

«8D09102 – Мал шаруашылығы өнімдерінің санитарлық-экологиялық қауіпсіздігі» білім беру бағдарламасы бойынша PhD-философия докторы дәрежесін алуға ұсынылған Кузеубаева Анар Сабырбаевнаның «Қазақстанда өндірілетін ірімшектердің *Escherichia coli*-мен ластануының молекулалық индикациялау әдісін әзірлеу және тағамдық қауіпсіздігінің бағалауын модельдеу» тақырыбындағы диссертациялық жұмысына

АҢДАТПА

Зерттеу тақырыбының өзектілігі. Қазіргі One Health концепциясына негізделген тағам қауіпсіздігі саласы нарықтағы азық-түлік өнімдерінің ветеринариялық-санитариялық сапасына мониторинг және жан-жақты зерттеулерді ұйымдастырып, адамзаттың ғаламдық деңгейдегі тұрақты тіршілігін қамтамасыздандырады. Азық-түлік өндірісінің жеткілікті көлемі мен тағамдық қауіпсіздігін қамтамасыз ету Қазақстан Республикасының аграрлық саясатының негізгі стратегиялық бағыттары болып табылады. Ірімшік өндірісі еліміздің сүт өңдеу өнеркәсібінің басым секторларының тізіміне енгізілген.

Ірімшіктер микробиологиялық қауіпсіз тағам болып саналса да, әлемнің әртүрлі аймақтарында осы сүт өнімдерін патогендік бактериялармен ластануына байланысты тағамдық инфекциялар жиі тіркеледі.

Тағамдық аурулар – қоғамдық денсаулық сақтау ұйымдарын алаңдататын маңызды проблемалардың бірі. Сүт өнімдерінде кездесетін *E.coli* штамдары тек инфекция көзі ретінде ғана емес, сонымен қатар, антибиотиктерге қарсы генетикалық детерминанттардың резервуары ролін атқарады. Азық-түлік өнімдерін контаминациялайтын антибиотикке төзімді *E.coli* штамдары резистенттігін және вирулентті факторларын басқа микроорганизмдерге бере алады және адам мен жануарлардың ішек микробиотасы құрамына енеді.

Сүт өнімдерінің патогенді микроорганизмдермен ластануы адамдардың денсаулығы үшін аса қауіпті тағамдық токсикоинфекциялар тудырады.

Ірімшіктердің ішек таяқшасымен ластану қаупі Қазақстан жағдайында осы уақытқа дейін мүлдем тексерілмеген, сондықтан ветеринариялық-санитариялық тұрғыдан осы өнімдердің *E.coli* түрімен контаминациялануының эпидемиологиялық сипаттарын зерттеу, бактерияның патогенді штамдарын және антибиотиктерге төзімділігін анықтау қазіргі қоғамдық денсаулық сақтаудың және ветеринарияның өзекті ғылыми-тәжірибелік проблемасына жатады. Диссертацияда осы жағдайдың маңыздылығы әлемдік және отандық әртүрлі ғылыми және статистикалық мәліметтерді кеңінен талдау арқылы дәлелденіп, зерттеу тақырыбының өзектілігі нақты негізделген.

Тағамдық қауіпсіздіктің заманауи талаптарына сәйкес молекулалық-генетикалық зерттеулер бактерияларды идентификациялаудың, патогендердің таралу жолдарын, резистенттігін және өзара филогениялық байланыстарын

анықтаудың, ал математикалық модельдеу – тағамдық қауіпін бағалаудың маңызды құралдарына жатады.

Зерттеу мақсаты. Қазақстанда өндірілген ірімшіктердің *E.coli* түрімен ластануын бағалау арқылы тағамдық қауіпсіздігін модельдеу және бактерияның молекулалық индикациялануын жетілдіру.

Зерттеу міндеттері

1. Отандық ірімшік нарығының қазіргі маркетингтік жағдайын зерттеу.
2. Ірімшіктерді ластайтын колиформалар микробиотасын анықтау.
3. Нарықтағы ірімшіктер сапасын *E.coli*-мен контаминациялануы бойынша бағалау.
4. Ірімшіктерден бөлінген *E.coli* изоляттарын молекулалық-генетикалық сипаттау.
5. Патогенді *E.coli* штамдарын диагностикалаудың молекулалық әдістемесін жетілдіру.
6. Ірімшікті ластайтын *E. coli* изоляттарының антибиотиктерге қарсы резистенттіліктің фенотиптік және генотиптік профилдерін анықтау.
7. Ірімшіктердің *E. coli* түрімен ластану қауіпсіздігін бағалау моделін әзірлеу.

