

УДК 637.5/615.33

Анарбаева А.С.¹, Ph.D докторант

Усенбаев А.Е.², кандидат ветеринарных наук, ассоциированный профессор

Паритова А.Е.², Ph.D, старший преподаватель

Омирбекова Г.Б.², магистр ветеринарных наук

¹ НАО «Казахский Национальный аграрный университет», г.Алматы, Республика Казахстан

² АО «Казахский агротехнический университет имени С.Сейфуллина», г.Астана, Республика Казахстан

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ШТАММОВ *CAMPYLOBACTER JEJUNI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПТИЦЕПРОДУКТОВ

Аннотация

Среди бактерий рода *Campylobacter* наибольшую эпидемиологическую значимость представляют *C. jejuni*, которые обуславливают до 90% подтвержденных лабораторных случаев пищевого кампилобактериоза. Важнейшей характеристикой, определяющей биологические особенности *C. jejuni*, является их чувствительность к антибиотикам. Целью исследования являлось изучение фенотипических профилей антибиотикорезистентности штаммов *Campylobacter spp.*, выделенных из птицепродуктов и объектов внешней среды предприятий птицеперерабатывающей промышленности. При анализе 200 проб сырых птицепродуктов и смывов с поверхностей оборудования выделены 18 штаммов рода *Campylobacter*, включая 15 штаммов *C. jejuni*. Изучена чувствительность выделенных штаммов к 9 антимикробным препаратам 9 фармакологических групп (ампициллин (10 µg), амиксоциллин (25 µg), эритромицин (15 µg), гентамицин (5 µg), налидиксовая кислота (10 µg), стрептомицин (5 µg), тетрациклин (30 µg), пенициллин (10 µg) и цифрофлоксацин (10 µg)) дискодиффузионным методом. Ни один из изолятов не был устойчив к амоксициллину, гентамицину, стрептомицину. В то время различная картина резистентности наблюдалась для других антибиотиков: тетрациклина, эритромицина, налидиксовой кислоты соответственно. Полученные данные свидетельствуют о высокой распространенности антибиотикорезистентных штаммов среди кампилобактерий, контаминирующих птицепродукты в процессе производства и переработки сырья.

Ключевые слова: антибиотики, чувствительность, продукты птицеводства, смывы, штаммы, антибиотикорезистентность.

Введение. Обеспечение микробиологической безопасности пищевых продуктов в отношении новых и вновь возникших возбудителей кишечных инфекций, таких как бактерии рода *Campylobacter*, является актуальной проблемой гигиены питания. Это обусловлено значительным ростом заболеваемости кампилобактериозом, показатели которой в последние годы, в большинстве развитых стран, превысили таковые при сальмонеллезе [1]. По оценкам некоторых исследователей, кампилобактериозом ежегодно поражается 1% населения разных стран [2], а предполагаемый экономический ущерб от него только в США составляет до 1,3 до 6,2 млрд.\$ ежегодно [3].

По данным зарубежных исследователей до 70% случаев кампилобактериоза связано с употреблением контаминированных пищевых продуктов и воды [4]. Многочисленные эпидемиологические исследования идентифицировали употребление мяса птицы в качестве основного фактора риска при кампилобактериозе [5]. Однако, точный вклад, который вносит употребление вышеуказанных продуктов, в заболеваемость кампилобактериозом не определен.

Campylobacter jejuni является одной из наиболее распространенных причин пищевого отравления в Соединенных Штатах и в Европе. Подавляющее большинство случаев заражения данным видом кампилобактериоза происходит не в виде вспышек, а в виде отдельных случаев заражения.

Кампилобактеры - грамотрицательные микробы. Купирование вызываемых ими инфекций обеспечивается назначением антибактериальных препаратов широкого спектра действия. Перечень этих средств достаточно обширен и оставляет врачам-практикам возможность для маневрирования. Однако сложилась традиция, согласно которой препаратом выбора при лечении кампилобактериозных диарей считается антибиотик эритромицин из группы макролидов.

