

УДК579.25:615.281.015.8]:616-078:57.088

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ СПЕКТРА ГЕНОВ
РЕЗИСТЕНТНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ У
ФЕНОТИПИЧЕСКИ РЕЗИСТЕНТНЫХ
ШТАММОВ ПРИСТЕНОЧНОЙ КИШЕЧНОЙ
МИКРОБИОТЫ У КРЫС МЕТОДОМ ПЦР-РВ**

Букина Ю.В., Камышный А.М., Полищук Н.Н.

**Запорожский государственный медицинский
университет, Кафедра микробиологии,
вирусологии и иммунологии
г. Запорожье, пр. Маяковского, 26,
e-mail: lingvus@mail.ru**

Резистентность бактериальных агентов инфекционных заболеваний к антибиотикам в настоящее время приобрела глобальный характер и является основной причиной, ограничивающей эффективность антибактериальной терапии. Масштабное назначение и ненадлежащее использование противомикробных препаратов приводит к появлению новых механизмов устойчивости у таких микроорганизмов, как энтеробактерии, псевдомонады, стафилококки, энтерококки, за счет продукции различных вариантов бета-лактамаз (карбапенемаз). Последние способны полностью разрушать и инактивировать молекулу антибактериального препарата, либо, специфично реагируя с антибиотиком, модифицировать и нарушать его аффинность к мишени, либо, наоборот связываясь с молекулой антибиотика, не позволяя ему присоединиться к мишени. В связи с этим, особенно актуально звучит проблема нарастания устойчивости бактерий к бета-лактамам антибиотикам, в частности, к цефалоспорином и карбапенемам, применяемым во всем мире для лечения тяжелых внегоспитальных и госпитальных инфекций, в особенности, вызванных полимикробной флорой [1]. Вместе с тем, не менее актуальны вопросы по поводу клинической эффективности гликопептидов, а именно, ванкомицина и тейкопланина, позволяющих справляться с тяжелыми инфекционными процессами, вызванными грамположительной кокковой микрофлорой. В то же время, в литературе описываются случаи неэффективности применения этих антибиотиков при стафилококковых и энтерококковых инфекциях вследствие развития у бактерий механизма резистентности по типу образования метаболического «шунта».

В настоящее время одним из важнейших мероприятий, направленных на усовершенствование системы по надзору за антибиотикорезистентностью, является внедрение в работу учреждений здравоохранения гибридационного метода анализа на ДНК-мишенях, мультиплексная ПЦР-РВ, как одной из составляющих глобальной программы по мониторингу циркуляции антибиотикорезистентных штаммов [2]. Изучение генетических детерминант резистентности микроорганизмов позволяет не

только проводить эффективную антибактериальную терапию, а и выявлять два основных процесса, приводящих к развитию эпидемически значимых событий: занос возбудителя в популяцию риска извне и направленную перестройку популяции возбудителя *in situ* (спонтанный генетический дрейф).

В связи с вышеизложенным, в нашей работе мы уделили внимание молекулярно-генетическому типированию циркулирующих штаммов, как важной составляющей глобальной системы по надзору за антибиотикорезистентностью микроорганизмов.

Ключевые слова: резистентность к антибиотикам, геноиндикация, гены резистентности, ПЦР-РВ, пристеночная микрофлора.

Цель исследования: индикация генов резистентности у клинически значимых фенотипически резистентных штаммов микроорганизмов семейств *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Bacteroidaceae*, *Enterococcaceae*, *Peptostreptococcaceae* с целью последующей разработки программы по мониторингу циркуляции антибиотикорезистентных штаммов среди людей и объектов окружающей среды.

