

**Резистентность к фторхинолонам в микробиомах птицеводческих
предприятий**

Resistance to fluoroquinolones in poultry microbiomes

А.Г. Исаева¹, А.С. Кривоногова², Е.А. Логинов², И.М. Донник¹

¹ФГБОУ ВО «Уральский государственный аграрный университет»

²ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский
центр Уральского отделения Российской академии наук»

E-mail: tel-89826512934@yandex.ru

Аннотация

Исследовали фенотипическую и генетическую резистентность условно-патогенной микрофлоры из микробиомов объектов птицеводства к энрофлоксацину, ципрофлоксацину и офлоксацину. Были обнаружены генетические детерминанты устойчивости СТХ к фторхинолонам, цефалоспорином и карбапенемам. Полученные результаты свидетельствовали о высоком уровне резистентности клебсиелл и синегнойной палочки к антибиотикам фторхинолонового ряда.

Ключевые слова: фторхинолоны, антибиотикорезистентность, птицеводство, условно-патогенная микрофлора.

Summary

Resistance of opportunistic pathogenic microflora from microbiomes of poultry facilities to enrofloxacin, ciprofloxacin and ofloxacin was studied. Genetic determinants of CTX resistance to fluoroquinolones, cephalosporins and carbapenems were found. The results showed a high level of resistance of *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* to fluoroquinolone antibiotics.

Keywords: fluoroquinolones, antibiotic resistance, poultry production, opportunistic pathogenic microflora.

Введение

Возникновение устойчивости к антибиотикам является естественным процессом адаптации бактерий. Чрезмерное, нерациональное и неправильное использование противомикробных препаратов ускоряет возникновение резистентности [3]. Наиболее значимыми для распространения антимикробной резистентности (АМР) являются два основных фактора – контаминация продуктов животноводства агентами резистентности и обмен генетическим материалом между штаммами разных популяций бактерий в пределах общих микробиоценозов. [1,4,8] Внутри любого микробиоценоза существуют условия для перехода генетического материала между штаммами и видами, обусловленные плазмидным переносом, трансдукцией бактериофагами и естественной трансформацией внеклеточной ДНК [5]. Микробные сообщества животноводческих и птицеводческих объектов очень variabelны, сложны и разнообразны. В них при постоянном контакте с антибиотиками в нетерапевтических, не ингибирующих дозах, создаются оптимальные условия для формирования резистентных популяций бактерий [4]. Это проявляется циркуляцией устойчивых микроорганизмов, распространением генов резистентности (ARG) в микробиомах и контаминацией продукции резистентными штаммами [6,7]. Кроме того, происходит обмен мобильными генетическими элементами между бактериями животноводческих и человеческих микробиомов [7]. В настоящее время выявлено несколько десятков основных генетических детерминант антибиотикорезистентности, встречающихся у бактерий и обуславливающих устойчивость к пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам, фторхинолонам, ванкомицину, тетрациклинам [5,9,7].

Антибиотики этих классов широко применяются в ветеринарии и зоотехнии, несмотря на растущий уровень АМР. В 2017 Всемирная организация здравоохранения опубликовала перечень бактерий, для борьбы с которыми срочно требуется создание новых антибиотиков. В него, помимо

прочих, вошли резистентные к фторхинолонам энтеробактерии, которые часто встречаются в животноводческих микробиоценозах [3]. Устойчивость бактерий к фторхинолонам начала стремительно увеличиваться с середины 1990-х годов почти у всех грамположительных и грамотрицательных видов бактерий, причем минимальные концентрации (МИК), ингибирующие 90% изученных штаммов, варьировали в широком диапазоне [5]. Фторхинолоны являются единственным классом antimicrobных препаратов клинического применения, которые напрямую подавляют процессы синтеза ДНК восприимчивых бактерий. Фторхинолоны ингибируют бактериальные ДНК-гиразу и четвёртый тип топоизомераз, участвующих в репликации нуклеиновых кислот. Они образуют тройной комплекс топоизомераза-хинолон-ДНК, что впоследствии приводит к образованию двухцепочечных разрывов в ДНК и блокирует развитие ферментного комплекса репликации ДНК [2]. Резистентность к фторхинолонам появляется при мутации участков генома, кодирующих структуру субъединиц четвертого типа топоизомераз и ДНК-гиразы (реализуется механизм изменения мишени антибиотика), которые регулируют экспрессию насосов оттока цитоплазматической мембраны или белков, образующих диффузионные каналы внешней мембраны (изменение механизма проникновения) [2].

