

6D120200 – Ветеринариялық санитария мамандығы бойынша философия докторы (PhD) дәрежесін алу үшін ұсынылған Байменов Бахит Муратовичтің «Мультиплексті полимеразды тізбекті реакция (ПТР) әдісімен тамақ өнімдердегі *Staphylococcus aureus* және бактерияларға қарсы препараттарға төзімділіктің генетикалық маркерлерін анықтау» тақырыбы бойынша диссертациялық жұмысына берілген

АНДАТПА

1. Жұмыстың жалпы сипаттамасы. Диссертация тамақ өнімдерінде *S. aureus* (*nuc* гені бойынша) және антибиотикке төзімділік гендерін (*blaZ*, *ermC*, *tetK*) бір уақытта анықтау үшін мультиплексті ПТР-РВ әзірлеуге арналған. Әдіс 1680 сынамадан оқшауланған 87 *S. aureus* штаммында сыналды және жоғары тиімділікті көрсетті. Жұмыс нәтижелері тамақ өнімдерінің қауіпсіздігін бақылау және ветеринария мен тамақ өнеркәсібіндегі антибиотиктерге төзімділікті бақылау үшін практикалық маңызы бар.

2. Зерттеу тақырыбының өзектілігі. Жоғары патогенділікпен қатар, стафилококктар мутация немесе көлденең генді тасымалдау нәтижесінде барлық дерлік антибиотиктерге жоғары төзімділігімен танымал. Соңғы онжылдықтарда Қазақстанда, бүкіл әлем сияқты, жұқпалы аурулар қоздырғыштарының бактерияға қарсы препараттарға (БҚП) төзімділігінің тез таралуы байқалады. 2018-2022 жылдар аралығында Қазақстан Республикасының аумағында жүргізілген зерттеулердің нәтижелері бойынша Қазақстанда тамақ өнімдерінен оқшауланған 146 *S. aureus* изоляттарының 70,5% - ы кем дегенде бір антибиотикке төзімді болды, *blaZ* (87,1%), *mesA* (45,2%), *lnua* (40,7%) гендері жиі кездеседі, *ermC* және *tetK*. Қазақстанның солтүстігінде *S. aureus* және *Salmonella spp* жануарлардан оқшауланған, әсіресе антибиотиктерге тетрациклиндер, нитрофурандар, β-лактамдар және макролидтер топтары тұрақты изоляттарының жоғары пайызы байқалды..

Антибиотикке төзімділіктің таралуын қадағалау ветеринарияның стратегиялық міндеті болып табылады және ауыл шаруашылығы жануарлары арасында және тұтынушылық мақсаттағы мал шаруашылығы өнімдерінде қоздырғыштардың антибиотикке төзімділігін бақылауды қамтиды.

БҚП диагностикасының перспективалық бағыты молекулалық-генетикалық әдістерді — ПТР және секвенирлеуді қолдану болып табылады. ПТР артықшылығы-фенотиптік белгілерден тәуелсіздік және нәтижелердің жоғары жылдамдығы, бұл *S. aureus* төзімділігін тез және дәл диагностикалау және тиімді терапияны тағайындау үшін өте маңызды

Түйін сөздер: Staphylococcus aureus, антибиотикке төзімділік, мультиплексті ПТР-НУ, nuc/blaZ/ermC/tetK гендері, тамақ қауіпсіздігі.

3. Зерттеудің мақсаты мен міндеттері

Мақсаты: Нақты уақыттағы мультиплексті полимеразды тізбекті реакция (ПТР-НУ) арқылы *S. aureus* және оның генетикалық төзімділік маркерлерін (*blaZ*, *ermC* және *tetK*) жануарлардан алынатын тағамдардағы бактерияға қарсы препараттарға сәйкестендіру.

Міндеттер:

1. *S. aureus* штаммдарын жануарлардан алынатын тағамдардан оқшаулау, биологиялық қасиеттері мен антибиотикке төзімділігін зерттеу.

2. Мультиплексті ПТР-НУ үшін праймер және зонд тізбегін жобалау, синтездеу және тексеру.

3. ПТР-НУ жағдайларын оңтайландыру және оның аналитикалық сипаттамаларын – ерекшелігі мен сезімталдығын бағалау.

4. *S. aureus* изоляттары мен генетикалық төзімділік маркерлерін (blaZ, ermC және tetK) әзірленген праймер және зонд тізбектерін қолдану арқылы анықтау. Фенотиптік және генотиптік сәйкестендіру әдістерінің сәйкестігін бағалауды жүргізу.

4. Зерттеу нысаны мен бағыты

Зерттеу нысаны: жануарлардан алынатын өнімдерден оқшауланған антибиотиктерге төзімді *S. aureus* изоляттары.