Материалы и методы

Эксперименты по определению фенотипической и генетической резистентности штаммов микроорганизмов проводились на базе бактериологического и молекулярно-генетического отделов микробиологической лаборатории Запорожского государственного медицинского университета. В качестве материала для исследований использовали культуры микроорганизмов, выделенные при бактериологическом исследовании соскобов пристеночного содержимого тонкого кишечника, полученных при вскрытии 80 крыс линии «Вистар». Первичная идентификация энтеробактерий проводилась в соответствии с методическими рекомендациями «Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых энтеробактериями» (Москва, 1984), псевдомонад – «Биологическая характеристика и микробиологическая идентификация неферментирующих грамотрицательных бактерий» (Харьков, 2010), энтерококков – «Микробиологическая диагностика стрептококковой, энтерококковой и пептострептококковой инфекций» (Харьков, 2007). Индикацию бактериоидов и пептострептококков проводили согласно методическим рекомендациям «Лабораторная диагностика гнойно-воспалительных заболеваний, обусловленных аспорогенными анаэробными микроорганизмами» (Харьков, 2000). Определение чувствительности выделенных микроорганизмов к цефотаксиму, цефтриаксону, цефтазидиму, имипенему, меропенему и ванкомицину осуществляли диско-диффузионным методом в соответствии с методическими рекомендациями «Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів» (Киев, 2004). Для выявления карбапенемазной активности у

фенотипически резистентных изолятов энтеробактерий и псевдомонад применяли модифицированный тест Ходжа (modified Hodge test – МНТ) согласно рекомендациям EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Для этого чашки Петри с агаром Мюллера-Хинтона засеивали контрольным штаммом *E.coli*, в середине чашки размещали диск с карбапенемным антибиотиком. Затем штрихом по направлению от диска к периферии засеивали исследуемые изоляты. Если изоляты обладали карбапенемазной активностью, то в непосредственной близости от роста исследуемой культуры происходил гидролиз карбапенемного антибиотика и проявлялся рост контрольного штамма.

К сожалению диско-диффузионный метод может давать как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты. Более надежными и чувствительными методами детекции антибиотикорезистентности является генотипический метод. Для проведения ПЦР анализа были отобраны 712 фенотипически резистентных штаммов микроорганизмов, выделенных при микробиологическом исследовании пристеночной микрофлоры. В процессе работы изучено 474 изолята бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, 39 – *Pseudomonadaceae*, 71 – *Bacteroidaceae*, 96 – *Enterococcaceae*, 32 – *Peptostreptococcaceae*. Выделение ДНК у исследуемых микроорганизмов проводили с использованием реагентов «ДНК-экспресс» согласно рекомендаций изготовителя. Для обнаружения генов резистентности методом ПЦР-РВ применяли наборы реактивов формата «ФЛУОРОПОЛ-РВ» комплектации «Нераскапанный»: резистентность к карбапенемам-1 (резистентность *Enterobacteriaceae* и *P.aeruginosa* к карбапенемам, выявление генов *VIM*); резистентность к карбапенемам-2 (резистентность *Enterobacteriaceae* к карбапенемам, выявление генов *NDM*); резистентность к карбапенемам-3 (резистентность *Enterobacteriaceae* к карбапенемам, выявление генов *OXA-48*); резистентность к карбапенемам-4 (резистентность *Enterobacteriaceae*

к карбапенемам, выявление генов *KPC*); резистентность к цефалоспорином-1 (резистентность *Enterobacteriaceae* к цефалоспорином, выявление генов *CTX-M*); резистентность к гликопептидам (резистентность *E.faecalis* и *E.faecium* к ванкомицину и тейкопланину, выявление генов *Van A* и *Van B*).- Параллельно с изучаемыми образцами проводились реакции с положительным и отрицательным контролями, которые входили в состав наборов. Все исследования выполнялись в соответствии с инструкциями изготовителя («Литех», Россия), что обеспечило высокую скорость и точность геноиндикации. Результаты амплификации анализировались с помощью программы Bio-Rad CFX Manager 3.0 согласно «Руководству по применению наборов формата Флуоропол – РВ».

Результаты и обсуждение

В ходе изучения 474 изолятов микроорганизмов – представителей семейства *Enterobacteriaceae*, нами обнаружены гены *KPC*, *OXA-48*, *VIM* и *NDM* соответственно у 7,81%, 8,44%, 14,14% и 8,23% изученных культур. Данные гены были выявлены у штаммов *E.coli* (6,74%, 7,87%, 14,61%, 4,49% соответственно), микроорганизмов родов *Klebsiella* (13,85%, 1,54%, 15,38%, 12,31%), *Salmonella* (7,03%, 10,16%, 13,28%, 8,59%), *Enterobacter* (4,76%, 14,29%, 15,87%, 4,76%), *Proteus* (7,89%, 10,53%, 14,47%, 6,58%) и *Shigella* (7,55%, 3,77%, 11,32%, 15,09%). ПЦР-исследование 39 изолятов *P.aeruginosa* показало наличие только гена *VIM* и только у 15,38% культур. По данным российских исследователей, у штаммов энтеробактерий выявляются только гены *OXA-48* (43,7%) и *VIM* (17,6%), а частота выявления гена *VIM* у *P.aeruginosa* составила 62,9%. [3, 4, 5]. При исследовании бактероидов (*Bacteroides spp.*) гены *KPC*, *OXA-48*, *VIM* и *NDM* нами идентифицированы у 9,86%, 4,23%, 9,86% и 12,68% штаммов соответственно. У энтерококков и пептострептококков данные гены не обнаружены (табл.1).