Появление резистентности к фторхинолонам в популяции бактерий приводит к быстрому, в течение 1-2 лет, распространению АМР по микробиоценозам смежных экологических ниш за счет горизонтального переноса генов [5]. Опасность этого процесса усиливается еще и тем, что борьба с бактериальными заболеваниями домашней птицы часто основывается на использовании антибиотикопрофилактики, значительно ускоряющей формирование резистентности. В случае контаминации птицеводческого микробиома генами резистентности к ципрофлоксацину, развитие АМР ожидаемо приведет к потере эффективности антибиотиков всего хинолонового ряда за счет развития перекрестной устойчивости в течение нескольких лет. [6,9]. Для предотвращения распространения АМР

необходим поиск новых подходов в технологии птицеводства, исключающих применение антибиотиков для стимуляции роста и продуктивности, например, с заменой их на фитобиотические препараты, а также постоянный мониторинг состояния АМР микробиомов в птицеводстве [4,10]. В связи с вышесказанным, целью исследования был анализ резистентности условно-патогенных микроорганизмов из микробиомов объектов птицеводства к антибиотикам фторхинолонового ряда.

Материалы и методы

Исследования проводили на базе ФГБОУ ВО «Уральский ГАУ» и ФГБНУ «УрФАНИЦ УрО РАН» в 2018-2021гг. Объектом исследования являлись микробиомы птицеводческих предприятий мясного и яичного профиля Свердловской области. Предмет исследования – резистентность условно-патогенных микроорганизмов к антибиотикам фторхинолонового ряда.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 18-16-00040).

Для исследования состава микробиомов отбирали смывы и образцы биоматериала в различных точках технологических помещений, где содержалась продуктивная птица, смывы из клоаки, со слизистых оболочек и кожи птиц. Биоматериал отбирали в стерильные контейнеры или Swab-системы с соблюдением правил забора биоматериала для микробиологического исследования. В лабораторных условиях выполняли пробоподготовку, затем стерильной калиброванной петлёй 10 мкл высевали на плотные питательные среды методом истощающего штриха. Чашки Петри термостатировали в аэробных условиях при температуре $37^{\circ}\pm 1$ С; чашки с кровяным и шоколадным агаром - в 5% CO₂ атмосфере. Для культивирования, дифференцирования и идентификации использовали среды: Эндо, Левина, Олькеницкого, Плоскирева, МПА, ЖСА, среду с сорбитом, шоколадный, кровяной, хромогенный агар. Среду Сабуро с 2% глюкозы и хлорамфениколом, среду Симмонса, агар Мюллера-Хинтон.

Оценку микроорганизмов проводили через 24, 48, 72 часа.

Идентификацию выросших колоний производили классическими микробиологическими методами и методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (время пролетная матрично-ассоциированная лазерная десорбционная ионизационная масс-спектрометрия) на приборе Vitek MS (BioMerieux, пр-во Франция). Считывали прибором масс-спектры рибосомальных белков и сравнивали с базой данных с использованием программного обеспечения MuLa.

Определение фенотипической антибиотикочувствительности выделенных изолятов проводили в соответствии с МУК 4.2.1890-04 методом диффузии с использованием агара Мюллера-Хинтон (Bio-Rad, Франция) и дисков, импрегнированных антибиотиками ципрофлоксацином, офлоксацином, энрофлоксацином в дозе 5 мкг (Bio-Rad, Франция). В ряде случаев определяли минимальную подавляющую концентрацию референтным методом последовательных микроразведений разведений в бульоне в соответствии инструкциями к тест-системам.

Для анализа контаминации микробиомов генами резистентности проводили анализ культур с помощью ПЦР в соответствии с инструкциями к тест-наборам. ПЦР проводили в режиме Real-Time PCR с применением анализатора Applied Biosystems QuantStudio 5 (Applied Biosystems, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартного пакета анализа Microsoft Excel. Анализ отдельных массивов данных выполняли в программе Statistica 10.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что соотношение выделенных микроорганизмов было относительно постоянным на всех обследованных объектах птицеводства. Родовидовой состав характеризовался разнообразием микрофлоры, с преобладанием следующих условно-патогенных микроорганизмов: *K. pneumoniae* (рисунок 1), *E. faecium*, *S. aureus*, *P.*

aeruginosa и *E. coli* (рисунок 2), реже выявляли *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., плесневые грибы и дрожжи. По частоте встречаемости в образцах биоматериала доля этих микроорганизмов суммарно составляла, в зависимости от вида пробы, более 95-99% от всех выделенных изолятов.