Одними из важнейших характеристик, определяющих биологические особенности штаммов, являются показатели чувствительности (устойчивости) бактерий к антибиотикам. Актуальность изучения данного вопроса обусловлена широким распространением в последние годы явления высокой лекарственной резистентности микроорганизмов. Это в полной мере относится и к кампилобактериям. Хотя в практической медицине доминирует положение воздерживаться от назначения антибиотиков при нетяжелом течении кампилобак-териозов, все же антибактериальная терапия необходима при ряде форм заболевания, генерализации инфекции, у ослабленных индивидуумов, больных с иммуносупрессией и т.д.

Однако в других исследованиях этого периода уже была выявлена наметившаяся тенденция к формированию у штаммов кампилобактерий устойчивости к антибактериальным препаратам. В настоящее время практически во всех странах регистрируется большое число возбудителей, резистентных к действию антибактериальных препаратов. Так, по данным разных авторов, выделяемые от людей, животных и из объектов окружающей среды (ООС) штаммы кампилобактерий в 8-48,8% случаев обнаруживают устойчивость к аминогликозидным антибиотикам (канамицин, гентамицин), в 7,8 -33% - к ампициллину, амоксиклаву и карбенициллину, в 15-79% - к тетрациклину и его производным, в 12-31% - к клиндамицину, в 10% - к налидиксовой кислоте. В литературе появились сообщения, что от 15 до 83% выделяемых штаммов проявляют резистентность к макролидам - препаратам выбора при кампилобактериозе [6].

В работах по изучению показателей чувствительности кампилобактерий к антибактериальным препаратам, проведенных на территории нашей страны, также отмечена довольно высокая частота встречаемости резистентных штаммов. Так, к эритромицину-препарату выбора в лечении диарей данной этиологии - оказались нечувствительными 11,5% культур возбудителя, в отношении аминогликозидных антибиотиков - 4-8,5%, пеницилинов широкого спектра 2,8-30%, метронидазола 23,5%. Особенно большой процент резистентных штаммов - к действию тетрациклина и его производных (до 48,8%). С другой стороны, хорошо зарекомендовали себя в отношении кампилобактерий препараты группы нитрофуранов, хлорамфеникол. Штаммов, устойчивых к этим агентам, не выявлено.

Целью исследования являлось изучение фенотипических профилей антибиотикорезистентности штаммов *Campylobacter spp.* выделенных из продуктов птицеводства и объектов окружающей среды предприятий птицеперерабатывающей промышленности.

В задачи исследования входило проведение исследований по выделению возбудителей кампилобактериоза из продуктов, полуфабрикатов и объектов внешней среды предприятий птицеперерабатывающей промышленности, определение чувствительности выделенных штаммов *Campylobacter spp.* к расширенному спектру антимикробных препаратов различных фармакологических групп.

Материалы и методы исследования. Отбор проб. В общей сложности 200 образцов, состоящих из 80 мяса птицы, 50 смывов, 70 внутренних органов и кожи были собраны асептически с розничных рынков, птицеводческих хозяйств в окрестностях города Алматы. Образцы немедленно отправляли при температуре 4°C в лабораторию и обрабатывали в течение 4 часов для сбора, чтобы организмы оставались жизнеспособными.

Выделение. Питательные среды и условия выращивания для выделения *Campylobacter spp.* соответствовали рекомендациям Наземного руководства МЭБ (2008), с необходимыми изменениями. Приблизительно 25 г пробы мяса обогащали 100 мл обогащенным бульоном Престона с селективной добавкой Престона и инкубировали при 42° С в течение 24-48 часов в условиях микроаэробика с использованием газовых генераторных установок CampyPak (BD,

Oxoid). Супернатант выливали и осадок повторно растворяли в 100 мл обогащенном бульоне Престона и инкубировали в микроаэробных условиях, как указано выше [7].

После обогащения петлю заполненную инокулятами просеивали на модифицированном древесном угле цефоперазона дезоксихолат-агаре (mCCDA), дополненным добавкой CCDA и затем планшеты инкубировали при 42°C в течение 24-48 ч в микроаэробных условиях. Сероватые, плоские и увлажненные с тенденцией к распространению и с металлическим блеском или без них колонии собирали и субкультивировали снова на mCCDA для выделения чистых колоний для дальнейшей идентификации.