Таблица 1. Результаты индикации генов карбапенемаз у фенотипически резистентных штаммов микроорганизмов

Штаммы микроорганизмов	Кол-во, абс.ч.	<i>KPC</i>		<i>OXA-48</i>		<i>VIM</i>		<i>NDM</i>	
		абс.ч.	%	абс.ч.	%	абс.ч.	%	абс.ч.	%
<i>Enterobacteriaceae:</i>	474	37	7,81	40	8,44	67	14,14	39	8,23
<i>E.coli</i>	89	6	6,74	7	7,87	13	14,61	4	4,49
<i>Klebsiella spp.</i>	65	9	13,85	1	1,54	10	15,38	8	12,31
<i>Salmonella spp.</i>	128	9	7,03	13	10,16	17	13,28	11	8,59
<i>Enterobacter spp.</i>	63	3	4,76	9	14,29	10	15,87	3	4,76
<i>Proteus spp.</i>	76	6	7,89	8	10,53	11	14,47	5	6,58
<i>Shigella spp.</i>	53	4	7,55	2	3,77	6	11,32	8	15,09
<i>Bacteroidaceae,</i> <i>Bacteroides spp.</i>	71	7	9,86	3	4,23	7	9,86	9	12,68
<i>Pseudomonadaceae,</i> <i>P.aeruginosa</i>	39	0	0	0	0	6	15,38	0	0

<i>Enterococcaceae:</i>	96	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E.faecalis</i>	46	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E.faecium</i>	50	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Peptostreptococcaceae,</i> <i>Peptostreptococcus spp.</i>	32	0	0	0	0	0	0	0	0

В ходе проведенной геноиндикации, ген *CTX-M* выявлен у 10,97% штаммов семейства *Enterobacteriaceae* (*E.coli* – 8,99%, *Klebsiella spp.* – 13,85%, *Salmonella spp.* – 14,06%, *Enterobacter spp.* – 7,93%, *Proteus spp.* – 6,58%, *Shigella spp.* – 13,21%), *Bacteroidaceae* – 15,49%, *Peptostreptococcaceae* – 6,25%. У псевдомонад и энтерококков *CTX-M* не

выявлен (табл. 2). В тоже время, согласно данным литературы, частота обнаружения гена *CTX-M* у штаммов семейства *Enterobacteriaceae*, циркулирующих на территории СНГ, в отдельных регионах достигает 100%, при этом, данный ген также не выявляется у энтерококков и псевдомонад [6].

Таблица 2. Результаты индикации генов *CTX-M*, *Van A* и *Van B* у фенотипически резистентных штаммов микроорганизмов

Штаммы микроорганизмов	Кол-во абс.ч.	<i>CTX-M</i>		<i>Van A</i>		<i>Van B</i>	
		абс.ч.	%	абс.ч.	%	абс.ч.	%
<i>Enterobacteriaceae:</i>	474	52	10,97	0	0	0	0
<i>E.coli</i>	89	8	8,99	0	0	0	0
<i>Klebsiella spp.</i>	65	9	13,85	0	0	0	0
<i>Salmonella spp.</i>	128	18	14,06	0	0	0	0
<i>Enterobacter spp.</i>	63	5	7,93	0	0	0	0
<i>Proteus spp.</i>	76	5	6,58	0	0	0	0
<i>Shigella spp.</i>	53	7	13,21	0	0	0	0
<i>Bacteroidaceae,</i> <i>Bacteroides spp.</i>	71	11	15,49	0	0	0	0
<i>Pseudomonadaceae,</i> <i>P.aeruginosa</i>	39	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcaceae:</i>	96	0	0	11	11,46	6	6,25
<i>E.faecalis</i>	46	0	0	5	10,87	4	8,7
<i>E.faecium</i>	50	0	0	6	12,0	2	4,0
<i>Peptostreptococcaceae,</i> <i>Peptostreptococcus spp.</i>	32	2	6,25	0	0	0	0

