

УДК 636.09

ДЕТЕКЦИЯ ГЕНА МАКРОЛИДФОСФОРИЛАЗЫ В КИШЕЧНОМ СОДЕРЖИМОМ СВИНЕЙ

Черепушкина В. С. — мл. науч. сотр., сектор молекулярной биологии, Толстых Н. А. — ст. науч. сотр., лаборатория болезней птиц, Афонюшкин В. Н. — заведующий сектором молекулярной биологии, Миронова Т. Е. — младший научный сотрудник, сектор молекулярной биологии (Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН)

Ключевые слова: свиноводство, птицеводство, антибиотикорезистентность, макролид фосфорилаза, полимеразная цепная реакция
Key words: pig breeding, poultry farming, antibiotic resistance, macrolide phosphorylase, polymerase chain reaction



РЕФЕРАТ

Рост и развитие сельскохозяйственного производства сдерживают инфекционные болезни и как следствие связанные с ними экономические убытки. Для предотвращения возникновения инфекционных заболеваний широко используют антибиотики. Их бесконтрольное применение влечет за собой появление новых антибиотикорезистентных штаммов бактерий. Определяющим фактором резистентности бактерий к макролидной группе антибиотиков является ген макролид фосфорилазы (MphA). Он встречается в составе генома бактерий семейства Enterobacteriaceae. Наличие в продуктах питания гена MphA в долгосрочной перспективе может отрицательно сказаться на здоровье нации в связи с выработкой у людей устойчивости к макролидным антибиотикам. В связи с этим, современное сельскохозяйственное производство нуждается в простых и массовых методах определения антибиотикорезистентности микроорганизмов. В связи с этим целью исследования являлась разработка полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для возможности мониторинга гена MphA в кишечном содержимом свиней и птицы.

Материалом для исследования послужили пробы фекалий (80 образцов) от поросят в возрасте 40-50 дней. Выделение ДНК традиционным силико-сорбционным методом. Подбор олигонуклеотидных праймеров проводили при помощи программы IDT Oligo Analyzer. Постановку ПЦР-РВ проводили на амплификаторе BioRad CFX96 Real-Time PCR-System. В результате проведенных исследований было выявлено 30% положительных проб. При этом, пороговый цикл реакции варьировал от 36 Ct до 42Ct. Этот факт доказывает высокое распространение гена макролид фосфорилазы в кишечном содержимом у свиней и птицы на сельскохозяйственных предприятиях РФ. Однако копияность искомого гена, по нашим данным, оказалась весьма не высокой.

Исходя из полученных данных и анализа литературы мы считаем, что проблему антибиотикорезистентности необходимо решать комплексно путем специфической и неспецифической профилактики инфекционных болезней. К специфической профилактике относится широкое применение бактериофагов и аутогенных вакцин. К неспецифической профилактике относится применение пребиотиков, пробиотиков, серебросодержащих препаратов.

ВВЕДЕНИЕ

Возможности развития современного сельскохозяйственного производства, а именно свиноводства, существенно сдерживают бактериальные инфекции. Инфекционные заболевания наносят значительный экономический ущерб и являются серьезной проблемой ветеринарной практики. Цикличность сельскохозяйственного производства приводит к персистенции бактерий и появлению инфекций, устойчивых к химиотерапевтическим препаратам. Антибиотикорезистентность порождает проблему выбора эффективного и безопасного препарата для фармакопрофилактики инфекционных болезней животных [1].

Проблему антибиотикорезистентности усугубляет недостаточный контроль за использованием антимикробных препаратов в ветеринарии. Применение антибиотиков в свиноводстве в качестве добавки в корм, а так же в профилактических целях является общепринятой практикой в нашей стране и, как известно, приводит к повышению уровня резистентности микроорганизмов [5]. В настоящее время во всем мире идет поиск альтернативных подходов к терапии инфекционных заболеваний. Из этой проблемы вытекает вопрос о безопасности продукции свиноводства которую необходимо рассматривать в контексте наличия мобильных генетических детерминант антибиотикорезистентности в составе пищевых продуктов. Одной из таких генетических детерминант является ген макролид фосфоорилазы (MphA). Он встречается в составе генома бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и обеспечивает устойчивость к антибиотикам макролидного ряда, путем их ферментативной модификации [2]. Сельскохозяйственные животные, в частности свиньи, являются резервуаром антибиотикорезистентных бактерий таких как *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecium* (VRE) и др [3]. Данные бактерии имеют способность к горизонтальной передаче генов антибиотикорезистентности, в

частности гена MphA, что является серьезной проблемой в борьбе с распространением антибиотикоустойчивых штаммов бактерий [4]. Наличие в продуктах питания гена MphA в долгосрочной перспективе может отрицательно сказаться на здоровье нации в связи с выработкой у людей устойчивости к макролидным антибиотикам. В настоящее время тесты на выявления гена макролидфосфоорилазы не разработаны. В связи с этим, современное сельскохозяйственное производство нуждается в простых и массовых методах определения антибиотикорезистентности микроорганизмов. Массовое использование таких тестов поможет в короткие сроки выявлять