Рисунок 1 - Культура *Klebsiella pneumoniae* на хромогенном агаре, выделенная из подстилки (при напольном содержании бройлеров)

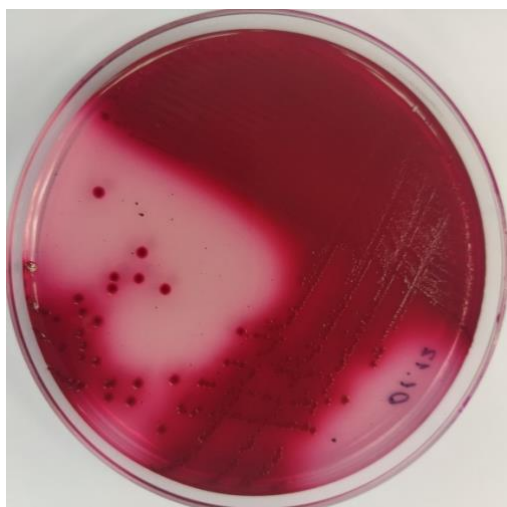


Рисунок 2 - Чистая культура *Escherichia coli* на агаре Эндо, выделенная из смывов с клоаки 10-суточных цыплят.

Значительно реже высеивали *Acinetobacter* spp. (в т.ч. – *A.baumannii* *A. radioresistens*), *Pseudomonas putida*, *Lactobacillus* spp., *Providencia stuartii*, *Streptococcus infantarius*, другие виды *Staphylococcus* (в т.ч. *S. sciuri* и *S. xylosus*), а так же *Brevibacterium luteolum*. На долю этих микроорганизмов приходилось, в среднем, от 0,6% до 5,0%

Исследование антибиотикочувствительности. Для анализа были выбраны изоляты бактерий, встречающихся в пробах наиболее часто - *K. pneumoniae*, *E. faecium*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*. Было установлено, что соотношение чувствительных и резистентных к фторхинолонам (ципрофлоксацину, энрофлоксацину и офлоксацину) изолятов одного вида варьировало в зависимости от места отбора и вида биоматериала, профиля предприятия, однако в среднем доля резистентных микроорганизмов была достаточно высокой (таблица 1). Из пяти видов микроорганизмов только у одного (*E.coli*) не выявили резистентности к фторхинолонам. Остальные виды проявляли фенотипическую резистентность, что указывало на наличие детерминант резистентности в популяциях.

Таблица 1 – Резистентность к фторхинолонам у микроорганизмов, выделенных из биоматериала, отобранного на птицеводческом объекте.

Вид микроорганизма	Всего (n)	Чувствительные изоляты		Резистентные изоляты	
		количество	доля	количество	доля
<i>K. pneumoniae</i>	25	4	16%	21	84%
<i>E. faecium</i>	26	19	73%	7	27%
<i>S. aureus</i>	17	7	41%	10	59%
<i>P. aeruginosa</i>	16	3	19%	13	81%
<i>E. coli</i>	28	28	100%	0	0%
<i>Всего</i>	<i>112</i>	<i>61</i>	-	<i>51</i>	-

Самый высокий уровень резистентности установили для *K. pneumoniae*: из 25 исследованных изолятов резистентными к фторхинолонам было 21 (84%).

Вторыми по частоте встречаемости оказались *P. aeruginosa* – 81% от общего количества (16) изолятов данного вида.

Все изоляты *E. coli* были чувствительными к ципрофлоксацину с МПК 0,06 мг/л, что свидетельствовало о низкой степени контаминации данного микробиоценоза агентами резистентности к фторхинолонам.

Среди грамположительных кокков больший уровень резистентности показал *S. aureus* – 59% от общего числа изолятов данного вида, в то время как у *E. faecium* 73% изолятов имели хорошую либо промежуточную чувствительность к фторхинолонам (рисунок 3).