Изучение резистентности к гликопептидам, в частности, к ванкомицину, показало наличие генов резистентности *Van A* у 11,46% и *Van B* у 6,25% у фенотипически резистентных штаммов микроорганизмов семейства *Enterococcaceae*. При этом, из 46 изученных штаммов *E.faecalis* 10,87% изолятов содержали ген *Van A* и 8,7% – *Van B*. 12% изученных культур *E.faecium* (из 50 протипированных штаммов) имели в своём генотипе *Van A* и 4% – *Van B*. Вместе с тем, частота выявления генов *Van A* и *Van B* у штаммов *E.faecalis*, циркулирующих на территории России, составляет 1,7% и 2,2%, а у *E.faecium* – 9,3% и 11,5% соответственно [7, 8, 9]. В ходе проведенной нами геноиндикации, данные гены не выявлены у 32 штаммов бактерий семейства *Peptostreptococcaceae*. Также, гены *Van A* и *Van B* не обнаружены у 474 штаммов энтеробактерий, у 71 штамма бактероидов и у 39 штаммов псевдомонад, что в очередной раз подтверждает факт наличия природной резистентности у данных микроорганизмов к гликопептидным антибактериальным препаратам, в частности к ванкомицину (см.табл. 2).

В ходе проведения молекулярно-генетического исследования нами не выявлены фенотипически резистентные штаммы, обладающие сочетанной карбапенемазной активностью.

За несколько десятков лет с момента открытия β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) эти ферменты получили глобальное распространение. Так, в отдельных странах Европейского Союза устойчивость к цефалоспорином III поколения, связанную в основном с БЛРС, проявляют от 5,0 до 39,6% инвазивных изолятов *Escherichia coli* и до 70% *Klebsiella pneumoniae*. В США и Испании проявление резистентности к карбапенемам наблюдается у 15% штаммов *P.aeruginosa*. Устойчивость энтерококков к гликопептидам в США и Западной Европе составляет 15-20%. В стационарах России частота распространения БЛРС среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* приближается к 90% или превышает его. Крайне негативной глобальной тенденцией является выход продуцентов БЛРС за пределы стационаров. Эта проблема стала основанием для создания

программы «Микроб», позволяющей осуществлять контроль по циркуляции антибиотикорезистентных штаммов, выделяемых не только от пациентов с больничными инфекциями, но и из окружающей среды [10]. В настоящее время в Украине не разработана программа по контролю циркуляции резистентных культур, в том числе и карбапенемаз-активных, выделяемых как от людей, так и из объектов внешней среды и от животных. Существующая программа WHONET по мониторингу антибиотикорезистентных штаммов основывается на данных, полученных при изучении

штаммов, выделенных только от больных людей и с объектов ЛПУ.

Ситуация с резистентностью к карбапенемам принципиально изменилась после появления ферментов карбапенемаз. Известно, что гены карбапенемаз, гидролизующих ферментов четырех молекулярных классов (А, С, D – сериновый тип, В – металло-β-лактамазы), часто сцеплены с другими детерминантами антибиотикорезистентности и включены в состав высоко мобильных интегров, способных быстро распространяться между бактериями с помощью плазмид и транспозонов (рис. 1) [11, 12, 13].

