АННОТАЦИЯ
диссертационной работы Байменова Бахита Муратовича
на тему: ««Идентификация *Staphylococcus aureus* и генетических маркеров устойчивости к антибактериальным препаратам в пищевых продуктах методом мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР)» представленной на соискание степени доктора философии (PhD) по образовательной программе 8D09102-Ветеринарная санитария

1. Общая характеристика работы. Диссертация посвящена разработке мультиплексной ПЦР-РВ для одновременного выявления *S. aureus* (по гену nuc) и генов антибиотикорезистентности (blaZ, ermC, tetK) в продуктах животного происхождения. Метод апробирован на 87 штаммах *S. aureus*, выделенных из 1680 проб, и показал высокую эффективность. Результаты работы имеют практическое значение для контроля безопасности пищевой продукции и мониторинга антибиотикорезистентности (АБР) в ветеринарии и пищевой промышленности.

2. Актуальность темы исследований. Наряду с высокой патогенностью, стафилококки известны своей высокой устойчивостью к практически всем существующим антибиотикам, в результате мутаций или горизонтального переноса генов. В последние десятилетия в Казахстане, как и во всем мире, отмечается стремительное распространение устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний к антибактериальным препаратам (АБП). По результатам исследований, в период с 2018 по 2022 годы, на территории РК из 146 изолятов *S. aureus*, выделенных из пищевой продукции -70,5% были устойчивы хотя бы к одному АБП, наиболее часто встречались гены blaZ (87,1%), mecA (45,2%), lnuA (40,7%), ermC и tetK. На севере Казахстана отмечался высокий процент устойчивых изолятов *S. aureus* и *Salmonella spp*. выделенных от животных, особенно к антибиотикам групп тетрациклинов, нитрофуранов, β-лактамов и макролидов.

Надзор за распространением АБР является стратегической задачей ветеринарии и включает в себя мониторинг АБР возбудителей среди сельскохозяйственных животных и в животноводческой продукции.

Перспективным направлением в диагностике АБР является применение молекулярно-генетических методов — ПЦР и секвенирования. Преимуществом ПЦР является независимость от фенотипических признаков и высокая скорость получения результатов, что критически важно для быстрой и точной диагностики резистентности *S. aureus* и назначения эффективной терапии.

Ключевые слова: Staphylococcus aureus, антибиотикорезистентность, мультиплексная ПЦР-РВ, гены nuc/blaZ/ermC/tetK, пищевая безопасность.

3. Цель и задачи исследования

Цель: Идентификация *S. aureus* и его генетических маркеров устойчивости (blaZ, ermC и tetK) к АБП в пищевых продуктах животного происхождения методом мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Задачи:

1. Выделение штаммов *S. aureus* из пищевых продуктов животного происхождения, исследование биологических свойств и АБР.

2. Дизайн, синтез и валидация праймерных и зондовых последовательностей для мультиплексной ПЦР-РВ.

3. Оптимизация условий ПЦР-РВ и оценка её аналитических характеристик – специфичности и чувствительности.

4. Идентификация изолятов *S. aureus* и генетических маркеров устойчивости (blaZ, ermC и tetK) с применением разработанных праймерных и зондовых последовательностей. Проведение оценки согласованности фенотипических и генотипических методов идентификации.

4. Объект и предмет исследований

Объект исследования: устойчивые к антибиотикам изоляты *S. aureus*, выделенные из продуктов животного происхождения.

Предмет исследования: антибиотикорезистентность, видовой маркер nuc и молекулярные механизмы резистентности (blaZ, ermC, tetK) *S. aureus*, разработка и применение мультиплексной ПЦР-РВ для контроля качества и безопасности продуктов животного происхождения.

5. Методология исследования (материалы и методы). Работа проводилась в лаборатории молекулярно-генетических исследований и лаборатории клинико-диагностических, микробиологических исследований и безопасности материалов биологического происхождения на базе НИИ прикладной биотехнологии НАО «КРУ имени Ахмет Байтұрсынұлы», в период 2020-2023 гг. В ходе исследования было отобрано 1680 проб с местных рынков и 16 молочных хозяйств Костанайской области. Выделение и идентификацию штаммов стафилококков выполняли в соответствии с нормативными документами (МУК 4.2.1890-04, ГОСТ 26809.1-2014, ГОСТ 31746-2012, ГОСТ 31467-2012, СТ РК ГОСТ Р 51447-2010, ГОСТ 30347-2016). Типирование штаммов проводили методом секвенирования гена 16S рРНК по Сенгеру. Определение чувствительности к антибиотикам выполняли ДД методом согласно стандартам EUCAST. Поиск генов-мишеней осуществляли в базе данных NCBI. Для филогенетического анализа использовали программу MEGA 11, для оценки свойств праймеров - IDT OligoAnalyzer Tool, для анализа нуклеотидных последовательностей - NCBI BLAST, а для дизайна праймеров - NCBI Primer-BLAST.

