



УДК 579.861:575

Малохатхон ТАШПУЛATOBA,

М.н.с. Республиканского специализированного научно-практического медицинского центра эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний

E-mail: t.malokhatkhon@gmail.com

Шохиста ТАШМУХАМЕДОВА,

Профессор Национального Университета Узбекистана, д.б.н

Гулнора АБДУХАЛИЛОВА,

Зав.лаб. центра «Антимикробной резистентности» при Республиканском специализированном научно-практическом медицинском центре эпидемиологии, микробиологии, инфекционных и паразитарных заболеваний, д.б.н

Аброр АБДУРАХИМОВ,

Зав.лаб. Геномики Института Биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана, к.б.н.

Абдушукур РАХМАТУЛЛАЕВ,

М.н.с. Центра передовых технологий

рецензент д.б.н А.А.Ибрагимов зав.лаб. «Высокие технологии» при Ташкентском научно-исследовательском институте вакцин и сывороток

RESISTANCE GENES OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ISOLATED FROM BROILER CHICKENS AND PATIENTS WITH ACUTE INTESTINAL INFECTIONS

Annotation

This article presents data on the growing global threat of antimicrobial resistance. Particular concern is caused by the spread of resistant *Escherichia coli* strains in both clinical and veterinary practice. In the course of the study, resistance genes were identified in *Escherichia coli* strains isolated from patients with acute intestinal infections and from broiler chickens.

Key words: *Escherichia coli* strains, acute intestinal infection, resistance genes

BROYLER TOVUQLARDAN VA O'TKIR ICHAK INFEKSI BILAN KASALLANGAN BEMORLARDAN AJRATILGAN *ESCHERICHIA COLI* SH TAMMLARINING REZISTENTLIK GENLARI

Anotasiya

Ushbu maqolada antibiotiklarga chidamlilikning o'sib borayotgan global tahlili haqida ma'lumotlar keltirilgan. Xususan, klinik va veterinariya amaliyotida *Escherichia coli* ning chidamli shtammlarining keng tarqalishi alohida xavotir uyg'otmoqda. Ushbu tadqiqotda o'tkir ichak infeksiyasi bilan kasallangan bemorlar va broyler tovuqlardan ajratilgan *Escherichia coli* shtammlarining rezistentlik genlari aniqlangan.

Kalit so'zlar: *Escherichia coli* shtammlari, o'tkir ichak infeksiyasi, rezistent genlar

ГЕНЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БРОЙЛЕРНЫХ КУР И БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ

Анотация

В данной статье представлены данные о растущей глобальной угрозы антибиотикорезистентности особую обеспокоенность вызывает распространение устойчивых штаммов *Escherichia coli* как в клинической, так и в ветеринарной практике. В данном исследовании определены гены резистентности штаммов *Escherichia coli*, выделенных от пациентов с острыми кишечными инфекциями и от бройлерных кур.

Ключевые слова: штаммы *Escherichia coli*, острые кишечные инфекции, гены резистентности

Введение. Антимикробная резистентность (AMP) в настоящее время признана одной из наиболее серьезных угроз для глобального здравоохранения. Особую обеспокоенность вызывают грамотрицательные бактерии, в частности *Escherichia coli*, которые способны быстро адаптироваться к антимикробной терапии за счёт приобретения и передачи генов устойчивости.

Особую клиническую значимость приобретают штаммы *E. coli*, продуцирующие β-лактамазы расширенного спектра (ESBL) и карбапенемазы, поскольку они демонстрируют устойчивость к основным классам β-лактамных антибиотиков, включая цефалоспорины и карбапенемы. Эти механизмы устойчивости затрудняют лечение инфекций как у человека, так и у животных, и способствуют трансмиссии устойчивых патогенов через пищевые цепи и окружающую среду [11].

Особенно актуальным становится изучение штаммов, выделенных от людей с острыми кишечными инфекциями (ОКИ), а также от сельскохозяйственных животных, включая бройлерных кур, поскольку эти источники могут быть взаимосвязаны в рамках концепции «Единое здоровье» (One Health) [8,12].