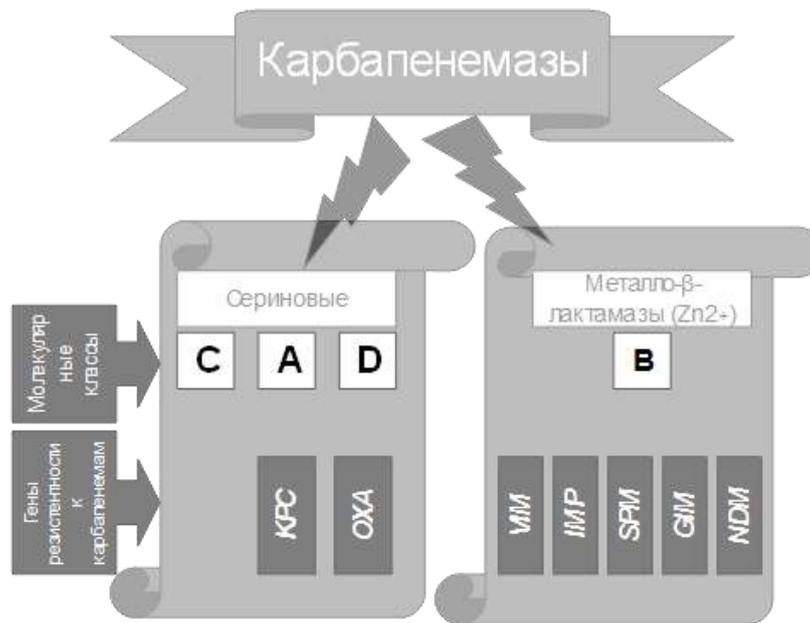


Рисунок 1. Классификация карбапенемаз

Так, гены *blaKPC*, кодирующие сериновые карбапенемазы *KPC* (молекулярный класс А), которые, в свою очередь, проявляют активность в отношении пенициллинов, цефалоспоринов I-IV поколений и карбапенемов, часто входят в состав мобильных элементов (транспозоны Tn4401- типа), поэтому кроме клонального распространения возможен их горизонтальный перенос между штаммами. *OXA*-β-лактамазы с карбапенемазной активностью (молекулярный класс D) кодируются 9 кластерами генов, которые расположены на интегронах и легко встраиваются в плазмиды или хромосомы, что приводит к обмену этими генами как внутри бактериальной популяции одного вида, так и между различными видами, например, между *Acinetobacter* и микроорганизмами семейства *Enterobacteriaceae* [14, 15, 16]. Активность металло-β-лактамаз (МБЛ) *VIM-1*, *VIM-2* и *NDM-1* проявляется в отношении карбапенемов и пенициллинов, при этом, *VIM-1* находится в генетической кассете в интегрене 1-го класса, а *VIM-2*, имея высокую степень гомологии с *VIM-1*, кодируется генетической кассетой, расположенной на неконъюгативной плазмиде. В тоже время, МБЛ *NDM-1* кодируется плазмидным геном и подвержена активному горизонтальному переносу между разными видами грамотрицательных бактерий [17].

С момента выявления первой карбапенемазы класса В в 1988 г. (*P.aeruginosa*), штаммы обладающие *VIM* и *NDM* ферментами получили широкое распространение и, начиная с 2012 г., обнаруживаются в 40 странах на всех континентах, кроме Антарктиды и Южной Америки. В настоящее время гены *NDM-1* описаны у многих представителей *Enterobacteriaceae* (*E.coli*, *K.pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Morganella morganii*, *Providencia spp.*), а также у *P.aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* и штаммов *Bacteroides fragilis*. На территории России, Казахстана и Белоруссии циркулирует порядка 28,7% штаммов *P.aeruginosa* продуцирующих МБЛ, среди которых 99,6% относятся к доминирующей генетической линии *VIM-2* (сиквенс тип – ST235). Среди энтеробактерий выявляют лишь единичные изоляты, продуцирующие карбапенемазы *VIM* и *OXA-48* [10] (см. выше). В 2013 г. в Европе наиболее распространенными среди представителей *Enterobacteriaceae* с карбапенемазной активностью являются *KPC*-тип, *VIM*-тип, *NDM*-тип и *OXA-48*-тип. По данным центра профилактики и контроля болезней (European Centre for Disease Prevention and Control) эндемичными регионами по распространению карбапенемаз являются Италия и Греция, внутрибольничное распространение зафиксировано в Израиле, Ирландии, Венгрии. В 26

странах Европы ситуация характеризуется регулярными вспышками и эндемичными очагами, в 9 странах обнаружены единичные случаи и только в 3 странах (Исландии, Черногории и Македонии) инфекций, вызванных продуцентами карбапенемаз, не выявлено [10] (см. выше).

