу для здоровья населения через продукты животного происхождения. Знание бактериальной устойчивости к антибиотикам имеет решающее значение для успешной борьбы с болезнью. В ходе выполнения работы ветеринарные специалисты хозяйств проявили очень большой интерес к определению чувствительности/устойчивости к антибактериальным препаратам при лечении инфекционных заболеваний животных, особенно маститов коров.

Связь работы с научно-исследовательскими программами

Работа выполнена в рамках 2-х научных проектов:

- проект грантового финансирования МОН РК №AP05131447 «Мониторинг антибиотикорезистентности возбудителей энтеропатогенных зооантропонозных заболеваний Северного региона Казахстана» по бюджетной программе 217 «Развитие науки», подпрограмме 102 «Грантовое финансирование научных исследований»;

- проект «Анализ рисков появления резистентности к антибиотикам патогенной микрофлоры, выделяемой от животных и из сырья и продуктов животного происхождения» в рамках научно-технической программы BR10764944 «Разработка методов аналитического контроля и проведения мониторинга безопасности пищевой продукции» финансируемой Министерством сельского хозяйства в рамках бюджетной программы 267 «Повышение доступности знаний и научных исследований», подпрограмма

101 «Программно-целевое финансирование научных исследований и мероприятий».

Публикация результатов научных исследований

По теме диссертации опубликовано 9 статей, в том числе 3 статьи в изданиях, рекомендованных комитетом по обеспечению качества в сфере образования Министерства образования РК, 2 статьи в журналах, входящих в состав Российского индекса научного цитирования, а также опубликовано 2 статьи в научных изданиях, входящих в международные базы данных Web of Science (Clarivate Analytics) и Scopus (Elsevier) - 86 перцентилей и 15 перцентилей по общей ветеринарии, а также 2 статьи опубликованы в материалах международных конференций. Получен 1 патент на полезную модель, имеется 2 акта внедрения в производство и 1 акт внедрения в учебный процесс.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных данных определяется достаточным объемом проведенных исследований, применением современных методов. Результаты НИР отражены в заключительном отчете по проекту AP05131447 «Мониторинг антибиотикорезистентности возбудителей энтеропатогенных зооантропонозных заболеваний Северного региона Казахстана» (рег.№ 0118РК00397, инв.№ 0220РК00538).

Личный вклад автора

Автор принимал участие во всех этапах исследования: выделения и идентификации изолятов, изучения факторов вирулентности, образования биопленок, устойчивости стафилококков к антибактериальным препаратам, а также исследования методом ПЦР. Обзор и анализ литературных источников, обработка, анализ и интерпретация результатов исследования были сделаны автором лично.

Результаты исследований:

1. Исследовано 1811 образцов биологического материала от животных и птиц, доставленных из хозяйств, продуктов животного происхождения (сырья и готовой продукции), отобранных в розничных торговых точках, выделено 342 изолята стафилококка.

2. Установлено, что видовой состав стафилококков отличается значительным разнообразием. Культуральными, биохимическими, молекулярно-генетическими и Maldi-масс-спектрометрическими методами было идентифицировано 13 типов коагулазо-положительных и коагулазо-отрицательных стафилококков: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. chromogenes*, *S. sciuri*, *S. xylosus*, *S. cohnii*, *S. agnetis*, *S. fleurettii*, *S. simulans*, *S. arlettae*, *S. gallinarum*, *S. saprophyticus*, *S. hyicus*.

3. Было показано, что подавляющее большинство изолированных штаммов стафилококков, включая КОС, имеют определенный набор факторов вирулентности независимо от источника выделения.

4. Было обнаружено, что большинство выделенных изолятов стафилококка способны образовывать биопленки.

5. Проведён анализ антибиотикорезистентности штаммов стафилококка, циркулирующих в животноводческих хозяйствах и продуктах животного происхождения северных областей Республики. Установлены устойчивые и полирезистентные штаммы. Наибольшее количество изолятов устойчивых к различным антибиотикам выявлено к группе β – лактамов, наименее устойчивые штаммы – к группе аминогликозидов – 11% и к группе сульфаниламидов -16,1%.

6. Получены данные о генетическом профиле вирулентности. Для большинства изученных антибактериальных препаратов (β -лактамов, макролидов и аминогликозидов) установлена надежная связь между наличием генов, кодирующих резистентность, и данными фенотипического метода определения чувствительности.

Практические предложения

1. При выделении из патологического или биологического материала коагулазонегативных стафилококков (*S. intermedius*), проводить исследования факторов их вирулентности как возбудителей инфекции;

2. При инфекционных заболеваниях животных направлять биоматериал в ветеринарные лаборатории с указанием исследований на чувствительность к антибактериальным препаратам выделенных возбудителей и выдачей протокола исследования с рекомендациями по выбору антибактериальных препаратов.

Объем и структура диссертации.

Диссертационная работа представлена на 142 страниц компьютерного текста и состоит из введения, основной части и заключения. Текст диссертационной работы содержит 51 таблиц, 42 рисунка, 2 формулы, 8 приложений. Список использованной литературы состоит из 223 источников.