

АННОТАЦИЯ

диссертации на тему «Разработка метода молекулярной индикации загрязненности *Escherichia coli* и моделирование оценки пищевой безопасности производимых в Казахстане сыров» на соискание ученой степени доктора философии PhD по образовательной программе «8D09102 – Санитарно-экологическая безопасность продуктов животноводства»
Кузеубаева Анар Сабырбаевна

Актуальность. Сфера пищевой безопасности, которая руководствуется One Health концепцией, обеспечивает устойчивое существование человечества на глобальном уровне посредством мониторинга и организации комплексных исследований ветеринарно-санитарного качества продуктов питания, реализуемых на рынке. Обеспечение достаточного объема производства продуктов и пищевой безопасности являются основными стратегическими направлениями аграрной политики Республики Казахстан. Производство сыра входит в список приоритетных секторов молочной промышленности страны.

Несмотря на то, что сыры считаются микробиологически безопасными продуктами, в различных регионах мира часто регистрируются пищевые инфекции из-за контаминации этих молочных продуктов патогенными бактериями.

Заболевания пищевого происхождения являются одной из важнейших проблем общественного здравоохранения. Штаммы *E.coli*, обнаруженные в молочных продуктах, являются не только источником инфекций, но и резервуаром генетических детерминантов устойчивости к антибактериальным препаратам. Антибиотико-резистентные штаммы *E.coli*, контаминирующие пищевые продукты, могут передавать факторы резистентности и вирулентности другим микроорганизмам и проникать в микробиоту кишечника человека и животных. Загрязнение молочных продуктов патогенными микроорганизмами вызывает особо опасные для здоровья людей пищевые токсикоинфекции.

Изучение риска контаминации сыров *E. coli* в Казахстане ранее не проводилось вовсе, поэтому с ветеринарно-санитарной точки зрения исследование эпидемиологических характеристик контаминации этих продуктов *E. coli*, определение патогенных штаммов и устойчивости к антибиотикам этого вида являются актуальной научно-практической проблемой современного общественного здравоохранения и ветеринарии. В диссертационной работе значимость этой проблемы доказана на основе анализа разнопланового международного, отечественного научного и статистического материала, а также обоснована актуальность темы исследований.

Согласно современного развития пищевой безопасности, молекулярно-генетические исследования считаются важными научными инструментами

для идентификации бактерий, определения путей распространения, резистентности и взаимных филогенетических связей патогенов, а математическое моделирование – для оценки пищевой безопасности продуктов питания.

Цель исследования. Оценка контаминации *E. coli* и моделирование пищевой безопасности сыров, производимых в Казахстане, и усовершенствование молекулярной индикации бактерии.

Задачи исследований

1. Провести маркетинговое исследование современного рынка отечественных сыров.
2. Определить микробиоты бактерий группы кишечной палочки (БГКП), контаминирующей сыры.
3. Оценить качество реализуемых сыров по контаминации *E. coli*
4. Изучить молекулярно-генетическую характеристику изолятов *E. coli*, выделенных из сыров.
5. Модифицировать методологию молекулярной индикации патогенных штаммов *E.coli*.
6. Определить фенотипический и генотипический профиль антибиотикорезистентных штаммов *E. coli*, выделенных из сыров.
7. Разработать модель оценки пищевой безопасности сыров при контаминации *E.coli*.

Методы исследования.

Научно-исследовательская работа проводилась на кафедре «Ветеринарная санитария» и в Казахско-Китайской лаборатории биобезопасности Казахского агротехнического исследовательского университета имени С.Сейфуллина, лаборатории «Пищевая безопасность и молекулярная диагностика» Стамбульского университета Serrahpaşa, Национального центра биотехнологии и Научно-исследовательском институте прикладной биотехнологии Костанайского регионального университета имени А. Байтурсынова.

В качестве объектов исследований использовали 207 образцов сыра, произведенного на 22 крупных и 8 малых предприятиях центрального, восточного, южного и северного регионов Казахстана, данные официальной статистики, 94 изолята колиформных бактерий и 65 изолята *E.coli*, выделенные из образцов сыра.

В ходе выполнения диссертационной работы применяли конвенционные микробиологические, масс-спектрометрические, молекулярно-генетические методы, такие стандартные методы определения резистентности к антибиотикам, как диско-диффузионное тестирование и генотипирование, методы биоинформатики, методологию сингулярного векторного разложения, математическое моделирование и статистические программы.