Частота встречаемости *CTX-M*-лактамаз у бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, особенно высока в России и ряде других стран Европы, а также Азии и Южной Америки, где их циркуляция достигает 80-100%. Суммарная доля *CTX-M* БЛРС среди нозокомиальных штаммов семейства *Enterobacteriaceae* в России достигает 69,9%. Группа *CTX-M* β -лактамаз, специфично гидролизующих цефалоспорины, наиболее разнородна по строению аминокислотной последовательности белков и, соответственно, по строению кодирующих их генов, которые имеют плазмидную локализацию. Гомология бета-лактамаз *CTX-M* типа с другими типами бета-лактамаз класса А выражена слабо (менее 40%). Гораздо более высокая гомология (более 70%) наблюдается с хромосомно кодируемыми ферментами *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus*, *Proteus vulgaris* и *Serratia fonticola*. Это позволяет предположить, что плазмидно-кодируемые ферменты *CTX-M* типа произошли от ферментов, входящих в состав хромосом. Установлено, что для этого типа ферментов также существуют ключевые мутации, например, в положениях 167 и 240, которые приводят к изменению профиля субстратной специфичности [18].

По данным исследований, проведенных в США, Германии и России, встречаемость ванкомицинрезистентных штаммов составляет соответственно 7,9%, 12% и 74%. У энтерококков различают как минимум шесть фенотипов резистентности к ванкомицину (от *Van A* до *Van G*). При этом чаще всего встречается тип *Van A*, который передается плазмидой и характеризуется высокой резистентностью не только к ванкомицину, но и к тейкопланину. Энтерококки с индуцибельным *Van B* фенотипом резистентны к ванкомицину, но чувствительны к тейкопланину. Фенотип *Van C* кодируется хромосомными генами видов *Enterococcus gallinarum* и *Enterococcus casseliflavus* и характеризуется довольно низким уровнем ванкомицин-резистентности. Остальные 3 фенотипа ванкомицин-резистентности (*Van D*, *Van E* и *Van G*) встречаются редко, кодируются хромосомными генами и чаще всего чувствительны к тейкопланину [19, 20].

Выводы

1. Полученные в ходе исследований результаты свидетельствуют о наличии генов резистентности к карбапенемам у штаммов микроорганизмов семейств *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* и *Pseudomonadaceae* (*P.aeruginosa*), к цефалоспорином – *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* и *Peptostreptococcaceae*, к ванкомицину – у бактерий семейства *Enterococcaceae*.

2. Фенотипически резистентные штаммы, обладающие сочетанной карбапенемазной активностью, не выявлены.

3. Несмотря на широкий спектр активности карбапенемов, цефалоспоринов и гликопептидов, назначение антибиотиков данных групп должно проводиться с учетом результатов геноиндикации изучаемых штаммов.

4. Целесообразно создание программы по мониторингу циркуляции антибиотикорезистентных штаммов, в том числе обладающих карбапенемазной активностью, среди людей и в объектах окружающей среды.

References

1. The world health report 2014 – World health statistics 2014 [Electronic resource] / World Health Organization. – Mode of access :http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112738/1/9789240692671_eng.pdf.
2. Finley, R. L. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment [Text] / R. L. Finley, P. Collignon, D. G. Larsson [et al.] // *Clinical Infection Diseases* – 2013. – Vol. 57. – P. 704-710.
3. Yan, J. J. Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM 3, a novel variant of the VIM 2 enzyme [Text] / J. J. Yan, P. R. Hsueh, W. C. Ko [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2001. – Vol.45. – P. 2224-2228.
4. Woodford, N. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom [Text] / N. Woodford, J. Zhang, M. Warner [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2008. – Vol. 62. – P. 1261-1264.
5. Pournaras, S. Clonal spread of KPC 2 carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece [Text] / S. Pournaras, E. Protonotariou, E. Voulgari [et al.] // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2009. – P. 348-352.
6. Van Duin, D. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a review of treatment and outcomes [Text] / D. Van Duin, K. S. Kaye, E. A. Neuner, R. A. Bonomo // *Diagnostics Microbiology Infections Diseases*. – 2013. – Vol. 75. – P. 115-120.
7. Courvalin, P. Vancomycin resistance in grampositive cocci [Text] / P. Courvalin // *Clinical Infections Diseases*. – 2006. – Vol. 42. – P. 25-34.
8. Davies, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes [Text] / J. Davies // *Science*. – 1994. – P. 375-382.
9. Evers, S. Genetics of glycopeptide resistance in enterococci [Text] / S. Evers, R. Quintiliani, P. Courvalin // *Microbiology Drug Resistance*. – 2011. – Vol. 2. – P. 219-23.
10. The Scientific Center for Medical Research 2012 - Scientific Center statistics 2012 [Electronic resource] / Scientific Center Organization. – Mode of access :<http://www.pharmateca.ru/ru/archive/article/31922>.
11. Walsh, T. R. Clinically significant carbapenemases: an update [Text] / T. R. Walsh [et al.] // *Current Opinion in Infections Diseases*. – 2008. – Vol. 21. – P. 367-371.