Загрязненность пищевых продуктов кампилобактерами оценивали в сопоставлении с наличием в исследуемых образцах санитарно-показательных микроорганизмов – индикаторов гигиены производства (бактерий группы кишечной палочки - БГКП) и патогенных бактерий рода *Salmonella*. Определение БГКП и сальмонелл проводили по ГОСТ 31659-2012 (ISO 6579:2002).

Метод дисковой диффузии. Метод дисковой диффузии для определения устойчивости к антибиотикам было выполнено по методу, описанному Bauer et al. (1966). Пропитанные антибиотиками диски были использованы, поставляемые Becton, Dickinson & Co., США: аминогликозид (10 µg), фторхинолон (25 µg), эритромицин (15 µg), макролид (5 µg), налидиксовая кислота (10 µg), клиндомицин (5 µg), тетрациклин (30 µg), пенициллин (10 µg) и цифрофлоксацин (10 µg). От трех до пяти изолированных колоний того же морфологического типа отбирали и перенесли в бульон Мюллера-Хинтона и инкубировали при 37°C в течение 24 ч в условиях микроаэробика для получения мутности инокулята, эквивалентной 0,5 стандарту МакФарланда. Стерильный ватный тампон погружали в суспензию каждого изолята и просеивали по всей поверхности пластин, содержащих агар Мюллера-Хинтона с 5% овечьей кровью. Указанные диски антибиотиков затем помещали на планшеты и через 24-48 ч инкубации с микроаэробикой при 37°C диаметр зоны ингибирования вокруг каждого диска измеряли супперами и регистрировали [8].

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку результатов проводили с помощью критерия Стьюдента и программы Statistica 6.0. Различия признавали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Расчеты проводили с помощью пакетов программ Excel 2010 SPSS 18.0.

Результаты и обсуждение результатов исследования. Бактерии рода *Campylobacter* являются одной из наиболее распространенных причин острых кишечных инфекций в мировом сообществе. Наибольшее количество диарейных заболеваний, возбудителем которых являются кампилобактерии зарегистрированы в США. Так, в США ежегодно на каждые 100 000 человек диагностируется около 14 случаев заболеваний. Кампилобактериоз ежегодно затрагивает более 1,3 миллиона человек. Хотя инфекция *Campylobacter* обычно не вызывает смерти, по оценкам, ежегодно в США умирает около 76 человек инфицированных кампилобактериями. Наиболее известным и значимым, как пищевой патоген признан вид *C. jejuni*.

По данным Всемирной организации здравоохранения как в развитых, так и в развивающихся странах бактерии рода *Campylobacter* пищевого происхождения вызывают большее число случаев диареи, чем бактерии рода *Salmonella*. Высокая заболеваемость диареей, вызванной бактериями рода *Campylobacter*, а также продолжительность заболевания и возможные осложнения свидетельствуют об уровне её высокой значимости с социально-экономической точки зрения [9].

Сопоставление данных о наличии в исследованных образцах различных групп контаминантов показывает, что бактерии рода *Campylobacter* обнаруживаются преимущественно в сырых птицепродуктах и смывах с поверхностей оборудования птицеперерабатывающих предприятий.

В общей сложности было выделено 18 изолятов *Campylobacter* из 200 образцов, содержащих 15 *C. jejuni* и 3 *C. coli*. Распространенность *Campylobacter spp.* в курином мясе, в образцах смывов наблюдалось 15,1%, 4,2% соответственно.

В таблице 1 приведен список используемых антибиотиков и наличие данных антибиотиков в пробах в процентном соотношении. Установлено, что наибольшие показатели

по содержанию в пробах занимают следующие антибиотики: фторхинолон (84%) и макролид (83%), наименьший в свою очередь занимает налидиксовая кислота (10%).

Таблица 1 – Список используемых антибиотиков

№	Используемые антибиотики	Наличие в пробах
1	ампициллин	48,8%
2	амоксициллин	84%
3	гентамицин	83%
4	налидиксовая кислота	10%
5	стрептомицин	31%
6	тетрациклин	79%
7	пенициллин	33%
8	эритромицин	67,2%
9	ципрофлоксацин	62,1%

Результаты чувствительности и устойчивости к антибиотикам приведены в таблице 2.

Показатели антибактериальной чувствительности наших изолятов приведены в таблицах 3-4.