Молекулярное выявление генов резистентности, таких как *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M*, *blaVIM*, *blaNDM*, *blaKPC* и *aac(6)-II*, *aph(3')-VI*, представляет собой важный инструмент мониторинга распространения резистентности и оценки риска передачи между различными популяциями.

Методы исследования. Для решения поставленной цели, исследования проведены в лаборатории «Центр Антимикробной резистентности (ЦАМР)» при РСНПМЦЭМИПЗ.

Изучение морфологических, тинкториальных и биохимических свойства штаммов *E. coli* проводили согласно протоколам ВОЗ [5].

Биохимическую активность определяли путем посева культур в полужидкие среды, содержащие различные углеводы, спирты и аминокислоты: глюкозу, маннит, дульцит, мочевины, арабинозу, ксилит, цитрат, ацетат, малонат, фенилаланин, лизин. Индолообразование определяли на бульоне реактивом по способу Мореля [1].

Механизмы резистентности штаммов *E. coli* к β -лактамам и к аминогликозидным антимикробным препаратам (АМП) изучали молекулярно-генетическими методами: ПЦР с электрофоретической детекцией. Проводили детекцию генов, кодирующих продукцию β -лактамаз широкого и расширенного спектра генетических семейств SHV, TEM, CTX-M, различных карбапенемаз – KPC и металло- β -лактамаз NDM, VIM, а также к аминогликозидам aph(3')-VI, aac(6')-II.

Выделение ДНК. Бактериальную ДНК выделяли методом температурного лизиса стерильной водой [7]. Качество и концентрацию образцов ДНК измеряли с помощью спектрофотометра BioSpec-nano. Для проведения ПЦР по генам *E. coli* blaSHV, blaTEM, blaCTX-M, blaKPC, blaVIM, blaNDM, aph(3')-VI, aac(6')-II использовались лиофилизированные реагенты GenePakTM PCR Core (ООО «Лаборатория ИзоГен» Россия). Пробирки содержат в лиофилизированном виде Taq-ДНК-полимеразу и нуклеотиды dNTP. Конечный объем реакционной смеси составлял 20 мкл с учетом добавленной матричной ДНК.

В качестве контроля были использованы ДНК эталонного штамма *E. coli* ATCC 25922. Амплификация ДНК была проведена на приборе Veriti Dx 96-well Thermal Cycler. Для выбора специфических праймеров генов резистентности (blaSHV, blaTEM, blaCTX-M, blaKPC, blaVIM, blaNDM, aph(3')-VI, aac(6')-II) была проведена реакция амплификации (Таблица 1) [2,3,4,6,9,14].

Таблица 1.

Праймеры использованные для амплификации

	Ген	Названия праймера	Нуклеотидная последовательность (5'--3')	П.н.	
1	blaSHV	SHV-F1	GGCCGCGTAGGCATGATAGA	714	AL-Mahfooth 2021
		SHV-R1	CCCCGCGATTGTGCTGATTTC		
2	blaSHV	SHV-F2	CTTTATCGGCCCTCACTCAA	237	Rasha Hamed El sherif 2012
		SHV-R2	AGGTGCTCATCATGGGAAG		
3	blaTEM	TEM-F1	CAGCGGTAAAGATCCTTGAGA	643	AL-Mahfooth 2021
		TEM-R1	ACTCCCGTCGTGTAGATAA		
4	blaTEM	TEM-F2	CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA	445	Tsobeng, O. D 2024
		TEM-R2	ACGCTCACCGGCTCCAGATTAT		
5	blaCTX-M	CTX-M_F	ATGTGCAGYACAGTAARGTKATGGC	593	Tsobeng, O. D. 2024
		CTX-M_R	TGGGTAAARTARGTSACCAGAAACAGCGG		
6	blaKPC	KPC-F1	CATTCAAGGGCTTTCTGTGCTGC	498	Mahmoud, N. E 2020
		KPC-R1	ACGACGGCATAGTCATTGTC		
7	blaKPC	KPC-F2	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	498	Bagaya, J 2023
		KPC-R2	TTTTCAGAGCCTTACTGCC		
8	blaVIM	VIM-F1	GGTGTTTGGTTCGCATATCGCAA	502	Mahmoud, N. E 2020
		VIM-R1	-ATTCAAGCCAGATCGGCATCGGC		
9	blaVIM	VIM-F2	GATGGTGTTTGGTTCGCAT	390	Bagaya, J 2023
		VIM-R2	CGAATGCGCAGCACCAG		
10	blaNDM	NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTC	621	Bagaya, J 2023
		NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC		
11	aph(3')-VI	Aph-F	ATGGAATTGCCCAATATTATT	780	Hu, X 2013
		Aph-R	TCAATTCAATTCATCAAGTTT		
12	aac(6')-II	Aac-F	CGACCATTTTCATGCC	542	Hu, X 2013
		Aac-R	GAAGGCTTGTCTGTGTT		

