

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы Мендыбаевой Анары Муратовны
на тему «Исследование особенностей фенотипической и генотипической
резистентности штаммов *Salmonella enterica*, циркулирующих в Северном
регионе Казахстана»

представленной на соискание степени доктора философии (PhD) по
специальности 6D120200 – Ветеринарная санитария

Актуальность темы исследования. Развитие и распространение устойчивости к антибиотикам является одним из наиболее важных эволюционных изменений в современную эпоху. Устойчивость к противомикробным препаратам - проблема общественного здравоохранения, вызывающая озабоченность во всем мире. Резистентность резко возросла среди бактерий, имеющих клиническое значение, по сообщениям Craig Baker-Austin с соавторами первопричиной является селективное давление, вызванное широким использованием коммерческих антибиотиков в медицине и ветеринарии.

В 2015 году на 68-ой сессии Всемирной организации здравоохранения принят глобальный план действий по устойчивости к противомикробным препаратам. Констатируя неотложную потребность в более скоординированной и гармонизированной системе надзора для мониторинга устойчивости к противомикробным препаратам на национальном, региональном и глобальном уровнях, ВОЗ предложил международным, региональным и национальным партнерам осуществить необходимые мероприятия с целью внести вклад в решение задач масштабного плана действий по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам.

В конце 2016 года страны - члены ООН приняли совместное заявление о необходимости принятия мер по борьбе с лекарственно-устойчивыми микроорганизмами и обеспечить контроль за применением противомикробных препаратов. За всю историю существования организации проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов стала четвертой проблемой здравоохранения, вынесенной на обсуждение Генеральной ассамблеи после ВИЧ-инфекции, лихорадки Эбола и неинфекционных заболеваний (таких как болезни сердца, сахарный диабет и другие).

Salmonella входит в число микроорганизмов, у которых появилось определенное количество устойчивых серотипов, встречающихся в пищевой цепи. Резистентность к антибактериальным препаратам (АБП) у штаммов сальмонелл, способных вызывать заболевания или носительство у людей и животных, является нежелательным, но практически неизбежным следствием широкого использования их в животноводстве, птицеводстве и медицине. Интенсивное использование АБП усиливает селекцию резистентных штаммов сальмонелл, резервуаром, которых являются животные. Посредством «пищевой цепи» такие штаммы нередко передаются человеку. Резистентность сальмонелл

к препаратам, используемым для лечения, представляет большую проблему для здравоохранения.

Использование антибиотиков в сочетании с горизонтальной передачей генов, передающих резистентность, между бактериями привело к появлению множественной лекарственной устойчивости, которая представляет собой устойчивость к двум или более антибактериальным препаратам, значительно ограничивая терапевтические возможности для лечения заболеваний как людей, так и животных.

Огромное количество различных генов может отвечать за устойчивость к противомикробным препаратам. Идентификация таких генов важна для понимания эпидемиологии устойчивости, для проверки нечувствительных фенотипов и для идентификации устойчивых штаммов, когда гены слабо экспрессируются *in vitro*.

Цель диссертационного исследования: особенности фенотипической и генотипической резистентности штаммов *Salmonella enterica*, циркулирующих на территории северного региона Казахстана.

Объект исследования: бактериальные изоляты сальмонелл, выделенные из различных источников на территории Костанайской и Северо-Казахстанской областей.

Предмет исследования: антибиотикорезистентность и молекулярно-генетические механизмы устойчивости штаммов *Salmonella*.

Задачи исследования:

1) Выделить и идентифицировать бактериальные культуры *Salmonella spp.* из различных источников, изучить их биологические свойства.

2) Провести молекулярно - генетическое типирование штаммов сальмонелл.

3) Тестировать и определить спектр лекарственной резистентности выделенных штаммов *S. enterica* к антибактериальным препаратам различных фармакологических групп.

4) Определить генетический профиль антибиотикорезистентных штаммов бактерий.

5) Исследовать способность штаммов *S. enterica* к биопленкообразованию.

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), лаборатории химических и молекулярно-генетических методов исследований и анализа ИЦ ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии» (г.Алматы).

Выделение и идентификацию штаммов сальмонелл проводили согласно методическим указаниям «Лабораторная диагностика сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды». Серотипирование проводили в реакции агглютинации с диагностическими сальмонеллезными сыворотками.

Молекулярно-генетические методы. Типирование штаммов сальмонелл проводили по методу Сэнгера. 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».

Спектрофотометрические методы. Определение способности штаммов сальмонелл к 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. Серотипы сальмонелл, циркулирующие на территории Костанайской и Северо-Казахстанской областей.
2. Распространенность сальмонелл, устойчивых к антибактериальным препаратам, выделенных из различных источников.
3. Профиль фенотипической и генотипической резистентности штаммов *Salmonella* к антибактериальным препаратам различных фармакологических групп.