Цель исследования: Выявление и профилактика заноса гена макролидфосфоорилазы в кишечном содержимом свиней при помощи полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ)

Задачи исследования:

Разработка полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для детекции гена MphA в кишечном содержимом свиней

Определение распространения гена макролидфосфоорилазы в популяции свиней

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили пробы фекалий (80 образцов) от поросят в возрасте 40-50 дней из двух хозяйств промышленного содержания. Пробы отбирали от поросят в период развития послеотъемного диарейного синдрома, разделяли на две группы в соответствии с их клиническим статусом – больные и здоровые. Пробы консервировали добавлением пяти объемов 96% этилового спирта и доставляли в лабораторию при температуре 0°C. Для выделения ДНК использовали по 100 мкг каждого образца.

Выделение ДНК производили традиционным силико-сорбционным методом с использованием коммерческого набора «ДНК-сорб» производства ФГУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора.

Таблица 1

Программа реакции

Этап	Температура, °С	Число циклов	Время, с
1	95	1	Пауза
2	95	45	15
	65,5	45	25
	72	45	25

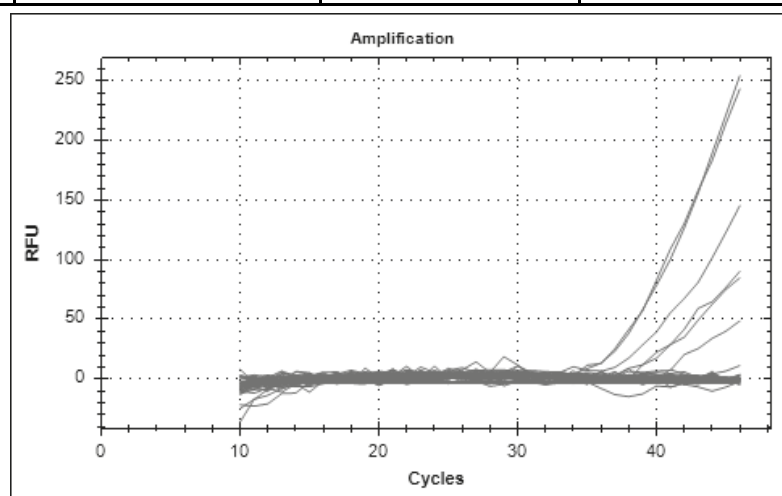


Рис.1. Кривые роста флуоресценции в ПЦР-РВ на наличие гена *MphA* в кишечном содержимом свиней

Подбор олигонуклеотидных праймеров проводили при помощи программы IDT Oligo Analyzer.

Реакцию ПЦР-РВ проводили на амплификаторе BioRad CFX96 Real-Time PCR-System.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для проведения реакции нами были разработаны олигонуклеотидные праймеры со следующей структурой: P1 - 5'-aatgctcaagaatcgctgc-3', P2 - 5'-aaatctggccacgacgaatc-3, а также Taqman-зонд со структурой: Fam-cgtgcctatccccatgctcgaaga-bhq1. Используемые праймеры обладают специфичностью и чувствительностью 10 копий ДНК гена макролидфосфорилазы на реакцию.

Состав реакционной смеси: 60 mM Tris-HCl (pH 8.5 при 25°C); 1,5 mM MgCl₂; 25 mM KCl; 10 mM 2-меркаптоэтанол; 0,1% Тритон X-100, 0,3 мкМ праймеров, 0,1 мкМ концентрация Taqman зонда, 1 ед HS-Taq-ДНК полимеразы (Биолабмикс), 0,2 mM dNTP.

Реакцию проводили в объеме 25 мкл по программе указанную в таблице 1.

Реакцию ПЦР-РВ проводили на амплификаторе BioRad CFX96 Real-Time PCR-System. Детектирование сигнала производили на канале Hex. Результаты исследований иллюстрирует рис.1.

При тестировании проб кишечного содержимого методом ПЦР-РВ было выявлено, что 30% являются положительными. При этом, пороговый цикл реакции варьировал от 36 Ct до 42Ct.

Этот факт доказывает высокое распространение гена макролид фосфорилазы в кишечном содержимом у свиней и птицы на сельскохозяйственных предприятиях РФ. Однако копияность искомого гена, по нашим данным, оказалась весьма не высокой.

ВЫВОДЫ

1. Разработана (ПЦР-РВ) для детекции гена MphA в кишечном содержимом свиней;

2. В результате исследований выявлено, что 30% исследованной популяции свиней имеют ген MphA.