Для оценки аналитической специфичности и чувствительности метода использовали контрольные образцы, включая специально разработанный рекомбинантный положительный контроль для верификации ПЦР. Сравнительный анализ эффективности мультиплексной ПЦР (с определением чувствительности, специфичности, PPV/NPV и каппа-коэффициента) и традиционных фенотипических методов (микробиологические исследования и ДД-тест) проведен на 87 штаммах.

6. Научная новизна. Впервые разработана мультиплексная ПЦР-РВ для идентификации *S. aureus*, с одновременным определением генов устойчивости (blaZ, ermC и tetK) к АБП. Для идентификации *S. aureus* выбран участок гена термостабильной нуклеазы (nuc). Научно обоснована и экспериментально доказана эффективность его использования для идентификации *S. aureus*. Аналитическая чувствительность набора реагентов на основе мультиплесной ПЦР-РВ составила от 10 копий ДНК/мкл, специфичность – 100%, воспроизводимость – 100%.

Продемонстрированы значительные уровни устойчивости к антибиотикам группы β-лактамов, тетрациклинов, макролидов и фторхинолонов, а также

установлена частота встречаемости генов blaZ, ermC и tetK в изолятах *S. aureus*. Выявлены статистически значимые вариации в результатах определения генов устойчивости blaZ, ermC и tetK к АБП и ДД метода.

Получены новые данные, которые подтверждают необходимость мониторинга профилей резистентности изолятов *S. aureus* циркулирующих в животноводческих фермах для обеспечения безопасности продуктов животного происхождения.

7. Основные положения, выносимые на защиту

1. Распространённость штаммов *S. aureus*, выделенных из продуктов животного происхождения, устойчивых к антибактериальным препаратам, циркулирующих на территории Костанайской области;

2. Разработка мультиплексной ПЦР для идентификации *S. aureus* и генетических маркеров устойчивости (blaZ, ermC и tetK) к антибактериальным препаратам в пищевых продуктах животного происхождения;

3. Идентификация *S. aureus* и генетических маркеров устойчивости (blaZ, ermC и tetK) к антибактериальным препаратам в пищевых продуктах животного происхождения с применением разработанной мультиплексной ПЦР-РВ.

8. Практическая значимость. На основании проведенных исследований разработаны и предложены:

- набор на основе мультиплексной ПЦР-РВ для детекции *S. aureus* и генетических маркеров резистентности (blaZ, ermC и tetK) к антибактериальным препаратам.

- нормативно-техническая документация по использованию набора для выявления *S. aureus* и определения локусов их АБР методом мультиплексной ПЦР-РВ»;

- практические рекомендации, учебное пособие, методическое пособие, коллективная монография;

- патент на полезную модель;

- результаты диссертационной работы используются при проведении занятий по дисциплинам «Микробиологическая диагностика болезней сельскохозяйственных животных» и «Современные методы диагностики болезней животных» на факультете сельскохозяйственных наук КРУ имени Ахмет Байтұрсынұлы и проведении исследовательских работ в лаборатории Западно-Казахстанского технического университета им. Жангир хана акт внедрения от 11.11.2024 г.

9. Основные результаты исследований в форме выводов

1. В период проведения диссертационных исследований, осуществлен отбор 1680 проб продуктов животного происхождения в точках розничной торговли города и различных хозяйствах Костанайской области. Выделено 87 штаммов *S. aureus*. Выявление *S. aureus* в пробах продуктов животного происхождения, могут играть важную роль для понимания состояния здоровья животных и качества производимой продукции.

2. Результаты исследования, указывают на высокий уровень устойчивости штаммов *S. aureus* к различным группам АБП. Наибольшее количество штаммов *S. aureus* проявили чувствительность к группе β – лактамных антибиотиков – до 100%, к группе тетрациклинов и фторхинолонов – до 95,4%, макролидов – до 60,92%. Наименьшее количество резистентных штаммов выявлено к группе сульфаниламидов

– 21,84% и аминогликозидов – 27,59%. Из 87 штаммов *S. aureus*: 3 (3,44%) были резистентны к двум группам АБП; 17 (19,54%) - к трем; 46 (52,87%) - к четырем; 19 (21,83%) сразу к пяти группам; 2 (2,29%) к шести группам. АБП с наибольшей активностью по отношению к *S. aureus* включали гентамицин, канамицин и неомицин, тогда как ампициллин, тетрациклин и ципрофлоксацин характеризовались сниженной активностью.