Научная новизна. Впервые на территории северного Казахстана проведены исследования по изучению антибиотикорезистентности штаммов сальмонелл, выделенных из различных источников, к широкому спектру антибактериальных препаратов. Полученные новые данные позволили оценить существующий уровень распространённости резистентных форм сальмонелл, выделяемых из различных источников к группам антибактериальных препаратов, включая критически важные для терапии человека.

Установлено, что более 90% штаммов сальмонелл, выделенные из различных источников, обладают устойчивостью по крайней мере к одной группе антибактериальных препаратов, используемых для лечения энтеробактериальных инфекций.

Выявлена высокая частота выделения штаммов *Salmonella*, устойчивых к тетрациклину, нитрофуранам, бета-лактамам и хинолонам.

Определена генотипическая резистентность штаммов сальмонелл - присутствие 20 генов, кодирующих устойчивость к антибактериальным препаратам 6 фармакологических групп. В образцах ДНК с био- и патматериала от животных и продуктов животного происхождения обнаружено присутствие интегронов классов 1 и 2 (*teg1* и *teg2*).

Теоретическая и практическая значимость

На основании проведённых исследований разработаны и предложены:

- Практическая рекомендация «Лабораторная диагностика и идентификация возбудителей стафилококкозов, сальмонеллезов и

эшерихиозов» для специалистов диагностических лабораторий, преподавателей, студентов, магистрантов и докторантов ветеринарных специальностей;

- Методическое пособие «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» для специалистов диагностических лабораторий, преподавателей, студентов, магистрантов и докторантов ветеринарных специальностей;

- Учебное пособие «Диагностика возбудителей энтеропатогенных зооантропонозных заболеваний» внедрено в образовательный процесс кафедры ветеринарной санитарии и применяется в качестве учебного материала при чтении лекций и проведении лабораторных и практических занятий.

Результаты НИР внедрены в производство, даны практические рекомендации по профилактике, мониторингу распространения антибиотикорезистентности.

Апробация работы. Основные положения, выносимые на защиту были доложены на международных научно-практических конференциях:

- в материалах международной научно-практической конференции «Байтурсыновские чтения – 2019» 26 апреля 2019 г. (Костанай);

- в материалах международной научно-практической конференции «Перспективы развития племенного животноводства», посвященной дню чествования 80-летнего юбилея доктора сельскохозяйственных наук, профессора Найманова Д. К., 9 октября 2020 год (Костанай).

Публикации. Результаты диссертационных исследований и основные положения отражены в 9 публикациях, в том числе 3 - в журналах входящих в международные базы данных Scopus и Web of Science (86%, 83% и 24% процентиля), 2 - в изданиях, рекомендованных КОКСНВО МНВО РК, 2 - в журналах, рецензируемых в системе Российского индекса научного цитирования. Получен 1 патент на полезную модель. Изданы: 1 - практическая рекомендация, 1 - учебное пособие, 1 – методическое пособие.

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».

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных данных определяется достаточным объемом проведённых исследований,

применением современных методов. Результаты НИР отражены в заключительном отчёте по проекту АР05131447 «Мониторинг антибиотикорезистентности возбудителей энтеропатогенных зооантропонозных заболеваний Северного региона Казахстана» (рег.№ 0118РК00397, инв.№ 0220РК00538).

Личный вклад

Автором проведены теоретические и практические исследования на всех этапах выполнения диссертационной работы. Проведён сбор и обобщение литературных данных. Проведены экспериментальные исследования. Автором проведено обобщение и анализ полученных данных, сформулированы выводы и практические рекомендации. Опубликованы статьи, получен патент на полезную модель, подготовлены соответствующие разделы учебно-методических работ.

Описание основных результатов исследования:

1. Результаты микробиологических исследований (2018-2020 гг) на территории Северного Казахстана показали, что из 2010 проб биоматериала от животных, птиц и продуктов животного происхождения выделено и идентифицировано 90 (4,5%) штаммов *Salmonella*. На территории Костанайской области из 1035 проб, выделено 74 штамма сальмонелл (7,1%), в Северо-Казахстанской области из 975 источников выделено 16 штаммов сальмонелл (1,6%). Присутствие сальмонелл преобладало в пробах от животных, в частности от крупного рогатого скота (37,7%). Исследования продуктов животного происхождения показали, что из 429 исследованных проб продукции выделено 35 штаммов сальмонелл, что составило 8,1% от общего количества пищевых изолятов. В продуктах и сырье животного происхождения преобладающее количество штаммов сальмонелл выделено на территории Костанайской области, так, из 223 исследованных проб выделено 30 штаммов сальмонелл, что составило 13,4%. В Северо-Казахстанской области сальмонеллы выделены в 5 (2,4%) из 206 проб продукции.

