

«Сейфуллин окулары – 18(2): «XXI ғасыр ғылыми - трансформация дәуірі» халықаралық ғылыми - практикалық конференция материалдары = Материалы международной научно-практической конференции «Сейфуллинские чтения - 18(2): «Наука XXI века - эпоха трансформации». - 2022.- Т.І, Ч.ІІ.- С. 202-204.

ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА РЕЗИСТЕНТНОСТИ ИЗОЛЯТОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ СЫРА, К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

*Кузеубаева А.С., докторант 3 курса
Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина, г. Астана*

Среди термотолерантных колиформ (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* и *Escherichia*), *Escherichia coli* является единственным микроорганизмом, который указывает на фекальное загрязнение при наличии в молоке или молочных продуктах [1]. *E.coli* относится к основным зоонозным патогенам пищевого происхождения. Возникновение и распространение устойчивых форм патогенных бактерий является глобальной проблемой ветеринарии и общественного здравоохранения [2]. Штаммы этого вида могут быть комменсальными или патогенными для потребителя, кроме того, их присутствие в продуктах питания может указывать на наличие других энтеропатогенов [3,4].

Штаммы кишечной палочки, содержащие генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным средствам, представляют собой важный риск для здоровья, действуя как резервуары генов вирулентности [5]. В последние 20 лет они способствовали возникновению эмерджентных пищевых патогенов, т.е. внезапно появляющихся заболеваний и их новых возбудителей [6,7].

Актуальность и серьезность этой проблемы в полной мере осознана международным научным сообществом. В частности, Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) разработала и опубликовала в 2001 году «Глобальную стратегию ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам», в которой рекомендовано рассматривать указанную проблему в качестве одного из приоритетов национальных систем здравоохранения. Предотвращение формирования и распространения антимикробной резистентности признано ВОЗ, странами Европейского Союза и Северной Америки в качестве глобальной проблемы, а также в качестве национального приоритета [8].

Неконтролируемое применение ветеринарных лекарственных средств с противомикробным действием способствует появлению резистентных штаммов и распространению генов антибиотикостойчивости, которые могут передаваться патогенам. Трансфер антибиотикорезистентных микроорганизмов обычно происходит при употреблении пищевых продуктов, равным образом может осуществляться при непосредственном контакте с животными. Формирование новых возбудителей в объектах

окружающей среды путем трансмиссивной антибиотикорезистентности у населяющих их микроорганизмов является угрозой для здоровья населения [9]. Следует отметить, что в Казахстане и странах Центральной Азии изучение молочных продуктов на наличие резистентных к антибактериальным препаратам штаммов кишечной палочки до настоящего времени не проводилось.

В связи с изложенным, целью настоящего исследования явилась генотипическая оценка резистентности изолятов *Escherichia coli* из сыров, произведенных предприятиями Костанайской, Восточно-Казахстанской и Акмолинской областей.

Материалы и методы. Исследование проводили на базе Научно-исследовательского института прикладной биотехнологии Костанайского регионального университета им. А.Байтурсынова, в лабораториях микробиологии и молекулярно-генетических исследований КАТУ им. С.Сейфуллина. В качестве объектов изучения были отобраны 48 проб сыра, реализуемых местными производителями Костанайской, Восточно-Казахстанской и Акмолинской областей.

Выделение и идентификацию изолятов *E.coli* проводили с использованием классических биохимических тестов. Тестирование чувствительности микроорганизмов проводили диско-диффузным методом с использованием агара Мюллера-Хинтон (HiMedia Laboratories, Индия, MV1084) [10], интерпретацию результатов – согласно рекомендациям EUCAST [11]. Для тестирования были использованы следующие диски с антибиотиками: бета-лактамы (ампициллин-10 мкг, амоксициллин-25 мкг, цефоперазон-75 мкг, цефокситин-30 мкг, цефподоксим-10 мкг), аминогликозиды (стрептомицин-10 мкг, канамицин-30 мкг, гентамицин-120 мкг), амфениколы (левомецетин-30 мкг), тетрациклины (тетрациклин-30 мкг, доксициклин-30), фторхинолоны (энрофлоксацин-5 мкг, ципрофлоксацин-5 мкг, норфлоксацин-10 мкг, офлоксацин 5 мкг), хинолоны (налидиксовая кислота-30 мкг), сульфаниламиды (сульфаметоксазол с триметопримом-1,25/23,75), нитрофураны (фурадонин-300 мкг, фуразолидон-300 мкг).

Детекцию генов, кодирующих устойчивость к антибактериальным препаратам, проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с визуализацией в 1,5% агарозном геле. Для выделения ДНК использовали метод термического лизиса [12]. Реакционная смесь содержала воды без ДНКаз, DreamTaqGreen мастер-микс, прямой и обратный праймеры, тестируемое ДНК. Для обнаружения генов методом ПЦР были использованы следующие праймеры: группа β -лактамов пенициллины (*bla*TEM, *bla*SHV, *OXA*), аминогликозидам (*aphA1*, *aadB*), тетрациклинам (*tetA*, *tetB*), хинолонам (*qnrA*, *qnrA*) и сульфаниламидам (*SUL3*).

Режим амплификации был подобран для каждой пары праймеров. Температурный режим состоял из денатурации при 94°C в течение 30 сек, температура отжига 53°C, элонгация при 72°C в течение 60 сек. Время амплификации составляло 1 ч 45 мин. Детекцию продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1,5% агарозном геле при 105 В, в

течение 1 ч 25 минут. Количество амплификата который был использован для анализа 10 мкл. Для постановки реакции использовали маркер на 100 bp, буферный раствор TBE, краситель SYBR Safe DNA gel stain.