Практические предложения

По нашему мнению, борьба с антибиотикорезистентностью на крупных сельскохозяйственных предприятиях должна включать меры по предотвращению и накоплению генов антибиотикорезистентности, таких как ген макролид фосфорилаза. Мы считаем, что для профилактики и лечения инфекционных болезней животных и птицы необходимо широко использовать средства специфической профилактики, такие как аутогенные вакцины, бактериофаги. В данной ситуации вакцинация может служить инструментом для решения проблемы устойчивости к антибиотикам. В отличие от антибиотиков, вакцина создает специфический иммунитет. Кроме того, на применение вакцины не вырабатывается резистентность. Исходя из этого разработка и внедрение в производство аутогенных вакцин, по нашему мнению, является одной из перспективных задач современной науки. Также перспективным направлением в борьбе с инфекциями могут служить применение бактериофагов, их компонентов.

Кроме внедрения в сельскохозяйственное производство препаратов для специфической профилактики (бактериофаги, аутогенные вакцины) для сдерживания антибиотикорезистентности, возможно применение препаратов для не специфической профилактики таких как пребиотики, пробиотики, лакто и бифидобактерии, препараты содержащие ионы серебра. То есть препараты, которые будут бороться с патогенной микрофлорой в

кишечнике, не проникая в кровоток и не оказывая системного действия на организм.

Detection of the macrolide phosphorylase gene in the intestinal contents of pigs.
Cherepushkina V.S.- Junior Researcher, sector of molecular biology , Tolstykh N.A. - Senior Researcher, laboratory of the disease birds , Aphonuskin V.N.- Head of the Molecular Biology Sector, sector of molecular biology , Mironova T.O.- Junior Researcher, sector of molecular biology

ABSTRACT

The growth and development of agricultural production is restricted by infectious diseases and, as a consequence, leads to the associated economic losses. Antibiotics are widely used to prevent the occurrence of infectious diseases. Their uncontrolled use entails the emergence of new antibiotic-resistant bacterial strains. The determining factor of bacterial resistance to the macrolide group of antibiotics is the macrolide phosphorylase (MphA) gene. It is found in the genome of bacteria of the Enterobacteriaceae.

The presence of the MphA gene in food in the long term can adversely affect the health of the nation due to the development of resistance to macrolide antibiotics in people. In this regard, modern agricultural production requires simple and massive methods for determining the antibiotic resistance of microorganisms. In this regard, the aim of the study was to develop a real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) for the possibility of monitoring the MphA gene in the intestinal contents of pigs and poultry. Samples of feces (80 samples) from pigs aged 40-50 days served as the material for the study. Isolation of DNA by traditional silico-sorption method were used. The selection of oligonucleotide primers was performed using the IDT Oligo Analyzer software. RT-PCR was set up on a BioRad CFX96 Real-Time PCR-System. As a result of the research, 30% of positive samples were identified. At the same time, the threshold reaction cycle varied from 36 Ct to 42Ct. This fact proves the high distribution of the macrolide phosphorylase gene in the intestinal contents of pigs and poultry at agricultur-

al enterprises in the Russian Federation. However, according to our data, the number of copies of the desired gene was not very high. Based on the data obtained and the analysis of the literature, we believe that the problem of antibiotic resistance must be solved in a complex way through specific and non-specific prevention of infectious diseases. Specific prophylaxis includes the widespread use of bacteriophages and autogenous vaccines. Non-specific prophylaxis includes the use of prebiotics, probiotics, and silver-containing preparations.

ЛИТЕРАТУРА

1. Teppo Hiltunen, M. V. Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective / M. V. Teppo Hiltunen // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 2017. - №372(1712):20160039.
2. Sohyun Cho. Characterization of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolated from a Mixed-Use Watershed in Northeast Georgia, USA / Sohyun Cho // *Int J Environ Res Public Health.* – 2019. - №16(19):3761.
3. Субботин, В.В. Антибактериальная терапия в ветеринарной практике / В.В. Субботин // *VetPharma.* – 2011. - №4. – С. 38-42.
4. Yanyan Liu. Prevalence of Plasmid-Mediated Determinants With Decreased Susceptibility to Azithromycin Among *Shigella* Isolates in Anhui, China / Yanyan Liu // *Front Microbiol.* – 2020. - №11:1181
5. Симджи, Ш. Рациональное применение антибиотиков в животноводстве и ветеринарии / Клинический микробиологический журнал // Ш. Симджи. – 2016. - № 18 (3):186-90

ИНФОРМАЦИЯ

По заявкам ветспециалистов, граждан, юридических лиц проводим консультации, семинары по организационно-правовым вопросам, касающихся содержательного и текстуального анализа нормативных правовых актов по ветеринарии, практики их использования в отношении планирования, организации, проведения, ветеринарных мероприятий при заразных и незаразных болезнях животных и птиц.

Консультации и семинары могут быть проведены на базе Санкт-Петербургского государственного университета ветеринарной медицины или с выездом специалистов в любой субъект России.

**Тел/факс (812) 365-69-35,
Моб. тел.: 8(911) 176-81-53, 8(911) 913-85-49**