Примечание: п.н.- пар нуклеотид, Y- С или T, R- A или G, K- G или T, S- G или C.

Полученные ПЦР-продукты визуализировали методом электрофореза в 2 % ном агарозной геле, и интерпретировали результаты.

Результаты и их обсуждения. Было исследовано 28 штамма *E. coli* выделенных из кишечника тушек бройлерных кур отобранных с фермерского хозяйства ООО «Nanogen lab» г. Ташкент во время убоя. 28 штамма *E. coli* выделенных (материалом для бактериологического исследования служили образцы кала) от больных острыми кишечными инфекциями, госпитализированных в клинику РСНПМЦЭМИПЗ.

β -лактамаза расширенного спектра действия (ESBL), продуцируемая Enterobacteriaceae, является распространенным источником устойчивости к противомикробным препаратам как у животных, так и у людей [11]. Бактериальные изоляты *E. coli*, которые продуцируют β - лактамазы расширенного спектра, способствуют возникновению опасных для жизни инфекций во всем мире. Распространенность таких *E. coli* составила 33,0% для людей, 33,5% для животных, опубликованных во всем мире. Кроме того, три типа генов резистентности, кодирующих ESBL, а именно bla_{SHV} bla_{CTX-M}, и bla_{TEM}, были обнаружены у людей, животных [13].

У штаммов *E. coli*, выделенных от больных с острыми кишечными инфекциями (ОКИ) и от бройлерных кур, методом ПЦР была проанализирована частота встречаемости генов bla_{TEM}, bla_{CTX-M}, bla_{SHV}, bla_{VIM}, bla_{NDM}, bla_{KPC}, aac(6')-II и aph(3')-VI.

Ген bla_{TEM} у изолятов, полученных от кур, выявлялся на 32,2% чаще, чем у штаммов, выделенных от больных с ОКИ (соответственно 89,3% и 57,1%). Частота обнаружения гена bla_{SHV} оказалась практически одинаковой в обеих группах и составила 3,6%.

Ген bla_{CTX-M}, ассоциированный с устойчивостью к цефалоспорином третьего и четвертого поколений (цефотаксим, цефтриаксон), не выявлен у штаммов, изолированных от кур, в то время как у штаммов, выделенных от больных с ОКИ, он встречался в 60,7% случаев (рис 1). Это, вероятно, отражает более широкое использование цефалоспоринов в клинической практике среди населения [16].

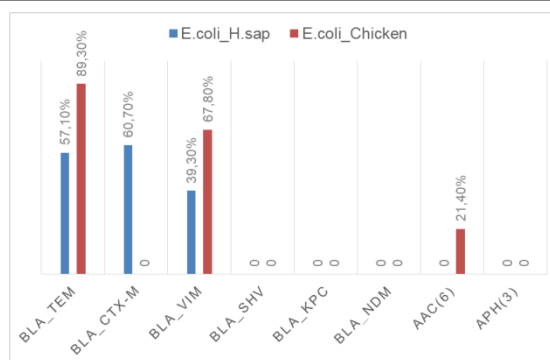


Рис 1. Сравнительный график генов резистентности у больных ОКИ и бройлерных кур

Гены *bla_NDM* и *bla_KPC*, ответственные за устойчивость к карбапенемам, не амплифицировались ни в одной из исследованных групп, что с высокой вероятностью свидетельствует об их отсутствии в данных штаммах. Напротив, ген *bla_VIM* у изолятов, полученных от кур, выявлялся на 25% чаще по сравнению с изолятами, выделенными от пациентов.

