

**ЧАСТОТА ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ (ESBL) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ОБНАРУЖЕНИЯ КОММЕНСАЛЬНЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ В ФЕКАЛИЯХ**

Н.Н. Кукалевская, М.А. Сабанаев

ФГБОУ ВО Северный государственный медицинский университет, г. Архангельск, Россия

Кафедра клинической биохимии, микробиологии и лабораторной диагностики

Научный руководитель – д.м.н., профессор Т.А. Бажукова

**Резюме.**

**Введение.** Кишечная микробиота является ключевым резервуаром генов антибиотикорезистентности (АБР). Цель исследования – предположить зависимость частоты выявления генов АБР от наличия комменсальных энтеробактерий в фекалиях. Материалы и методы. Обследовано 70 человек 18–45 лет без антибиотикотерапии в анамнезе. Детекция энтеробактерий проводилась культуральным методом и ПЦР (полимеразная цепная реакция). Гены  $\beta$ -лактамаз в фекалиях (ESBL, карбапенемазы) выявляли методом ПЦР с использованием тест-системы «Бакрезиста GLA».

**Результаты.** Методом ПЦР комменсальные энтеробактерии были выявлены в 37,1% случаев, наиболее часто – *Enterobacter spp.* (24,3%). Культуральным методом энтеробактерии выделены в 15,7% случаев, преобладала *Klebsiella pneumoniae* (10%). Чаще всего был обнаружен ген *tem* – 40% случаев, а *ctx-M-1* и *shv* с частотой 14,2% и 15,7% соответственно. Наличие данных  $\beta$ -лактамаз в фекалиях позволяет предположить, что выделенные представители комменсальных энтеробактерий могли быть источником данных генов. Карбапенемаза *oxa-51-like* была выявлена в 2,8% случаев, которая соотносилась с *K. pneumoniae*, идентифицированной двумя методами.

**Выводы.** Комменсальные энтеробактерии, в частности *Enterobacter spp.* и *K. pneumoniae*, выявляемые в кишечнике здоровых лиц, являются значимым резервуаром генов ESBL, что представляет риск для общественного здоровья и требует постоянного мониторинга.

**Ключевые слова:** антибиотикорезистентность, ESBL, бета-лактамазы, энтеробактерии, толстая кишка, ПЦР

UDC 615.281.9, 579.61

**FREQUENCY OF DETECTION OF ANTIBOTIC RESISTANCE GENES (ESBL) DEPENDING ON THE DETECTION OF COMMENSAL ENTEROBACTERIA IN FECALES**

N.N. Kukalevskaya, M.A. Sabanaev

Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia

Department of Clinical Biochemistry, Microbiology, and Laboratory Diagnostics

Supervisor – MD, Professor T.A. Bazhukova

**Abstract:**

**Introduction.** The intestinal microbiota serves as a key reservoir of antibiotic resistance genes (ARGs). The aim of this study was to investigate the potential correlation between the detection frequency of ARGs and the presence of commensal Enterobacteriaceae in fecal samples.

**Materials and Methods.** A total of 70 individuals aged 18–45 years, with no prior history of antibiotic therapy, were enrolled in the study. Detection of Enterobacteriaceae was performed using both culture-based methods and polymerase chain reaction (PCR). Genes encoding  $\beta$ -lactamases (including ESBLs and carbapenemases) in fecal samples were identified via PCR using the «Bakrezista GLA» test system.

**Results.** PCR analysis revealed the presence of commensal *Enterobacteriaceae* in 37.1 % of samples, with *Enterobacter spp.* being the most frequently detected (24.3 %). Culture-based methods identified *Enterobacteriaceae* in 15.7 % of cases, with *Klebsiella pneumoniae* being predominant (10 %). The *tem* gene was the most commonly detected  $\beta$ -lactamase gene, present in 40 % of samples. The *ctx-M-1* and *shv* genes were detected at frequencies of 14.2 % and 15.7 %, respectively. The presence of these  $\beta$ -lactamase genes in fecal samples suggests that the isolated commensal Enterobacteriaceae may serve as a source of these resistance genes.

The carbapenemase gene *oxa-51-like* was detected in 2.8 % of samples, and its presence correlated with *K. pneumonia* isolates identified by both detection methods.

Conclusions. Commensal *Enterobacteriaceae*, particularly *Enterobacter* spp. and *K. pneumoniae*, detected in the intestines of healthy individuals, represent a significant reservoir of ESBL genes. This finding poses a public health risk and underscores the need for continuous monitoring.