Зерттеу бағыты: *S. aureus* антибиотикке төзімділік, нус түр маркері және молекулалық төзімділік механизмдері (blaZ, ermC, test), жануарлардан алынатын өнімдердің сапасы мен қауіпсіздігін бақылау үшін мультиплексті ПТР-НУ әзірлеу және қолдану.

5. Зерттеу әдістемесі (материалдар мен әдістер). Жұмыс 2020-2023 жылдар аралығында КЕАҚ "Ахмет Байтұрсынұлы атындағы ҚӨУ" Қолданбалы биотехнология Ғылыми-зерттеу институтының базасында молекулалық-генетикалық зерттеулер зертханасында және биологиялық шығу тегі клиникалық-диагностикалық, микробиологиялық зерттеулер және материалдардың қауіпсіздігі зертханасында жүргізілді. Стафилококк штамдарын оқшаулау және сәйкестендіру әдістемелік нұсқауларға сәйкес жүргізілді (ӨН 4.2.1890—04) және МемСТ 26809.1-2014, МемСТ 31746-2012, МемСТ 31467-2012, ҚР СТ МемСТ Р 51447-2010, МемСТ 30347-2016). Стафилококк штамдарын теру Сенгер әдісімен 16s рРНҚ генінің реттілігін қолдану арқылы жүзеге асырылды. Штамдардың бактерияға қарсы препараттарға сезімталдығы және өсудің тежелу аймақтарын түсіндіру EUCAST стандарттарына сәйкес агарда диско диффузия (DD) әдісімен жүргізілді.

Туралау және эволюциялық қашықтықты бағалау үшін "MEGA version 11", праймерлердің қасиеттерін талдау үшін – "IDT OligoAnalyzer құралы", нуклеотидтер тізбегін NCBI мәліметтер базасымен салыстыру үшін праймерлердің ерекшелігін бағалау және гомологиялық аймақтарды анықтау үшін – "NCBI BLAST", праймерлердің ерекшелігін жобалау және тексеру үшін - " NCBI Primer-BLAST" қолданылды.

Әдістің аналитикалық ерекшелігі мен сезімталдығын бағалау үшін бақылау үлгілері, соның ішінде ПТР верификациясы үшін арнайы әзірленген рекомбинантты оң бақылау пайдаланылды. Мультиплексті ПТР тиімділігіне (сезімталдықты, ерекшелікті, PPV/NPV және каппа коэффициентін анықтаумен) және дәстүрлі фенотиптік әдістерге (микробиологиялық зерттеулер және ДД-тест) салыстырмалы талдау 87 штамда жүргізілді.

6. Ғылыми жаңалық. *S. aureus* анықтау үшін мультиплексті ПТР-НУ БҚП төзімділік гендерін (blaZ, ermC және tetK) бір уақытта анықтау алғаш рет жасалды. Анықтау үшін *S. aureus* термостабильді нуклеаза (nuc) генінің бөлімі таңдалды. *S. aureus* сәйкестендіру үшін қолданудың тиімділігі ғылыми негізделген және эксперименталды түрде дәлелденген. ПТР-НУ негізіндегі реагенттер жиынтығының аналитикалық сезімталдығы ДНҚ/мкл 10 данадан, ерекшелігі – 100%, репродуктивтілігі – 100% құрады.

В-лактамыдар, тетрациклиндер, макролидтер және фторхинолондар тобының антибиотиктерге төзімділігінің айтарлықтай деңгейлері көрсетілді және *S. aureus* изоляттарында blaZ, ermC және tetK гендерінің пайда болу жиілігі анықталды. blaZ, ermC және tetK БҚП және ДД әдісіне төзімділік гендерін анықтау нәтижелерінде статистикалық маңызды вариациялар анықталды.

Жануарлардан алынатын өнімдердің қауіпсіздігін қамтамасыз ету үшін мал фермаларында айналымдағы *S. aureus* изоляттарының төзімділік профильдерін бақылау қажеттілігін растайтын жаңа деректер алынды.

7. Қорғауға шығарылатын негізгі ережелер

1. Қостанай облысының аумағында айналымда болатын бактерияға қарсы препараттарға төзімді жануарлардан алынатын өнімдерден оқшауланған *S. aureus* штамдарының таралуы;

2. *S. aureus* және жануарлардан алынатын тағамдардағы бактерияға қарсы препараттарға төзімділіктің генетикалық маркерлерін (blaZ, ermC және tetK) анықтау үшін мультиплексті ПТР әзірлеу;

3. *S. aureus* және әзірленген мультиплексті ПТР-НУ қолдана отырып, жануарлардан алынатын тағамдардағы бактерияға қарсы препараттарға төзімділіктің генетикалық маркерлерін (blaZ, ermC және tetK) анықтау.