При оценке распространённости генов *aac(6')-II* и *aph(3')-VI*, обеспечивающих устойчивость к аминогликозидам, установлено, что ген *aac(6')-II* присутствовал у 21,4% штаммов, выделенных от бройлерных кур, тогда как у штаммов, выделенных от больных с ОКИ, данные гены не обнаружены вовсе.

Штаммы *E. coli*, выделенные от пациентов ОКИ, продемонстрировали высокий уровень устойчивости к цефалоспорином (цефтриаксон, цефотаксим, цефепим) и карбапенемам (имипенем, дорипенем). Подобная резистентность, вероятно, обусловлена широким применением указанных препаратов в клинической практике [10]. В отличие от этого, у бройлерных кур ген *bla_CTX-M* не был выявлен, что вероятно, отражает ограниченное применение цефалоспоринов III–IV поколения в ветеринарной практике.

Высокая распространённость генов *bla_TEM* и *aac(6')-II* у птиц свидетельствует о наличии в данной популяции штаммов, устойчивых к β-лактамам антибиотикам и аминогликозидам. Вероятной причиной этого может быть профилактическое использование антибиотиков на птицефабриках [15].

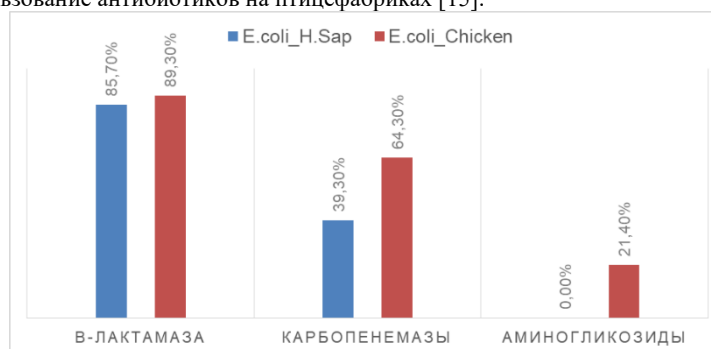


Рис 1. Молекулярно-генетический анализ резистентности по трем группам к антимикробным препаратам штаммов *E.coli*

Согласно результатам (Рис 1.) ПЦР был проведён анализ устойчивости к антибиотикам трёх основных групп: β-лактамам, карбапенемам и аминогликозидам. По устойчивости к β-лактамам антибиотикам существенных различий между двумя группами выявлено не было.

При оценке устойчивости к карбапенемам различия оказались более выраженными: у штаммов *E. coli*, выделенных от больных с ОКИ, по данным ПЦР-анализов — 39,3%, у штаммов выделенных от кур, напротив, частота выявления генов устойчивости несколько выше 64,3%.

При анализе распространённости генов, кодирующих устойчивость к аминогликозидам (*aac(6')-II* и *aph(3')-VI*) выявлена 21,4% штаммов, выделенных от кур.

Заключение. У штаммов *E. coli*, выделенных от пациентов ОКИ и бройлерных кур, выявлены статистически значимые различия в распространённости генов резистентности, ответственных за устойчивость к β-лактамам и аминогликозидам. Полученные результаты подчёркивают необходимость координированного контроля за здоровьем человека и животных в рамках концепции «Единое здоровье» (One Health) [8].

В нашем исследовании были охвачены основные и наиболее распространённые гены, однако для более полной картины следует также учитывать, что имеются также дополнительные гены резистентности, такие как *AmpC*, *OXA*, *GES*, *qnr*, *rmt* и другие.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г.И.Чубенко Методы идентификации бактерий Методическое пособие для самоподготовки студентов Благовещенск, 2018. Стр 17 ФГБОУ ВО АМУРСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИИ КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ
2. AL-Mahfoodh, Wasan Jasim Mohammed, Filiz Sarikaya Pekacar, and Ali Hafedh Abbas. "The molecular study for evaluation the antibiotic resistance of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae bacteria isolated from urinary tract infection patients." Gene Reports 25 (2021): 101423.