Основные положения выносимые на защиту.

- Текущая ситуация на рынке сыров Казахстана.
- Колиформная микробиота, контаминирующая отечественный сыр.

- Оценка пищевой безопасности реализуемых сыров по контаминации *E.coli*.
- Молекулярно-генетическая характеристика изолированных изолятов *E.coli* с помощью целевых генов *16S rRNA* и *dnaJ*.
- Выявление патогенных штаммов *E.coli* методом усовершенствованной мультиплексной ПЦР.
- Фенотипический и генотипический профиль антибиотико-резистентных штаммов *E. coli*, выделенных из сыров.
- Модель оценки пищевой безопасности сыров при контаминации *E.coli*.

Описание основных результатов исследования.

Маркетинговый анализ показал, что в 2023 году в Казахстане произведено 43.2 тыс. т сыра, что на 10.5% больше, чем в 2022 году, и на 16.8% в первом полугодии 2024 года. 48.1% представленных на рынке сыров составила отечественная продукция, в том числе 68.4% полутвердых, 18.4% мягких и 13.2% твердых сортов.

Согласно микробиологическим исследованиям, общая контаминация отечественного сыра четырьмя видами колиформных бактерий составила 45.4% [95%CI 39.40, 54.86], в том числе сыров твердого типа 19.5% [95%CI 18.42, 30.27], полутвердого типа 47.0% [95%CI 40.37, 71.51] и мягкого типа составила 59.3% [95%CI 45.25, 64.51]. Самый высокий уровень загрязнения (72.2%) обнаружен в сырах, произведенных на севере. Удельное распределение *E.coli* в продукте составила 69.1%, *Enterobacter cloacae* – 10.6%, *Citrobacter freundii* – 11.7% и *Citrobacter braakii* – 8.5%. Уровень контаминации колиформами по КОЕ составила 60±17.78.

E.coli выявлена в 31.4% [95%CI 30.45, 38.88] от общего объема исследованного сыра. Согласно международному нормативу 92.3% контаминированных сыров были оценены как приемлемые и удовлетворительные (КОЕ <20 или 20<100, соответственно), а 7.7% как неудовлетворительные и непригодные (>100 или ≥104). Последние две категории относились к 4/5 сыров мягкого типа. Удельная величина контаминации *E.coli* сыров предприятий северного региона достигала 1/2 и была выше, чем в других регионах. *E.coli* обнаружена в 100% мягких сыров, реализуемых методом нарезки. Уровень загрязненности продукции малых предприятий составил 65% и был более чем в два раза выше, чем в сырах крупных производителей.

Молекулярно-филогенетический анализ изолятов *E.coli* показал 99-100% сходство с референтными штаммами *E.coli* NBRC 102203 AB681728 и *E.coli* NC_000913.3:14168-15298 соответственно по нуклеотидным последовательностям целевых генов *16S rRNA* и *dnaJ*. Кроме того, по гену *dnaJ* установлена 100% идентичность одного изолята энтеропатогенному штамму *E. coli* O157:H7 NC_002695.2:14185-15315.

В процессе исследования был усовершенствован и апробирован метод мультиплексной ПЦР для идентификации патотипов энтеропатогенной кишечной палочки (ЕРЕС). Впервые в Центральной Азии в отечественном

сыре обнаружен патогенный штамм *E.coli* O157:H7, уровень контаминации продукта этим штаммом составил 0,5%.

По результатам тестирования, проведенного согласно стандартам Евразийского таможенного союза и EUCAST 11.0, выделенные изоляты *E.coli* показали устойчивость к 65% из 20 антибиотиков. К β -лактамам были устойчивы 44.6%, к тетрациклам и нитрофуранам – 29.2%, к амфениколам – 20%, к фторхинолонам – 13.9%, к сульфаниламидам – 12.3% и к хинолонам – 3.1% изолятов. У 30.8% популяции *E. coli* выявлены гены, кодирующие устойчивость к сульфаниламидам, у 15.4% – к β -лактамам и у 9.3% – к хинолонам. Полирезистентный профиль к антибиотикам показали 24.6% изолятов.