Зерттеу әдістері

Ғылыми-зерттеу жұмысы С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университетінің «Ветеринариялық санитария» кафедрасы мен Қазақ-Қытай биоқауіпсіздік зертханасында, Ыстанбул Сerrahpaşa университетінің «Тағам қауіпсіздігі және молекулалық диагностика» зертханасы, Қазақстан Ұлттық биотехнология орталығы және А.Байтұрсынұлы атындағы Қостанай өңірлік университетінің Қолданбалы биотехнологиялық ғылыми-зерттеу институтында жүргізілді.

Зерттеу объектілері ретінде Қазақстанның орталық, шығыс, оңтүстік және солтүстік аймақтарының 22 ірі және 8 шағын кәсіпорындарында өндірілген 207 ірімшік үлгілері, ресми статистикалық мәліметтер, өнімнен бөлініп алынған 94 колиформды бактериялар мен 65 *E.coli* изоляттары қолданылды.

Жұмыс барысында конвенциялық микробиологиялық, масс-спектрометриялық, молекулалық-генетикалық, биоинформатика әдістері, антибиотиктерге резистенттілікті анықтаудың дискілі-диффузды тестілеу және генотиптеу сияқты стандартты тәсілдері, сингулярлы векторлық жіктеу әдістемесі, математикалық модельдеу және статистикалық бағдарламалар пайдаланылды.

Қорғауға шығарылатын негізгі қағидалар.

- Қазақстандағы ірімшік нарығының қазіргі жағдайы.
- Отандық ірімшіктерді ластайтын колиформалар микробиотасы.
- Нарықтағы ірімшіктердің тағамдық қауіпсіздігінің *E.coli* түрімен ластануы бойынша бағалануы.
- *E.coli* изоляттарының нысаналы *16S rRNA* және *dnaJ* гендері бойынша молекулалық-генетикалық сипаттамасы.

- Патогенді *E.coli* штамдарын жетілдірілген мультиплексті ПТР әдісімен индикациялау.

- *E.coli* изоляттарының микроорганизмдерге қарсы препараттарға резистенттігінің фенотиптік және генотиптік профилдері.

- Ірімшіктердің *E. coli* түрімен ластану қауіпсіздігін бағалау моделі.

Негізгі зерттеу нәтижелерінің сипаттамасы.

Маркетинг талдау Қазақстанда 2023 жылы 43.2 мың т ірімшік өндіріліп, 2022 жылмен салыстырғанда 10.5%, 2024 жылдың бірінші жартысында 16.8% өскенін көрсетті. Нарықтағы ірімшіктің 48.1% отандық өнімдер болды, оның ішінде 68.4% жартылай қатты, 18.4% жұмсақ және 13.2% қатты типтеріне жатты.

Микробиологиялық зерттеулер бойынша отандық ірімшіктің колиформа бактерияларының төрт түрімен жалпы ластануы 45.4% [95%CI 39.40, 54.86], оның ішінде қатты типті өнімдердікі 19.5% [95%CI 18.42, 30.27], жартылай қатты типтікі 47.0% [95%CI 40.37, 71.51] және жұмсақ типтікі 59.3% [95%CI 45.25, 64.51] болды. Контаминацияның ең жоғары деңгейі (72.2%) солтүстікте өндірілген ірімшіктерде анықталды. Өнімдердегі *E.coli* таралуының үлесі 69.1%, *Enterobacter cloacae* – 10.6%, *Citrobacter freundii* – 11.7% және *Citrobacter braakii* – 8.5% құрады. Колиформалармен контаминациялану деңгейі КТБ бойынша 60 ± 17.78 болды.

Жалпы ірімшік өнімдерінің 31.4% *E.coli* анықталды [95%CI 30.45, 38.88]. Халықаралық нормативке сәйкес ластанған ірімшіктің 92.3% жарамды және қанағаттанарлық (КТБ, сәйкесінше, < 20 немесе $20 < 100$), ал 7.7% қанағаттандырылмайтын және жарамсыз (>100 немесе ≥ 104) деп сарапталды. Соңғы екі санаттағы ірімшіктің 4/5 бөлігі жұмсақ типке жатты. Солтүстік кәсіпорындары өнімдерінің *E.coli* ластану үлесі 1/2 жетті және басқа аймақтардан жоғары болды. Ішек таяқшасы кесіліп сатылатын жұмсақ ірімшіктердің 100% анықталды. Шағын кәсіпорын өнімдерінің ластану деңгейі 65% құрады және ірі өндірушілердікінен екі есе астам болды.