12. Queenan, A. M. Carbapenemases: the versatile betalactamases [Text] / A. M. Queenan, K. Bush // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2007. – Vol. 20. – P. 440-458.
13. Lutgring, J. D. The Problem of Carbapenemase-Producing-Carbapenem-Resistant-Enterobacteriaceae Detection [Text] / J. D. Lutgring, B. M. Limbago // *Clinical Microbiology* – 2016. – № 54 (3). – P. 529-34.
14. Nordmann, P. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae world wide [Text] / P. Nordmann, L. Poirel // *Clinical Microbiology Infections* – 2014. – № 20 (9). – P. 821-830.
15. Bush, K. A. Functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure [Text] / K. Bush, G. A. Jacoby, A. A. Medeiros // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 1995. – Vol. 39. – P. 1211-1233.
16. Queenan, A. M. Carbapenemases: the versatile betalactamases [Text] / A. M. Queenan, K. Bush // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2007. – Vol. 20. – P. 440-458.
17. Woodford, N. Multiresistant Gramnegative bacteria: the role of high risk clones in the dissemination of antibiotic resistance [Text] / N. Woodford, J. F. Turton, D. M. Livermore // *FEMS Microbiology Reviews*. – 2011. – Vol. 35. – P. 736-755.
18. Miriagou, V. Acquired carbapenemases in gramnegative bacterial pathogens: detection and surveillance issues [Text] / V. Miriagou, G. Cornaglia, M. Edelstein [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection*. - 2010. – Vol. 16. – P 112-122.
19. Hlumcher, F. S. Multiresistant infections: relevance, definition, mechanisms, prevailing pathology, treatment, prevention [Text] / F. S. Hlumcher, S. O. Dubrov, Y. L. Kuchyn // *Interdepartmental Medical Journal «Science & Practice»*. – 2014. – № 1 (2). – P. 129-149.
20. Finley, R. L. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment [Text] / R. L. Finley, P. Collignon, D. G. Larsson [et al.] // *Clinical Infection Diseases* – 2013. – Vol. 57. – P. 704-710.

UDC 579.25:615.281.015.8]:616-078:57.088

DETERMINATION OF THE SPECTRUM OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES HAVE PHENOTYPIC RESISTANT STRAINS OF PARIETAL INTESTINAL MICROBIOTA IN RATS BY RT-PCR

Bukina Y.V., Kamyshny A.M., Polishchuk N.N.

Introduction. The problem of formation of bacterial resistance to glycopeptides and beta-lactam antibiotics (cephalosporins and carbapenems) are used worldwide for the treatment of severe community acquired and nosocomial infections, especially caused by polymicrobial flora has become global and is a major factor limiting the effectiveness of antibiotic therapy. In this regard, the study of genetic microbial resistance determinants allows not only to carry out an effective antibiotic therapy, but also to identify two main processes leading to the development of epidemiologically significant events: the introduction of the agent in the risk population from the outside and in