3. Bagaya, J., Ssekatawa, K., Nakabiri, G., Nsubuga, J., Kitibwa, A., Kato, C. D., & Sembajwe, L. F. (2023). Molecular characterization of Carbapenem-resistant *Escherichia coli* isolates from sewage at Mulago National Referral Hospital, Kampala: a cross-sectional study. *Annals of Microbiology*, 73(1), 28.
4. Hu, X., Xu, B., Yang, Y. *et al.* A high throughput multiplex PCR assay for simultaneous detection of seven aminoglycoside-resistance genes in Enterobacteriaceae. *BMC Microbiol* **13**, 58 (2013). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-58>
5. ISO-6579/ 2002 (E) 4th Ed. Microbiology-General Guidance on Methods for the detection of Salmonella// International Organisation for Standardization Geneva//Switzerland.-2002.-P.325 [cdn.standards.itech.ai>samples...ISO-6579-2002.pdf]
6. Mahmoud, N. E., Altayb, H. N., & Gurashi, R. M. (2020). Detection of Carbapenem-Resistant Genes in *Escherichia coli* Isolated from Drinking Water in Khartoum, Sudan. *Journal of environmental and public health*, 2020(1), 2571293.
7. Maria-Eleni Dimitrakopoulou, Venia Stavrou, Chrysoula Kotsalou, Apostolos Vantarakis Boiling Extraction Method VS Commercial Kits for Bacterial DNA Isolation from Food Samples 2020
8. Ramatla T. *et al.* (2023). One Health perspective on coexisting ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*. *BMC One Health Outlook*, 5(1):1-17. <https://doi.org/10.1186/s42522-023-00149-9>
9. Rasha Hamed El sherif & Hoda Abdel Hamid Maamoun. Molecular characteristics of extended – spectrum beta-lactamases among gram-negative isolates collected in Cairo University Hospital. P 733-739 (2013)
10. Rodriguez-Baño J. *et al.* (2010). Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *Journal of Infection*, 60(5): 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.04.009>
11. Salgado-Caxito M., Benavides JA, Adell AD, Paes AC, Moreno-Switt AI (2021). Global prevalence and molecular characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* in dogs and cats – a systematic review and meta-analysis. *One Health*, 12:100236. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100236>
12. Tricia D Miles¹, Wayne McLaughlin and Paul D Brown Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans 2006
13. Tsepo Ramatla, Tshepo Mafokwane, Kgaugelo Lekota, Maropeng Monyama, George Khasapane, Naledi Serage, Jane Nkhebenyane, Carlos Bezuidenhout and Oriel Thekiso (22 сентября 2023 г) “One Health” perspective on prevalence of coexisting extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: a comprehensive systematic review and meta-analysis
14. Tsobeng, O. D., Mbaveng, A. T., Kengne, M. F., Dadjo, B. S., Fonjou, D. G., & Kuete, V. (2024). Detection of blaTEM, blaOXA, blaCTX-M, and blaSHV genes of antibiotic resistance in diarrheagenic *E. coli* causing enteric infection in hypertensive patients at Laquintinie Hospital, Littoral Region of Cameroon. *Journal of Infection and Public Health*, 102617.
15. Van Boeckel T.P. *et al.* (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Science*, 347(6225): 564–567. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5640>
16. Xiao.R.Q. , Y. Li, X.W. Liu, Y.J. Ding, J.D. Lai, Y.F. Li, W.Q. Kang, P.C. Zou, J. Wang, Y. Du, J.J. Zhang, Y.J. Wang Antibiotic susceptibility of *Escherichia coli* isolated from neonates admitted to neonatal intensive care units across China from 2015 to 2020 *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 13 (2023), Article 1183736 <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.04.009>