**Keywords:** antibiotic resistance, ESBL,  $\beta$ -lactamases, *Enterobacteriaceae*, colon, PCR

**Введение.** Проблема антибиотикорезистентности представляет собой одну из наиболее острых проблем современной медицины, при этом особую тревогу вызывает распространение резистентных штаммов среди представителей порядка *Enterobacteriales*, которые являются частыми возбудителями как внутрибольничных, так и внебольничных инфекций. Существенное значение приобретает кишечная микрофлора, выступающая в качестве дополнительного резервуара генов устойчивости к антимикробным препаратам. Фекальные образцы представляют собой ценный материал для исследования циркуляции генов, поскольку позволяют отслеживать динамику распространения генов резистентности, выявлять маркеры устойчивости проблемных возбудителей и оценивать риски горизонтального переноса генов. Особую значимость в этом процессе имеют комменсальные представители микробиоты толстой кишки, обладающие высокой способностью к горизонтальному переносу генов устойчивости посредством конъюгации, трансдукции и трансформации, а также обмен плазмидами [1]. Постоянный мониторинг резистентности необходим для своевременного выявления новых механизмов устойчивости, оценки эффективности используемых антимикробных препаратов, разработки стратегий по сдерживанию распространения резистентных штаммов оптимизации схем антибиотикотерапии и поиском новых способов лечения.

Особую озабоченность вызывает способность бактерий семейства *Enterobacteriaceae* к быстрой адаптации и формированию множественной лекарственной устойчивости, что существенно осложняет лечение инфекционных заболеваний и требует комплексного подхода к решению проблемы антибиотикорезистентности. Изучение фекальных образцов позволяет не только выявлять резервуары генов устойчивости, отслеживать динамику распространения резистентности, но и оценивать риски появления новых механизмов устойчивости, что крайне важно для разработки эффективных мер по контролю резистентности [2]. Такой подход открывает новые перспективы в понимании механизмов формирования и распространения антибиотикорезистентности, что имеет фундаментальное значение для современной медицины и здравоохранения в целом [3].

**Цель** - провести анализ зависимости частоты встречаемости генов резистентности к антимикробным препаратам в фекалиях и обнаружения комменсальных энтеробактерий.

**Материалы и методы.** Материалом для исследования генов устойчивости к антимикробным препаратам были фекалии. Выборку (n=70) составили лица молодого возраста (от 18 до 45 лет), проживающие на территории г. Архангельска. Обследуемые подписали добровольное информирование согласие на участие в исследовании. Участники не принимали антибактериальные препараты за последние 3 месяца до забора материала для исследования. Выделение представителей семейства *Enterobacteriaceae* были обнаружены 2 методами: культуральным и молекулярно-генетическим (ПЦР). Посев осуществлялся на питательную среду Эндо, идентификация возбудителей производилась на масс-спектрометре BactoScreen (Литех, Россия). Детекция представителей комменсальных энтеробактерий ПЦР производилась с помощью набора реагентов "Коленофлор-премиум" (Альфа-лаб, Россия). Гены устойчивости также были обнаружены методом ПЦР с помощью набора реагентов "Бакрезиста GLA" (ДНК-технологии, Россия). Данный набор позволяет определить 14 генов, ESBL (ctx-M-1, tem, shv) и карбапенемазы (oxa-51-like, oxa-23-like, oxa-48-like, oxa-40-like, imp, vim, kpc, ndm, ges).

## Результаты

Комменсальные представители семейства *Enterobacteriaceae* были обнаружены в 37,1% случаев методом ПЦР. *Enterobacter* spp методом ПЦР был обнаружен в 24,3 % случаев, среднее количество составило – 5,7 lg KOE/г. В 1,4% случае была выявлена ассоциация *Enterobacter* spp с *Citrobacter* spp, 2,8% случаев – *Klebsiella pneumoniae*. С равной частотой 5,7% были выделены *Klebsiella pneumoniae* и *Citrobacter* spp: средняя численность составила 5,8 lg KOE/г и 5,2 lg KOE/г

соответственно. *Klebsiella oxytoca* была выделена в 1,4% в численности 4,9 lg КОЕ/г. На рисунке 1 представлены выделенные гены устойчивости antimикробным препаратам и наличия комменсальных энтеробактерий в материале обследуемых. Чаще всего был обнаружен ген tem – 40% случаев, а ctx-M-1 и shv с частотой 14,2% и 15,7% соответственно. Карбапенемаза oxa-51-like была выявлена в 2,8% случаев.