situ pathogen (spontaneous genetic drift) targeted restructuring of the population. Therefore, the aim of our study was to investigate the resistance genes to carbapenems, cephalosporins, glycopeptides have clinically important phenotype of resistant strains of microorganisms families Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Bacteroidaceae, Enterococcaceae, Peptostreptococcaceae. **Materials and methods.** As a material for PCR studies 712 phenotypically resistant strains of microorganisms isolated from 80 rats "Wistar" line in microbiological study microflora of the wall were used. During the investigation 474 isolates of bacteria of the family *Enterobacteriaceae*, 39 - *Pseudomonadaceae*, 71 - *Bacteroidaceae*, 96 - *Enterococcaceae*, 32 - *Peptostreptococcaceae* were studied. Isolation of DNA from bacteria in the study was performed using reagents "DNA-Express" ("Litekh", Russia). For the detection of resistance genes by PCR in real time (RT-PCR) reagent kits "FLUOROPOL-RV" ("Litekh", Russia) were used. During the experiment, the *VIM* genes, *OXA-48*, *NDM*, *KPC*, responsible for the resistance of microorganisms to carbapenems, *CTX-M* - resistance to cephalosporins, as well as genes *Van A* and *van B*, the development of resistance to glycopeptides (vancomycin and teicoplanin) were determined. Analysis of the results of amplification was performed using the program Bio-Rad CFX Manager 3.0 under the "Guidelines on the application of Fluoropol format sets - PB." **Results and discussion.** During the study of 474 cultures of microorganisms - representatives of the *Enterobacteriaceae* family, *KPC* - in 7,81% and *OXA-48* - in 8,44%, *VIM* detected in 14,14% of the strains, *NDM* – 8,23% in the studied crops. These genes were detected in *E.coli* strains (6,74%, 7,87%, 14,61%, 4,49%, respectively), from microorganisms of the genus *Klebsiella* (13,85%, 1,54%, 15,38% , 12,31%), *Salmonella* (7,03%, 10,16%, 13,28%, 8,59%), *Enterobacter* (4,76%, 14,29%, 15,87%, 4,76 %), *Proteus* (7,89%, 10,53%, 14,47%, 6,58%) and *Shigella* (7,55%, 3,77%, 11,32%, 15,09%). In the study of *Bacteroides* (*Bacteroides spp.*) Genes *KPC*, *OXA-48*, the *VIM* and *NDM* were identified in 9,86%, 4,23%, 9,86% and 12,68% of the strains, respectively. PCR study of 39 isolates of *P.aeruginosae* showed the presence of only *VIM* gene and only 15,38% of the cultures. In the family *Enterococaceae* and *Peptostreptococaceae* these genes were not found. According to Russian researchers have identified strains of *Enterobacteriaceae* only genes *OXA-48* (43,7%) and *VIM* (17,6%), and *VIM* gene detection rate in *P.aeruginosae* was 62.9%. *CTX-M* gene was detected in 10,9% of the strains of the family *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella spp.* - 13,85%, *Salmonella spp.* - 14,6%, *Enterobacter spp.* - 7,93%, *Proteus spp.* - 6,58% , *Shigella spp.* - 13,21%), *Bacteroidaceae* - 15,49%, *Peptostreptococaceae* - 6,25%. In *Pseudomonas* and *Enterococcus CTX-M* is not revealed. At the same time, according to the literature, the frequency of detection of gene *CTX-M* in the family *Enterobacteriaceae* strains circulating in the Russian Federation, in some regions reaches 100%, thus, the gene is not detected in enterococci and *Pseudomonas*. In *Enterococcaceae*

phenotypically resistant strains of microorganisms of the family genes in identifying *Van A* and *Van B* 11,46% and 6,25% causing resistance to glycopeptides, particularly vancomycin. Thus, of the 46 strains studied *E.faecalis*, 10,87% of isolates possessed *Van A* genes and 8,7% - *Van B*. Out of 50 studied cultures *E.faecium* 12% were in their genotype *Van A* and 4% - *Van B*. However, the frequency of detection of genes *Van A* and *Van B* in *E.faecalis* strains circulating in Russia, 1,7% and 2,2%, while *E.faecium* - 9,3% and 11,5% respectively. Bacteria of the family *Peptostreptococcaceae* these genes were not identified. During the molecular genetic studies we have not detected phenotypically resistant strains that have combined carbapenemases activity.

Conclusions. The findings of the research results indicate the presence of carbapenem resistance genes in strains of microorganisms families *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* and *Pseudomonadaceae* (*P.aeruginosae*), to cephalosporins - *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae* and *Peptostreptococcaceae*, vancomycin - from family *Enterococcaceae* bacteria. Phenotypically resistant strains that have combined carbapenemases activity, not revealed. Despite the wide range of activity of appointment carbapenems, cephalosporins and vancomycin should take into account the results of determination of resistance genes causing resistance to these drugs. It is advisable to creating circulation monitoring program of antibiotic-resistant strains, including those with carbapenemases activity in humans and in the environment.

Keywords: antibiotic resistance, gene indication, resistance genes, RT-PCR, parietal microflora.