Результаты исследований на антибактериальную чувствительность 200 изолятов *S.jejuni* против 9 различных антибактериальных агентов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Показатели антибактериальной резистентности и распределения минимальной ингибирующей концентрации куриных изолятов *S.jejuni*

Антибиотики	Куры (n = 100)		
	Ч	С	У
ампициллин	56	12	32
амоксициллин	97	2	1
гентамицин	100	–	–
налидиксовая кислота	78	3	19
стрептомицин	99	–	1
тетрациклин	48	6	56
пенициллин	56	9	35
эритромицин	67	4	29
ципрофлоксацин	69	12	19

В результате проведения исследований с помощью метода на диффузию диска было установлено, что чувствительность изолятов *S.jejuni* курицы к амоксициллину и стрептомицину составило 97,0% и 99,0% соответственно, также обнаружено, что все изоляты чувствительны к гентамицину. В то время как показатели чувствительности изолятов курицы к ампициллину, налидиксовой кислоте и тетрациклину составило 56,0, 78,0 и 48,0%. Установлено, что изоляты *S.jejuni* курицы устойчивы к одному или нескольким антибиотикам. Данные о множественной лекарственной устойчивости изолятов *S.jejuni* курицы представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Распределение множественной лекарственной устойчивости изолятов *C.jejuni*

Число устойчивости	Модели резистентности	Происхождение устойчивых изолятов
		Курица
2	AMP, EM	1
2	AMP, NA	1
3	NA, S	1
4	AMC, AMP, TE	–
4	AMP, NA, TE.	1
4	AMP, EM, NA	4
5	AMC, AMP, EM, NA	1
5	AMP, EM, NA	1
5	AMP, NA, TE	12
5	EM, NA, TE	2
5	NA, S, TE	–

Zhang et al. (2010) сообщили, что 44 изолятов *C. jejuni* были восприимчивы к эритромицину, гентамицину и стрептомицину, но устойчивы к налидиксовой кислоте, левофлоксацину и ципрофлоксацину [10].

Rahimi et al. (2010) установили, что показатели резистентности штаммов 177 *C.jejuni*, выделенных от туш птицы, к тетрациклину, ципрофлоксацину, налидиксовой кислоте и энрофлоксацину составляют 79,7%, 67,2%, 59,3% и 48% соответственно. Более того, исследователи сообщили, что 14,3% изолятов были резистентны к одному антибиотику, 24,3% изолятов были резистентны к двум антибиотикам, а 40% изолятов были устойчивы к более чем двум антибиотикам [11].

В результатах наших исследований, в зависимости от высоких показателей множественного антибиотикорезистентности, наблюдался низкий уровень соответствия результатам генотипирования и устойчивости к антибиотикам. Аналогичные данные были получены, Хан и др. (2007) исследователями. Таким образом, связь между генотипической характеристикой и устойчивостью к антибиотикам была довольно низкой [12].

Заключение. Изучены фенотипические профили антибиотикорезистентности 9 штаммов *C. jejuni*, выделенных из сырых птицепродуктов и смывов с поверхностей оборудования птицеперерабатывающих предприятий.

Определена чувствительность выделенных штаммов к 9 антимикробным препаратам. Ни один из изолятов не был устойчив к амоксициллину, гентамицину, стрептомицину. В то время различная картина резистентности наблюдалась для других антибиотиков: тетрациклина, эритромицина, налидиксовой кислоты соответственно. Полученные данные свидетельствуют о высокой распространенности антибиотикорезистентных штаммов среди кампилобактерий, контаминирующих птицепродукты в процессе производства и переработки сырья.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Oberhelman R.A., Taylor D.N. Campylobacter infections in developing countries // In: Nachamkin I., Blaser M.J. Campylobacter, 2nd edn. – Washington: ASM Press DC, 2000. - P. 139-153.
2. Debmyne L., Broman I., Bergstrom S., Olsen B. Campylobacter sub-antarcticus sp. nov., isolated from birds in the sub-Antarctic region // J Syst Evol Microbiot. – 2010. – Vol. 60. – P. 815-900.
3. EFSA Analysis of the baseline survey on the prevalence of Campylobacter in broiler batches and of Campylobacter and Salmonella on broiler carcasses in the EU. – 2008. - Part A: 1 Campylobacter and Salmonella prevalence cs-I imates. EFSA Journal. – 2010. - № 8(02). – P. 1503.
4. Grennan B., Sullivan N.A., Fallon R. PCR-ELISAs for the detection of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in poultry samples // Biotechniques. – 2001. – vol. 30. – P. 602-608.