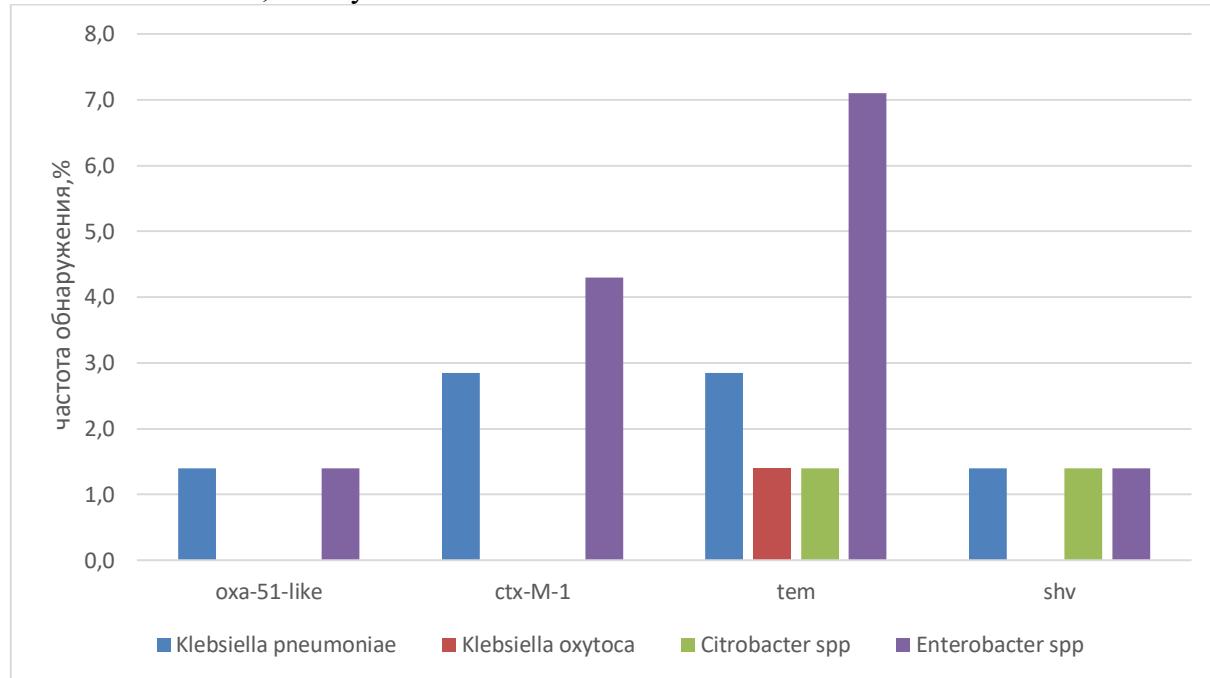


Рисунок 1. Частота обнаружения генов антибиотикорезистентности с учетом детекции комменсальных энтеробактерий, обнаруженных методом ПЦР.

При анализе выделения энтеробактерий культуральным методом были выделены комменсальные энтеробактерии в 15,7% случаев: *Klebsiella pneumoniae* – у 10%, *Klebsiella oxytoca* – 2,8%, *Citrobacter freundii* – 2,8%; *Citrobacter amalonaticus* и *Enterobacter hormaechei* были выделены вместе в 1,4% случаев.

Выявленные гены устойчивости к antimикробным препаратам и комменсальные энтеробактерии представлены на рисунке 2. Обнаруженные гены AP соотносились с тремя видами энтеробактерий, идентифицированных культуральным методом: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* и *Citrobacter freundii*.

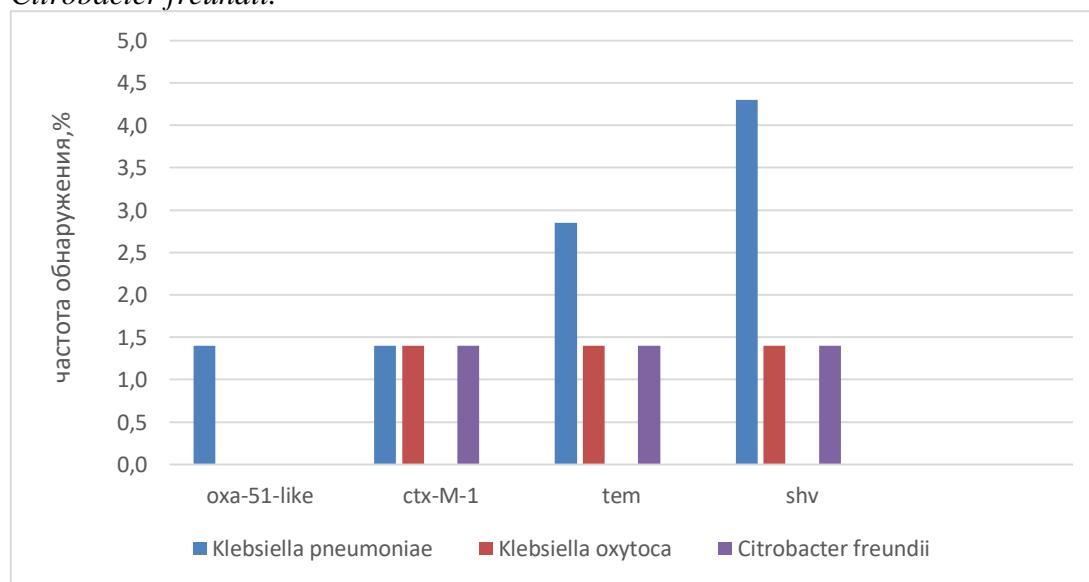


Рисунок 2. Частота обнаружения генов антибиотикорезистентности с учетом детекции комменсальных энтеробактерий, обнаруженные культуральным методом.