Молекулалық филогенетикалық талдау *E.coli* изоляттарының нысаналы *16S rRNA* және *dnaJ* гендердің нуклеотидтер тізбегі бойынша, сәйкесінше, *E.coli* NBRC 102203 AB681728 және *E.coli* NC_000913.3:14168-15298 референттік штамдарына 99-100% ұқсастығын көрсетті. Сонымен қатар, бір изоляттың *dnaJ* гені бойынша *E. coli* O157:H7 NC_002695.2:14185-15315 энтеропатогенді штамына 100% сәйкестігі анықталды.

Зерттеу барысында энтеропатогенді ішек таяқшасы (EPEC) патотиптерін анықтайтын мультиплексті ПТР әдістемесі жетілдірілді және сынақтан өткізілді. Орталық Азияда алғашқы рет отандық ірімшіктен *E. coli* O157:H7 патогенді штамы табылды, өнімнің осы штаммен ластану деңгейі 0.5% құрады.

Еуразиялық Кеден Одағы және EUCAST 11.0 стандарттары бойынша жүргізілген сынақтарға сәйкес бөлінген *E. coli* изоляттары 20 антибиотиктердің 65% резистенттік танытты. Изоляттардың 44.6% β -лактамадарға, 29.2% тетрациклиндерге және нитрофурандарға, 20%

амфениколдар, 13.9% фторхинолондарға, 12.3% сульфаниламидтерге және 3.1% хинолондарға резистентті болды. *E. coli* популяциясының 30.8% үлесінде сульфаниламидтерге, 15.4% – β -лактамыдар және 9.3% – хинолондарға резистенттікті кодтайтын гендер анықталды. Изоляттардың 24.6% антибиотиктерге мультирезистентті профиль көрсетті.

Диссертацияда қолданылған сингуляр векторларды жіктеу моделі ірімшіктердің колиформалармен ластану динамикасында *E. coli* принципіалды компоненттерінің меншікті мәндері басқа түрлерден бөлек кластер құрайтынын көрсетті. Ол талданған өнім типтері, кәсіпорын мөлшері және қаптау тәсілі датасеттерінің матрицаларында өзгерістер туралы ең көлемді ақпаратты қамтыды. *E. coli* меншікті векторларының координаталары шағын кәсіпорындарында өндірілетін және нарықта кесіп қапталатын жұмсақ типті ірімшіктерге бағытталып, осы өнімдердің тағам қауіпсіздігінде ескерілетін негізгі фактор екендігін дәлелдеді.

Жұмыстың ғылыми жаңалығы мен алынған нәтижелердің маңыздылығын негіздеу.

Қазақстан нарығындағы елімізде өндірілген ірімшіктердің ішек таяқша бактериялар тобы (ІТБТ) түрлері, оның ішінде *Escherichia coli*-мен ластануының эпидемиологиялық сипаттары тағам қауіпсіздігі көзқарасынан алғашқы рет зерттелінді. Ірімшік типтерінің колиформ түрлерімен (*E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* және *S. braakii*) ластану ерекшеліктері анықталды. Ірімшік үлгілерінің тағамдық қауіпсіздігі *E. coli* КТБ/г бойынша бағаланды. Нысаналы *16S rRNA* және *dnaJ* гендер арқылы молекулалық талдау нәтижесінде изоляттар *E. coli* түрінің екі референттік штамына 99-100% ұқсастық танытты, ал бір изолят *dnaJ* гені бойынша *E. coli* O157:H7 энтеропатогенді штамына 100% сәйкестік көрсетті. Зерттеу барысында *E. coli* патотиптерін анықтайтын мультиплексті ПТР жетілдіріліп, сынақтан өткізілді. Осы әдістемені қолданып Орталық Азия мен Қазақстанда алғашқы рет 0.5% отандық ірімшік үлгілерінен *E. coli* O157:H7 патогенді штамы шағын кәсіпорында өндірілетін жұмсақ ірімшіктен табылды. Антибиотиктерге резистенттігін зерттеу нәтижесінде *E. coli* штамдарының ең көп үлесі сульфаниламидтерге, β -лактамыдар мен хинолондарға генотиптік тұрақтылық танытты. Спектралды талдаудың принципіалды компоненттер әдістемесі арқылы ірімшіктердің *E. coli* түрімен ластану динамикасының математикалық моделі жасалынды. Ол датасеттер матрицаларының мәндеріне сәйкес меншікті вектор координаталарында өзгерістер туралы ең көлемді ақпарат шағын кәсіпорындарында өндірілетін, нарықта кесіп қапталатын жұмсақ типті ірімшіктерде орын алатынын көрсетті.