2. На территории Костанайской и Северо-Казахстанской областей циркулирует широкое разнообразие серотипов сальмонелл: *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Paratyphi C*, *S. Typhi*, *S. Abortus equi*, *S. Derby*, *S. Blegdam*, *S. Tshiongwe*, *S. Cholerae suis*, *S. Dublin*, *S. Tennessee*, *S. Moscow*, *S. Virchow*. Значительная часть 41,1%, выделенных штаммов сальмонелл принадлежит серотипу *S. Enteritidis* и 15,5% *S. Typhimurium*. Причем, серотип *S. Enteritidis* преобладал среди штаммов, выделенных из продукции животного происхождения и составил 68,6%, тогда как в биоматериале от животных и птицы данный серотип встречался в 23,6% случаев.

3. Проблема сальмонеллёзов осложняется прогрессирующим распространением резистентности к антибиотикам у штаммов *S. enterica*. Установлено, что 93,3% штаммов сальмонелл обладали устойчивостью по крайней мере к одной группе антибактериальных препаратов и только в 6,7% были чувствительными ко всем антибактериальным препаратам. Штаммы сальмонелл, обладающих резистентностью, были в основном устойчивы к антибиотикам группы тетрациклинов (64%). На втором по распространённости

месте находится группа нитрофуранов (61%), затем хинолонов (51%), фторхинолонов (46%) и бета-лактамов (41%). Меньше всего резистентных штаммов выявлено к группам аминогликозидов (24%), сульфаниламидов (19%) и амфениколов (11%).

4. Наибольший уровень полирезистентных штаммов обнаружен в изолятах продукции животноводства и составил 71,4%, тогда как изоляты выделенные от животных были полирезистентны в 63,6% случаях. Выявлено 8 случаев экстремально-резистентных штаммов сальмонелл, где чаще всего встречается серотип *S. Enteritidis* (n=3). Также выявлено два штамма (*S. Virchow* и *S. Tennessee*) резистентных ко всем восьми тестируемым группам антибактериальных препаратов.

5. В общей сложности было установлено 44 профиля антибиотикорезистентности с различным сочетанием резистентности к группам антибактериальных препаратов. Преобладающим профилем резистентности выделенных штаммов сальмонелл был профиль «тетрациклины + фторхинолоны + хинолоны + нитрофураны».

6. Изучение генотипической резистентности штаммов сальмонелл показало присутствие 20 генов, кодирующих устойчивость к антибактериальным препаратам шести фармакологических групп, как:

- бета-лактамы - гены *BlaTEM*, *BlaSHV*, *OXA1* и *ctxM*;
- аминогликозиды - гены *aacA4*, *aadA*, *aadB*, *aphA1*, *strA*, *strB*;
- тетрациклины - гены *tetA* и *tetB*;
- сульфаниламиды - гены *Sul1*, *Sul2*, *Sul3* и *dfr1*;
- амфениколы - гены *cmlA*, *catII*;
- хинолоны - гены *qnrA*, *qnrB*.

7. В образцах ДНК штаммов *S. Enteritidis*, *S. Paratyphi C*, *S. Virchow*, *S. Tennessee*, отличающихся множественной резистентностью обнаружено присутствие интегронов классов 1 и 2 (*teg1* и *teg2*).

8. Исследования способности штаммов сальмонелл к формированию биопленок показали, что исследуемые штаммы в большинстве случаев не обладали способностью к биопленкообразованию, что свидетельствует о приспособленности сальмонелл к циркуляции внутри организмов больше, чем в окружающей среде.

Практические предложения

1. Проведённые исследования и полученные результаты показали закономерность неуклонного роста резистентности штаммов *Salmonella* к большинству препаратов, применяющихся для терапии инфекционных заболеваний животных, в этой связи с целью назначения адекватной этиотропной терапии и с целью осуществления мониторинга чувствительности к различным антимикробным препаратам, у выделенных возбудителей необходимо в обязательном порядке определять чувствительность к антимикробным препаратам.

2. Для лечения сальмонеллёзной инфекции животных не следует использовать критически важные для медицины человека противомикробные препараты: фторхинолоны и цефалоспорины третьего и четвёртого поколений.

Объем и структура диссертационных исследований

Диссертационная работа изложена на 173 листах машинописного текста и включает разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты исследований, обобщение и оценка результатов исследований, список использованных источников, приложения. Работа содержит 24 рисунков, 20 таблиц, 20 приложений, 269 источников литературы.