## Обсуждение

Использование ПЦР и культурального методов позволило получить комплексную картину, выявив как таксономическое разнообразие семейства *Enterobacteriaceae*, так предположить спектр генов устойчивости у выделенных представителей.

Частота обнаружения *Enterobacter spp.* и *K. pneumoniae* коррелирует с наличием у данных представителей генов широкого спектра устойчивости (oxa-51-like, ctx-M-1, tem, shv). Наиболее распространенными бета-лактамазами у грамотрицательных бактерий являются tem, а ген shv, относящийся к бета-лактамазам расширенного спектра, в большей степени ассоциирован с *K. pneumoniae*. Этот профиль полностью соответствует глобальному тренду, согласно которому *K. pneumoniae* является одним из основных возбудителей нозокомиальных инфекций с множественной лекарственной устойчивостью. Также широкая распространенность этих генов среди энтеробактерий в популяции здоровых лиц молодого возраста свидетельствует об циркуляции плазмид, несущих эти гены, во внебольничной среде. Это подтверждает гипотезу о том, что комменсальная микробиота кишечника играет ключевую роль как в поддержании, так и в распространении генов ESBL среди популяций бактерий [4].

Значительное расхождение в частоте детекции комменсальных энтеробактерий между ПЦР (37,1%) и культуральным методом (15,7%) подчеркивает комплементарность этих подходов. Более высокая чувствительность ПЦР может быть связана с детекцией ДНК нежизнеспособных микроорганизмов, что делает ее ценным инструментом для скрининговых исследований. В то же время, культуральный метод остается "золотым стандартом" для получения чистых культур, необходимых для определения фенотипической резистентности и эпидемиологического мониторинга [5, 6].

## Выводы

Наиболее часто выявляемым представителем семейства *Enterobacteriaceae* у обследованной группы людей по данным ПЦР исследования был *Enterobacter spp* в 24,3 % случаев. При наличии данного микроорганизма выявлялось большее число генов устойчивости к антимикробным препаратам (4 гена). При культуральном исследовании чаще всего регистрировались *Klebsiella pneumoniae* – в 10 % случаев, наличие которого также сочеталось с регистрацией большей частоты обнаружения генов резистентности (4 гена). Полученные результаты могут свидетельствовать о возможном развитии полирезистентности выявленных микроорганизмов.

## Список литературы

1. Anthony W.E., Burnham C.D., Dantas G., Kwon J.H. The Gut Microbiome as a Reservoir for Antimicrobial Resistance. *J Infect Dis.* 2021; 223(12):209-S213. doi:10.1093/infdis/jiaa497
2. Bush, K. Epidemiology of  $\beta$ -Lactamase-Producing Pathogens / K. Bush, P. A. Bradford // Clinical Microbiology Reviews. — 2 Newton — 2020. — Vol. 33, No. 2. — DOI: 10.1128/CMR.00047-19
3. Bar Ilan, M. Who should be screened for carbapenemase-producing Enterobacteriales and when? A systematic review / M. Bar Ilan, A. Kjerulf // The Journal of Hospital Infection. — 2023. — Vol. 142. — P. 74–87. — DOI: 10.1016/j.jhin.2023.09.018.
4. Castanheira, M. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection / M. Castanheira, P. J. Simner, P. A. Bradford // Journal of Antimicrobial Chemotherapy: Antimicrobial Resistance. — 2021. — Vol. 3, No. 3. — Art. dlab092. — DOI: 10.1093/jacamr/dlab092.
5. Корнишева, А. В. Сравнение возможностей культурального метода и ПЦР-РВ в реальном времени для количественной оценки энтеробактерий и стафилококков в образцах фекалий детей / А. В. Корнишева, А. Е. Кейних, Д. О. Корнилов [и др.] // Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения : сб. ст. IX Междунар. науч.-практ. конф. молодых учёных и студентов (17–18 апреля 2024 г.). — Екатеринбург, 2024. — Т. 2. — С. 44–51.
6. Ricchi, M. Comparison among the Quantification of Bacterial Pathogens by qPCR, dPCR, and Cultural Methods / M. Ricchi, C. Bertasio, M. B. Boniotti, N. Vicari, S. Russo, M. Tilola, M. A. Bellotti // Frontiers in Microbiology. — 2017. — Vol. 8. — Art. 1174. — DOI: 10.3389/fmicb.2017.01174.