8. Тәжірибелік маңыздылығы. Жүргізілген зерттеулер негізінде әзірленді және ұсынылды:

- *S. aureus* және бактерияға қарсы препараттарға төзімділіктің генетикалық маркерлерін (blaZ, ermC және tetK) анықтауға арналған мультиплексті ПТР-НУ негізіндегі жинақ.

- *S. aureus* анықтау және олардың БҚП локустарын мультиплексті ПТР-НУ әдісімен анықтау үшін жиынтықты пайдалану жөніндегі нормативтік-техникалық құжаттама";

- тәжірибелік ұсыныстар, оқу құралы, әдістемелік құрал, ұжымдық монография;

- пайдалы модельге патент;

- диссертациялық жұмыстың нәтижелері Ахмет Байтұрсынұлы атындағы ҚӨУ ауыл шаруашылығы ғылымдары факультетінде "Ауыл шаруашылығы жануарлары ауруларының микробиологиялық диагностикасы" және "Жануарлар ауруларын диагностикалаудың заманауи әдістері" пәндері бойынша сабақтар өткізу және Жәңгір хан атындағы Батыс Қазақстан техникалық университетінің зертханасында зерттеу жұмыстарын жүргізу кезінде пайдаланылады 11.11.2024 ж. енгізу актісі.

9. Қорытынды түріндегі зерттеулердің негізгі нәтижелері

1. Диссертациялық зерттеулер жүргізу кезеңінде Қостанай облысының бөлшек сауда нүктелерінде және түрлі шаруашылықтарында жануарлардан алынатын өнімдердің 1680 сынамасын іріктеу жүзеге асырылды. 87 *S. aureus* штаммы бөлінді. Анықтау *S. aureus* жануарлардан алынатын өнімдердің сынамаларында жануарлардың денсаулығы мен өндірілетін өнімнің сапасын түсінуде маңызды рөл атқаруы мүмкін.

2. Зерттеу нәтижелері *S. aureus* штамдарының әр түрлі БҚП топтарына төзімділігінің жоғары деңгейін көрсетеді. Штамдарының ең көп саны *S. aureus* β – лактамыды антибиотиктер тобына – 100% дейін, тетрациклиндер мен фторхинолондар тобына – 95,4% дейін, макролидтер тобына – 60,92% дейін сезімталдықты көрсетті. Сульфаниламидтер тобына ең аз төзімді штамдар анықталды – 21,84% және аминогликозидтер-27,59%. 87 *S. aureus* штаммының

ішінен: 3 (3,44%) екі БҚП тобына төзімді болды; 17 (19,54%) - үшке; 46 (52,87%) - төртке; 19 (21,83%) бірден бес топқа; 2 (2,29%) алты топқа. *S. aureus* қатысты белсенділігі жоғары БҚП гентамицин, канамицин және неомицин кірді, ал ампициллин, тетрациклин және ципрофлоксацин белсенділіктің төмендеуімен сипатталды.

3. *S. aureus* экспресс-сәйкестендіру және БҚП төзімділік гендерін (*blaZ*, *ermC* және *tetK*) бір уақытта анықтау үшін мультиплексті ПТР-НУ әзірленді. *S. aureus* және төзімділік гендерін (*blaZ*, *ermC* және *tetK*) анықтау үшін оны қолдану тиімділігі ғылыми негізделген және эксперименталды түрде дәлелденген. Жинақтың аналитикалық сезімталдығы ДНҚ/мкл – нің 10 данасынан, ерекшелігі – 100%, репродуктивтілігі-100% құрады.

4. 87 *S. aureus* штаммы анықталды және олардың генетикалық төзімділік маркерлері (*blaZ*, *ermC* және *tetK*) әзірленген ПТР-НУ көмегімен. 87 штаммның ішінен 2-де (2,3%) бірде-бір БҚП төзімділік гені табылған жоқ, 18 (20,69%) штаммдарда 1 ген, 39 (44,83%) екі ген, 28-де (35,18%) үш, 85-те (97,7%) кем дегенде біреуі зерттелген гендер.