5. Hanning I., Jarquin R., Slavik M. *Campylobacter jejuni* as a secondary colonizer of poultry biofilms // J. Appl. Microbiol. – 2008. - № 105. - P. 1199-1208.
6. Cardinale, E., Rose, V., Perrier Gros-Claude, J.D., Tall, F., Rivoal, K., Mead, G., Salvat, G., 2006. Genetic characterization and antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. isolated from poultry and humans in Senegal // J. Appl. Microbiol. - № 100. – P. 209–217.
7. Lindmark H., Boqvist S., Ljungström M. Risk factors for *Campylobacteriosis*: an epidemiological surveillance study of patients and retail poultry // J Clin Microbiol. – 2009. – vol. 47. – P. 2616-2619.
8. Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C., Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method // Am J Clin Pathol. – 1966. - № 45(4). – P. 493–496.
9. Abay S., Kayman T., Otluet B. al. Genetic diversity and antibiotic resistance profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from poultry and humans in Turkey// International Journal of Food Microbiology. – 2014. - № 178. – P. 29–38.
10. Han, K., Jang, S.S., Choo, E., Heu, S., Ryu, S. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance patterns of *Campylobacter jejuni* from retail raw chickens in Korea // Int. J. Food Microbiol. – 2007. - № 114. – P. 50–59.
11. Zhang, M., Gu, Y., He, L., Ran, L., Xia, S., Han, X., Li, H., Zhou, H., Cui, Z., Zhang, J. Molecular typing and antimicrobial susceptibility profiles of *Campylobacter jejuni* isolates from north China // J. Med. Microbiol. – 2010. - № 59. – P. 1171–1177.
12. Rahimi, E., Momtaz, H., Ameri, M., Ghasemian-Safaei, H., Ali-Kasemi, M. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from chicken carcasses during processing in Iran // Poult. Sci. – 2010. - № 89. – P. 1015–1020.

ТҮЙІН

Құс өнімдерінің 200 сынамасын және жабдықтардың үстінен алынған шайындыларын талдау кезінде *Campylobacter* тұқымының 18 штамы, соның ішінде *C. Jejuni* 15 штамы табылды. Анықталған штамдардың 9 антимикробты препараттар мен 9 фармакологиялық топтарға (ампициллин (10 µg), амиксоциллин (25 µg), эритромицин (15 µg), гентамицин (5 µg), налидикс қышқылы (10 µg), стрептомицин (5 µg), тетрациклин (30 µg), пенициллин (10 µg) және цифрофлоксацин (10 µg)) сезімталдығы дискодиффузды әдіспен зерттелді. Ешбір изолят амоксициллин, гентамицин, стрептомицинге төзімді емес болып шықты. Бірақ басқа антибиотиктерге: тетрациклин, эритромицин, налидикс қышқылына сәйкесінше әр түрлі төзімділік байқалды. Алынған мәліметтер бойынша құс өнімдерін өндіру және өңдеу барысында ластайтын кампилобактериялар арасында антибиотикке төзімді штамдардың таралуының жоғары дәрежеде екені расталды.

RESUME

In the analysis of 200 samples of raw poultry products and flushes from the equipment surfaces, 18 strains of the genus *Campylobacter*, including 15 strains of *C. jejuni*, were isolated. The sensitivity of the isolated strains to 9 antimicrobial preparations of 9 pharmacological groups (ampicillin (10 µg), amoxicillin (25 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (5 µg), nalidixic acid (10 µg), streptomycin (5 µg), tetracycline (30 µg), penicillin (10 µg) and digitoxifloxacin (10 µg)) by the discodiffusion method. None of the isolates was resistant to amoxicillin, gentamicin, streptomycin. At that time, a different pattern of resistance was observed for other antibiotics: tetracycline, erythromycin, nalidixic acid, respectively. The obtained data testify to the high prevalence of antibiotic-resistant strains among *Campylobacter* that contaminate poultry products in the process of production and processing of raw materials.