Результаты. В результате проведенной исследовательской работы из 48 проб сыра выделены 27 образцов культур *E.coli*, что составило 56.2 %.

При тестировании антибиотикорезистентности *E.coli* выявили, что наибольшее количество изолятов проявляют устойчивость к препаратам тетрациклин (14.8%), фурадонин (18.6%), цефокситин (18.6%), левомецетин (11.1%), фуразолидон (11.1%).

В основном изоляты проявляли полирезистентность, т.е. были устойчивы сразу к двум и более антибактериальным препаратам, в 14.8% случаев, монорезистентными оказались лишь 25.9% изолятов. Так, в большинстве случаев изоляты *E.coli* были устойчивы сразу к пяти антибактериальным препаратам, что составило 7.4% выделенных изолятов.

В результате тестирование наличия генов резистентности к антибиотикам методом ПЦР выявлено что из 27 изолятов в 7-ми изолятах (26%) обнаружены гены резистентности.

По результатам диско-диффузионного тестирования установили, что изоляты *E.coli*, выделенные из сыра были резистентны к пяти антибиотикам из 19 (26.4%). Изоляты бактерий были устойчивы к тетрациклину, фурадонину, цефокситину, левомецетину и фуразолидону. По литературным данным, частота обнаружения штаммов *E.coli*, обладающих механизмами для трансмиссивной передачи генного материала, выше в молочных продуктах из пастеризованного молока [2]. В ходе исследования были обнаружены гены резистентности, кодирующих устойчивость к сульфаниламидам. Так, при оценке генотипической резистентности изолятов *E.coli* молекулярная диагностика показала наличие гена *SUL3* в семи пробах (25.9% исследованных проб). Эти исследования показывают необходимость дальнейшей работы по выявлению генетических маркеров резистентности бактерий, контаминирующих продукты молочного производства.

Представленные результаты свидетельствуют о существующем потенциале передачи устойчивости *E.coli* антибактериальным препаратам не только животным, но и человеку. Понимание проблемы резистентности изолятов *Escherichiacoli*, позволит улучшить стратегии контроля и профилактики дальнейшего распространения устойчивых форм бактерий. Следует отметить, что исследуемые бактериальные изоляты имели повышенный уровень резистентности к большинству препаратов среди критически важных приоритетных противомикробных препаратов, применяемых в практике ветеринарии и медицины *E.coli* [12, 13].

Заключение.

Оценка антибиотикорезистентности изолятов *Escherichiacoli*, выделенных из сыров Казахстанского производства, показали их устойчивость к тетрациклинам, бета-лактамам, фторхинолонам. Изучение генотипической резистентности показало наличие генов резистентности к сульфаниламидам (*SUL3*)

Список использованной литературы

1. Altalhi, A. D., Hassan, S. A. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers [Text] // *Food Control*. - 2009.-№20(10). - P. 913–917.
2. Короткевич Ю.В. Анализ резистентности к антибиотикам энтеробактерий и энтеро-кокков, выделяемых из пищевых продуктов [Текст] // *Вопросы питания*. - 2016. Т 85. - №2.- С.5-12.
3. Farrokh C. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *International Journal of Food Microbiology* [Text] / Farrokh C., Jordan K., Auvray F. - 2013.-Vol.162 (2). - P. 190-212.
4. Gomes, T. Diarrheagenic *Escherichia coli* [Text] / *Brazilian Journal of Microbiology* [Text] / Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A. - 2016. -Vol. 47. - P. 3–30.
5. Edson A. Rios, Jesús Santos, Isidro García-Meniño. Characterisation, antimicrobial resistance and diversity of atypical *EPEC* and *STEC* isolated from cow's milk, cheese and dairy cattle farm environments [Text] / *LWT*.- 2019.-Vol. 108. - P.319–325.
6. Ribeiro J. Short communication: Molecular characterizan and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from raw milk and Minas Frescal cheeses in Brazil [Text] / Ribeiro Júnior, J. C., Silva, F. F., Lima, J. B. A. // *Journal of Dairy Science*. 2019. URL: <http://doi:10.3168/jds.2019-16732>.
7. Ефимочкина Н.Р. Эмерджентные бактериальные патогены в пищевой микробиологии [Текст]. - М.: Издательство РАМН, 2008. - 68 с.
8. Шкурат М.А., Покудина И.О., Батталов Д.В., Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам [Текст] // «Живые и биокосные системы». - 2014. - № 10.- URL: <http://jbks.ru/archive/issue-10/article-10>.
9. Momtaz H. E., Molecular detection of antimicrobial resistance genes in *E. coli* isolated from slaughtered commercial chickens in Iran [Text] // *Veterinari Medicina*. - 2012. -Vol. 57(4). - P.193–197.
10. Ганина В. И., Борисова Л. А., Захарченко А. В. Биобезопасность молочной продукции [Текст] // *Переработка молока*. - 2010. - №8. - С.14-16.
11. Yang X., Wang D., Zhou Q. et al. Antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae: determination of disk content and Kirby-Bauer breakpoint for ceftazidime/avibactam [Text] // *BMC Microbiol*. – 2019. – Vol.19. -№240. - URL:<https://doi.org/10.1186/s12866-019-1613-5>.
12. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.
13. Protocol for identification of *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari* by gel-based PCR. National veterinary institute (SVA). April 2021, Version 1. – URL:https://www.sva.se/media/ju015ios/eurl_protocol-identification-

jejuni-colilari_gelpcr_v1.pdf (дата обращения 22.10.2021).