Ғылыми-зерттеу жұмыстың нәтижелері бойынша «Тағам өнімдерін ластайтын патогенді *Escherichia coli* штамдарын молекулалық индикациялау әдісінің модификациясы» тақырыбындағы авторлық куәлік алынды.

Диссертация қағидалары С.Сейфуллин атындағы ҚАТЗУ-нің специалитет бойынша «Ветеринариялық қауіпсіздік» БББ оқытылатын «Охрана здоровья животных при эмерджентных инфекциях» пәнінің оқыту үрдісіне ендірілді.

Ғылымның даму бағыттарына немесе мемлекеттік бағдарламаларға сәйкестігі.

Зерттеулер Қазақстан Республикасы Ауыл шаруашылығы министрлігінің 2021-2023 жылдарға бағдарламалық-нысаналы қаржыландыру BR10764944 «Тамақ өнімдерінің қауіпсіздігіне талдамалық бақылау және мониторинг жүргізу әдістерін әзірлеу» ғылыми-техникалық бағдарлама шеңберінде орындалды.

Докторанттың әрбір басылымды әзірлеуге қосқан жеке үлесі. Диссертация тақырыбы аясында әдеби деректерге талдау, тәжірибелік зерттеулерді жүргізу, зерттеу нәтижелерін талдау, барлық ғылыми мақалалар мен диссертацияны жазу және қол жазбаны рәсімдеу автордың жеке қатысуымен орындалды.

Диссертацияның негізгі нәтижелері 10 ғылыми еңбекте, оның ішінде екі мақала Web of Science және Scopus дерекқор қорына енетін журналдарда; үш мақала Ғылым және жоғары білім Министрлігінің Ғылым және жоғары білім саласында сапаны қамтамасыз ету Комитеті ұсынған басылымдарда; бес мақала халықаралық конференция материалдарында жарияланды.

Диссертациялық жұмыстың нәтижелері С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық зерттеу университетінің Ғылыми кеңесінің жылдық есептерінде (Астана, 2020-2023) және бірнеше халықаралық ғылыми конференцияларда баяндалды және талқыланды: «XXI ғасырдағы қазіргі заманғы ветеринария ғылымының жетістіктері: инновациялар, проблемалар және оларды шешу жолдары» республикалық ғылыми-практикалық конференция (Семей, 2021); «Қазақстан Республикасының агроөнеркәсіп кешенінің индустриалды инновациялық дамуының жағдайы мен келешегі» Семей зоотехникалық – малдәрігерлік институтының 70 жылдығына арналған халықаралық ғылыми-практикалық конференция (Семей, 2022); «Сейфуллин оқулары – 18: Жастар және ғылым – болашаққа көзқарас» халықаралық ғылыми-практикалық конференция (Астана, 2022); «Сейфуллин оқулары – 18(2): «XXI ғасырдың ғылымы – трансформация дәуірі» халықаралық ғылыми-практикалық конференция (Астана, 2022); «М.А. Гендельманның 110 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары-19: халықаралық ғылыми-практикалық конференция (Астана, 2023).

Диссертациялық жұмыстың құрылымы мен көлемі. Диссертациялық жұмыс 122 компьютерлік мәтіннің беттерінде жазылды. Оның құрамына нормативтік сілтемелер, анықтамалар, белгілеулер мен қысқартулар, кіріспе, әдебиеттерге шолу, зерттеу материалдары мен әдістері, зерттеу нәтижелері және оларды талқылау, қорытынды, тәжірибелік ұсыныстар, 280 еңбектер кіретін қолданылған әдебиеттер тізімі кіреді. Диссертация құрамына 26 сурет, 21 кесте, төрт қосымша кіреді.