3. Разработана мультиплексная ПЦР-РВ для экспресс-идентификации *S. aureus* с одновременным определением генов устойчивости (blaZ, ermC и tetK) к АБП. Научно обоснована и экспериментально доказана эффективность его использования для выявления *S. aureus* и генов устойчивости (blaZ, ermC и tetK) при исследованиях пищевых продуктов и биологического материала животного происхождения. Аналитическая чувствительность набора составила от 10 копий ДНК/мкл, специфичность – 100%, воспроизводимость – 100%.

4. Идентифицированы 87 штаммов *S. aureus* и их генетические маркеры устойчивости (blaZ, ermC и tetK) с применением разработанной ПЦР-РВ. Из 87 штаммов *S. aureus*, у 2 (2,3%) не обнаружено ни одного гена резистентности к АБП, 18 (20,69%) штаммов имели 1 ген, 39 (44,83%) по два гена, у 28 (35,18%) обнаружено три, 85 (97,7%) имели хотя бы один из исследуемых генов.

5. Для оценки производительности и соответствия ПЦР теста проведена оценка согласованности фенотипических и генотипических методов идентификации. По результатам анализа диагностическая чувствительность ПЦР теста по гену blaZ составила 80,43%, специфичность – 92,68%, PPV – 92,50%, NPV – 80,85%, а значение Каппа 0,73, что указывает на расхождения в классификации изолятов как чувствительных/резистентных. Диагностическая чувствительность ПЦР теста в сравнении с ДД методом по гену TetK составила 87,95%, специфичность – 100%, PPV – 100%, NPV – 28,57%, а значение каппа 0,40, что указывает на существенное расхождение между методами в классификации изолятов как чувствительных/резистентных. Диагностическая чувствительность ПЦР теста в сравнении с ДД методом по гену ermC составила 81,54%, специфичность – 36,36%, PPV – 79,1%, NPV – 40%, а значение Каппа 0,18, что указывает на существенное расхождение в классификации изолятов как чувствительных/резистентных. Ген термонуклеазы nuc, был выявлен в 100% случаев, диагностическая чувствительность составила 100%, специфичность – 100%, PPV – 100%, NPV – 100%, а коэффициент Каппа – 1 (идеальное согласие между методами).

6. Разработан лабораторный образец набора для мультиплексной ПЦР-РВ, предназначенный для ускорения и повышения точности идентификации *S. aureus* и генов резистентности с целью контроля качества и безопасности пищевых продуктов животного происхождения.

10. Связь с научно-исследовательскими работами и государственными программами. Работа выполнена в рамках двух научно-технических программ:

- BR24992785-OT-24 «Организация и проведение комплексных исследований по обеспечению устойчивого развития агропромышленного комплекса Костанайской области с созданием научно-исследовательского технологического центра». 2024-2027 г.;

- BR10764944 «Разработка методов аналитического контроля и проведения мониторинга безопасности пищевой продукции», проект «Разработка

мультиплексной ПЦР в реальном времени для выявления *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus agalactiae* в молочной продукции и определение локусов антибиотикорезистентности» 2020-2023 г.

11. Достоверность и обоснованность полученных результатов

Достоверность и обоснованность полученных результатов подтверждены с применением новых молекулярно-генетических методов, выполненных на сертифицированном оборудовании в аккредитованной лаборатории. Выводы диссертации являются новыми и основаны на результатах собственных исследований.

12. Сведения о публикациях по основным результатам. По теме диссертационной работы опубликовано 16 научных и учебно-методических трудов, включая:

- 11 статей, из них: 2 в зарубежных научных журналах в базе 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) процентиль 80 и 15; в изданиях КОКСНВО МНВО РК - 7, из них 3 статьи -в республиканских научных изданиях с присвоенными DOI (DOI: 10.52578/2305-9397-2022-1-1-3-12; DOI: 10.56339/2305-9397-2022-3-1-105-114; DOI: 10.52578/2305-9397-2023-2-2-144-153); 2 статьи - в материалах международных конференций;
- 1 патент на полезную модель №7828 от 17.02.2023 г.
- 1 раздел коллективной монографии.
- 3 учебно-методических издания.

13. Описание вклада докторанта. Автор принимал участие во всех этапах исследования: обзор и анализ литературных источников, отбор проб, определение устойчивости стафилококков к антибактериальным препаратам, комплекс молекулярно-генетических исследований, анализ и интерпретация результатов исследования, статистическая обработка данных.

14. Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 186 листах машинописного текста и включает разделы: введение, обзор литературы, собственные исследования, результаты исследований, обобщение и оценка результатов исследований, список использованных источников, приложения. Работа содержит 10 формул, 59 рисунков, 29 таблиц, 17 приложений, 419 источников литературы.