В диссертации использовали модель сингулярного разложения, которая показала, что собственные значения принципиальных компонентов в динамике колиформной контаминации сыров *E.coli* образует отдельный от других видов кластер. Он содержал самую обширную информацию об изменении матриц анализируемых датасетов по видам продукции, размерам предприятий и способам упаковки. Координаты собственных векторов *E. coli* были направлены на сыры мягкого типа, производимых в малых предприятиях и реализуемых в нарезанном виде, и этот продукт является основным фактором, который необходимо учитывать при обеспечении пищевой безопасности сыров.

Обоснование новизны и важности полученных результатов.

Впервые с позиции пищевой безопасности изучены эпидемиологические особенности контаминации БГКП, в том числе *E. coli*, сыров отечественного производства, представленных на рынке Казахстана. Установлены особенности контаминации сортов сыра колиформными видами (*E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* и *S. braakii*). Пищевую безопасность образцов сыра оценивали по КОЕ/г *E.coli*. В результате молекулярного анализа с помощью генов-мишеней *16S rRNA* и *dnaJ* изоляты показали 99-100% идентичность с двумя референтными штаммами *E.coli*, а один изолят – 100% соответствие с энтеропатогенным штаммом *E.coli* O157:H7 по гену *dnaJ*. В ходе исследования был усовершенствован метод мультиплексной ПЦР для выявления патотипов *E.coli*. С использованием этого метода впервые в Центральной Азии и Казахстане в 0.5% образцов отечественного сыра был обнаружен патогенный штамм *E.coli* O157:H7 в мягком сыре мелкого предприятия. При исследовании на резистентность к антибиотикам большая часть выделенных штаммов *E.coli* проявила генотипическую устойчивость к сульфаниламидам, β -лактамам и хинолонам. С использованием метода принципиального компонента спектрального анализа создана математическая модель динамики контаминации сыров *E.coli*. Он показал, что по значениям матриц датасетов наиболее объемная информация об изменении координат собственных векторов имеется в сырах мягкого типа, производимых на мелких предприятиях и реализуемых в нарезанном виде.

По результатам научно-исследовательской работы получено авторское свидетельство на тему «Модификация метода молекулярной индикации патогенных штаммов *Escherichia coli*, контаминирующих пищевые продукты».

Положения диссертационной работы внедрены в учебный процесс дисциплины «Охрана здоровья живых при эмерджентных инфекциях» ОП «Ветеринарная безопасность» специалитета КАТИУ имени С. Сейфуллина.

Соответствие направлениям развития науки или государственным программам.

Исследования выполнены в рамках научно-технической программы Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан на 2021-2023 годы целевого финансирования BR10764944 «Разработка методов аналитического контроля и проведения мониторинга безопасности пищевой продукции».

Описание вклада докторанта в подготовку каждой публикации.

Анализ литературных данных, проведение практических исследований, анализ результатов исследований, написание всех научных статей подготовка рукописи диссертации проводились при личном участии автора.

Основные результаты диссертации опубликованы в 10 научных работах, в том числе две статьи в журналах, входящих в базу данных Web of Science и Scopus; три статьи в изданиях, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Министерства науки и высшего образования; пять статей в материалах международной конференции.

Результаты диссертационной работы были обсуждены в годовых отчетах Ученого совета КАТИУ имени С. Сейфуллина (Астана, 2020-2023) и на ряде международных научных конференций: «Достижения современной ветеринарной науки в XXI век: инновации, проблемы и пути их решения» республиканская научно-практическая конференция (Семей, 2021); Международная научно-практическая конференция, посвященная 70-летию Семейского зоотехнического и ветеринарного института «Состояние и перспективы индустриально-инновационного развития АПК Республики Казахстан» (Семей, 2022); Международная научно-практическая конференция «Сейфуллинские чтения-18: Молодежь и наука – взгляд на будущее» (Астана, 2022); «Сейфуллинские чтения – 18(2): Международная научно-практическая конференция «Наука XXI века – эпоха трансформации» (Астана, 2022); "М.А. Сейфуллинские чтения-19: международная научно-практическая конференция», посвященная 110-летию Гендельмана (Астана, 2023).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 122 страницах компьютерного текста, включает нормативные ссылки, определения, обозначения и сокращения, введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение, заключение, практические рекомендации, список использованной литературы, включающего 280 источников и четыре приложения. Диссертация иллюстрирована 21 таблицей, 26 рисунками.