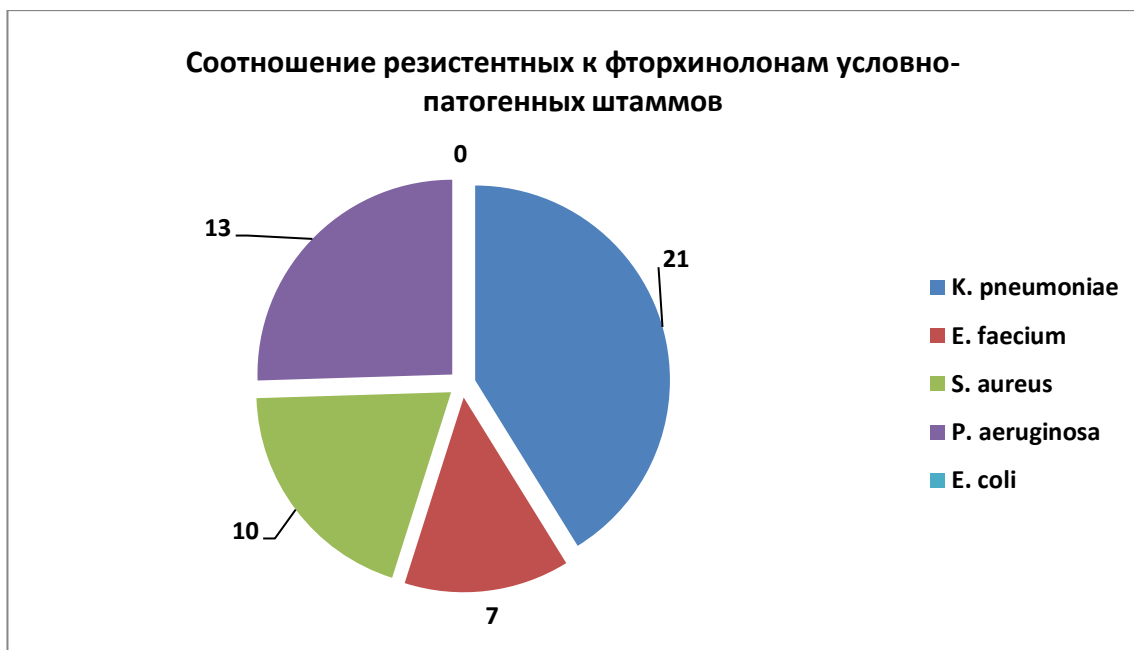


Рисунок 3 - Соотношение резистентных к фторхинолонам условно-патогенных штаммов (n=112).

Было установлено, что грамотрицательные палочки за исключением *E. coli* имели сравнительно одинаковое соотношение между чувствительными и резистентными штаммами своего вида к фторхинолонам. В то время как грамположительные кокки имели выраженные отличия в распределении резистентности к ципрофлоксацину, офлоксацину и энрофлоксацину. Соотношение чувствительных и резистентных изолятов *S. aureus* внутри своего вида составляло 18%, что существенно меньше во внутривидовом сравнении в отличие от вышеупомянутых микроорганизмов (рисунок 4).



Рисунок 4 - Чувствительность к фторхинолонам изолятов условно-патогенных штаммов с птицеводческих объектов.

Результаты проведенного молекулярно-генетического исследования изолятов методом real-time ПЦР показали, что микробиомы птицеводческих объектов были контаминированы генами резистентности (ARG). Был обнаружен ген СТХ, ассоциированный с резистентностью к фторхинолонам, кроме того этот ген кодирует бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), что фенотипически проявляется как резистентность к цефалоспорином I поколения, к пенициллинам, карбапенемам, то есть детерминирует мультирезистентность.

Таким образом, в образцах биоматериала из птицеводческих предприятий были выявлены условно-патогенные микроорганизмы, имеющие разную фенотипическую чувствительность к ципрофлоксацину, офлоксацину и энрофлоксацину.