5. ПТР тестінің өнімділігі мен сәйкестігін бағалау үшін фенотиптік және генотиптік сәйкестендіру әдістерінің сәйкестігі бағаланды. Талдау нәтижелері бойынша *blaZ* генінің ПТР сынағының диагностикалық сезімталдығы 80,43%, ерекшелігі 92,68%, PPV – 92,50%, NPV – 80,85% және Каппа мәні 0,73 болды, бұл изоляттарды сезімтал/төзімді деп жіктеудегі сәйкессіздіктерді көрсетеді. *TetK* гендік әдісімен ДД әдісімен салыстырғанда ПТР тестінің диагностикалық сезімталдығы 87,95%, ерекшелігі 100%, PPV – 100%, NPV – 28,57% және каппа мәні 0,40 болды, бұл изоляттарды сезімтал/төзімді деп жіктеудегі әдістер арасындағы айтарлықтай сәйкессіздікті көрсетеді. ПТР тестінің диагностикалық сезімталдығы *ermC* гендік әдісімен салыстырғанда 81,54%, ерекшелігі 36,36%, PPV – 79,1%, NPV – 40% және Каппа мәні 0,18 болды, бұл изоляттарды сезімтал/төзімді деп жіктеуде айтарлықтай сәйкессіздікті көрсетеді. *Nuc* термонуклеаза гені 100% жағдайда анықталды, диагностикалық сезімталдық 100%, ерекшелік 100%, PPV 100%, NPV 100% және Каппа коэффициенті 1 (әдістер арасындағы тамаша келісім).

6. Жануарлардан алынатын азық-түлік қауіпсіздігі мен сапанын бақылауды қамтамасыз ету мақсатында *S. aureus* және төзімділік гендерін анықтау дәлдігін жеделдетуге және жақсартуға арналған мультиплексті ПТР-НУ жинағының зертханалық үлгісі әзірленді.

10. Ғылыми-зерттеу жұмыстарымен және мемлекеттік бағдарламалармен байланысы. Жұмыс екі ғылыми-техникалық бағдарлама шеңберінде орындалды:

- BR24992785-ОТ-24 "Ғылыми-зерттеу технологиялық орталығын құра отырып, Қостанай облысының агроөнеркәсіптік кешенінің орнықты дамуын қамтамасыз ету бойынша кешенді зерттеулер ұйымдастыру және жүргізу". 2024-2027 жж;

- BR 10764944 "Тамақ өнімдерінің қауіпсіздігіне аналитикалық бақылау және мониторинг жүргізу әдістерін әзірлеу", "Сүт өнімдерінде *Staphylococcus aureus* және *Streptococcus agalactiae* анықтау үшін нақты уақыттағы мультиплексті ПТР әзірлеу және антибиотикке төзімділік локустарын анықтау" жобасы 2020-2023 ж.

11. Алынған нәтижелердің сенімділігі мен негізділігі

Алынған нәтижелердің дұрыстығы мен негізділігі аккредиттелген зертханада сертификатталған жабдықта орындалған жаңа молекулалық-генетикалық әдістерді

қолдану арқылы расталды. Диссертацияның қорытындылары жаңа және өз зерттеулерінің нәтижелеріне негізделген.

12. Негізгі нәтижелер бойынша жарияланымдар туралы мәліметтер. Диссертация тақырыбы бойынша 16 ғылыми және оқу-әдістемелік еңбектер жарық көрді, соның ішінде:

- 11 мақала, оның ішінде: Scopus базасындағы шетелдік ғылыми журналдарда 2 мақала Scopus (Veterinary World doi:10.14202/vetworld.2023.1815-1820; Ecology, Environment and Conservation https://www.envirobiotechjournals.com/issues/article_abstract.php?aid=11014&iid=322&jid=3) 80 және 15 процентиль; ҚР ҒЖБМ ЖБССҚМ басылымдарында - 7, оның ішінде 3 мақала-DOI берілген республикалық ғылыми басылымдарда (DOI: 10.52578/2305-9397-2022-1-1-3-12; DOI: 10.56339/2305-9397-2022-3-105-114; DOI: 10.52578/2305-9397-2023-2-2-144-153); 2 мақала - халықаралық конференция материалдары;

- пайдалы модельге 1 патент №7828 17.02.2023 ж.

- ұжымдық монографияның 1 бөлімі.

- 3 оқу-әдістемелік басылым.

13. Докторанттың салымының сипаттамасы. Автор зерттеудің барлық кезеңдеріне қатысты: әдеби көздерге шолу және талдау, сынамаларды алу, стафилококктардың бактерияға қарсы препараттарға төзімділігін анықтау, молекулалық-генетикалық зерттеулер кешені, зерттеу нәтижелерін талдау және түсіндіру, деректерді статистикалық өңдеу.

14. Диссертацияның көлемі мен құрылымы. Диссертациялық жұмыс 187 баспа парағында көрсетілген және бөлімдерді қамтиды: кіріспе, әдебиетке шолу, өзіндік зерттеулер, зерттеу нәтижелері, зерттеу нәтижелерін жалпылау және бағалау, пайдаланылған дереккөздер тізімі, Қосымшалар. Жұмыста 11 формула, 59 сурет, 29 кесте, 18 қосымша, 419 әдебиет көзі бар.