

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ВИРУЛЕНТНОСТИ В ШТАММАХ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ

Акулова А.С.¹

Научный руководитель – док. биол. наук, профессор Терлецкий В.П.¹

¹Университет ЛГУ имени А.С. Пушкина

akkullova@vk.com

Работа выполнена в рамках темы НИР №2 «Выявление генов резистентности к антибиотикам и генов вирулентности в изолятах кишечной палочки, выделенной из сельскохозяйственной птицы».

Введение

Актуальность исследования обусловлена необходимостью оперативного решения задач молекулярной эпизоотологии в условиях промышленного птицеводства. Циркуляция энтеропатогенных бактерий, в частности *Escherichia coli*, представляет серьезную угрозу для птицефабрик, поскольку данные микроорганизмы являются причиной колибактериоза, приводящего к снижению продуктивности, увеличению затрат на лечение и падежа птицы. Анализ генетических профилей изолятов даёт возможность выявлять пути передачи возбудителя, различать источники инфицирования и отслеживать распространение патогена в популяции.

Современные методы молекулярной генетики обеспечивают высокоточную идентификацию микроорганизмов и позволяют классифицировать патогенные штаммы кишечной палочки на основании наличия генов вирулентности и особенностей их патогенеза [1].

Методы молекулярной биологии, в частности полимеразная цепная реакция (ПЦР), играют ключевую роль в идентификации и типировании штаммов *E. coli*, циркулирующих на птицефабриках. С их помощью детектируют гены вирулентности, включая *Hly*, *ISS*, *OMT*, *Yqi*, ассоциированные с патогенностью энтеропатогенных и энтерогеморрагических штаммов и гены резистентности к антибиотикам. Изучение данных генов имеет особую значимость в контексте глобальной проблемы патогенных микроорганизмов, что требует постоянного молекулярного мониторинга и совершенствования методов эпизоотического контроля [1].

Основная часть

В настоящее время ПЦР позволяет диагностировать инфекционные заболевания, в том числе вызванных агентами, трудно поддающимися культивированию, генотипировать микроорганизмы, оценить их вирулентность, определить устойчивость микрофлоры к антибиотикам [2].

Вирулентность и патогенность штаммов кишечной палочки, их модификация и формирование этих свойств обеспечивается горизонтальным переносом, который обеспечивает передачу генов от одного генома к другому между разными видами бактерий. Появившиеся микробные патогены вызывают инфекционно-воспалительные заболевания, что является масштабной проблемой сельского хозяйства и биобезопасности человека [2]. Для решения данных проблем необходимо своевременно проводить диагностику среди разновозрастных групп птиц, определять наличие генов вирулентности и резистентности и фиксировать возможные причины летальности.

Идентификация видовой принадлежности кишечной палочки (*E. coli*) проводилась с использованием дифференциально-диагностических сред (среда Эндо) в соответствии с общепринятыми микробиологическими методами. При выявлении генов

вирулентности и резистентности был применен молекулярно-генетический метод (ПЦР) со специфическими праймерами. Оптимизированная постановка ПЦР включала в себя: 1. Концентрацию хлорида магния в реакции ПЦР, составляющую 2,5 мМ. При данной концентрации активный синтез ПЦР-продуктов проходит без образования избыточных неспецифических фрагментов. 2. Температурный режим отжига праймеров 62°C. 3. Концентрация нуклеотидов 40 мкМ, праймеров 0,4 мкМ

Аmplифицированную ДНК (после завершения ПЦР) переносили в лунки агарозного геля для проведения электрофореза в присутствии бромида этидия (1,5% агароза, трис-ацетатный буфер). Электрофорез проводили при напряжении 100 В в течение 3 часов в камере с расстоянием между электродами 20 см (градиент напряжения 5 В/см). В качестве маркера для определения длины амплифицированных ДНК-фрагментов использовали GeneRuler (ThermoFisherScientific™).

Результаты разделения амплифицированных фрагментов визуализировали с использованием системы гель-документации под ультрафиолетом. Анализ числа и распределения фрагментов в геле проводился визуально по сравнению с маркерной ДНК.

При выполнении научно-исследовательской с использованием ПЦР-тестирования для выявления генов вирулентности у кишечной палочки был получен следующий результат: в группе из 30 изолятов *Escherichia coli* во всех образцах были обнаружены три гена вирулентности: *HlyF*, *Iss* и *OmpT*.

При идентификации гена резистентности *FloR* у кишечной палочки, выделенной от молодняка индеек (20 образцов), было выявлено 15 изолятов резистентных к данному антибиотику. У 10 изолятов выделенных от взрослых особей присутствие гена не обнаружено.

Полученные результаты можно в дальнейшем использовать для дальнейших разработок способов профилактики, для обеспечения подавления распространения патогенных штаммов микроорганизмов у птиц.

Вывод

Оптимизированное молекулярно-генетическое тестирование, основанное на методах полимеразной цепной реакции (ПЦР), является важным инструментом для идентификации генов резистентности и вирулентности. С высокой чувствительностью оно позволяет выявить присутствие генов, связанных с вирулентностью микроорганизма, что необходимо для оценки патогенного потенциала штаммов. Метод так же даёт возможность определить наличие генов устойчивости к антибиотикам, что имеет значение для выбора эффективной терапии.

Использование данных молекулярно-генетического тестирования специалистами птицефабрик является необходимым элементом для понимания патогенеза инфекций, распространения устойчивости к антибиотикам, обеспечения биобезопасности человечества и предотвращения вспышек заболевания колибактериозом.

Литература

1. Гильмиярова Ф.Н., Колотьева Н.А., Гусякова О. А., Сидорова И. Ф. Полимеразная цепная реакция. История открытия. Новый этап развития // Ремедиум Приволжье. 2017. №4 (154)
2. Пospelова Ю.С., Старич Э.М., Кузнецова М.В. Возбудители колибактериоза сельскохозяйственной птицы — носители генов, ассоциированных с вирулентностью экстраинтестинальных и кишечных *Escherichia coli* // Сельскохозяйственная биология. — 2022. — № 2. — С. 356-370.