Выводы

Проведенные исследования показали, что в основном условно-патогенная микрофлора в пробах, взятых на объектах птицеводства, была представлена грамотрицательными бактериями *K. pneumoniae*, *E. coli* и *P.*

aeruginosa, а также грамположительными кокками *E. faecium* и *S. aureus*. Результаты тестов на антибиотикочувствительность показали, что наиболее высокий уровень устойчивости к антибиотикам фторхинолонового ряда был у *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* (84% и 81% соответственно), а самый низкий уровень – у *E. faecium* (27% от всех выделенных изолятов этого вида). Все 100% изолятов *E. coli* были чувствительны к ципрофлоксацину. При анализе геномов микроорганизмов был обнаружен ген СТХ, связанный с устойчивостью к фторхинолонам и продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС). Полученные результаты свидетельствовали о контаминации микробиомов обследованных объектов птицеводства агентами резистентности к антибиотикам фторхинолонового ряда.

Список литературы:

1. Bengtsson-Palme, J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance / Bengtsson-Palme J., Kristiansson E., Larsson D.G.J. // FEMS Microbiol Rev. - 2018 - Jan1 - 42(1) fux053. doi: 10.1093/femsre/fux053.
2. Drlica, K., et al. Quinolone-mediated bacterial death / Drlica, K., Malik, M.R., Kerns, J., and Zhao, X. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy - 2008 - vol. 52 - no. 2. - pp. 385–392.
3. Global Framework for Development & Stewardship to Combat Antimicrobial Resistance. Draft Roadmap. WHO/EMP/IAU/ 2017.08 (revised 19 October 2017). [Электронный ресурс] URL: https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/UpdatedRoadmap-Global-Framework-for-development-Stewardship-to-combatAMR_2017_11_03.pdf?ua=1 (дата обращения 12.12.2021)
4. Krivonogova, A.S. The influence of phytobiotic based on essential oils of *Salvia sclarea*, *Mentha canadensis*, *Mentha piperita* and *Coriandrum sativum* on pathogenic microorganisms of lactating cow udder / A. Krivonogova, A. Isaeva, N. Musikhina [et al.] // E3S Web of Conferences: International Conference “Ensuring

Food Security in the Context of the COVID-19 Pandemic” (EFSC2021), Doushanbe, Republic of Tadjikistan, 29–31 марта 2021 года. – Doushanbe, Republic of Tadjikistan: E3S Web of Conferences, 2021. – P. 04013. – DOI 10.1051/e3sconf/202128204013.

5. Lerminiaux, N.A., Cameron, A.D.S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments / N.A. Lerminiaux, A.D.S. Cameron // *Can J Microbiol.* - 2019 - 65(1) – Pp. 34-44. doi: 10.1139/cjm-2018-0275.

6. Nhung, Nguyen & Chansiripornchai, Niwat & Carrique-Mas, Juan. (2017). Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. *Frontiers in Veterinary Sciences*. 4. 1-17. 10.3389/fvets.2017.00126.

7. Rodrigues, I.A. Antimicrobial resistance genes in bacteria from animal-based foods / I.A. Rodrigues, R. G. Ferrari, P.H. N. Panzenhagen, S. B. Mano, C. A. Conte-Junior // *Advances in Applied Microbiology*, eds G. M. Gadd, S. Sariaslani. Elsevier Inc. - 2020. - V. 112. – Pp. 143-183. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2020.03.001>.

8. Smillie, C.S. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome / Smillie, C.S., Smith, M.B., Friedman, J., Cordero, O.X., David, L.A., Alm, E.J. // *Nature*. - 2011 – V. 480(7376) - Pp. 241-244. doi: 10.1038/nature10571. PMID: 22037308.

9. Sokolova, O.V. Characteristics of species composition, biochemical and pathogenic nature of the microbiota of mammary gland and the reproductive tract in dairy cows / O. V. Sokolova, N. A. Bezborodova, Y. Y. Lysova, E. V. Pechura // *E3S Web of Conferences : International Conference “Ensuring Food Security in the Context of the COVID-19 Pandemic” (EFSC2021)*, Doushanbe, Republic of Tadjikistan, 29–31 марта 2021 года. – Doushanbe, Republic of Tadjikistan: E3S Web of Conferences, 2021. – P. 03017. – DOI 10.1051/e3sconf/202128203017

10. Кундрюкова, У.И. Метаболические эффекты применения бетулина на перепелах / У. И. Кундрюкова, Е. Н. Беспмятных, Л. И. Дроздова [и др.] // *Вестник Алтайского государственного аграрного университета*. – 2020. – № 7(189). – С. 96-102.