

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-ОСЕТИНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
СОВЕТ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ И СПЕЦИАЛИСТОВ СОГМА
ИНСТИТУТ БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВЛАДИКАВКАЗСКОГО
НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК



МОЛОДЫЕ УЧЕНЫЕ – МЕДИЦИНЕ

**МАТЕРИАЛЫ XV НАУЧНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ И СПЕЦИАЛИСТОВ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ**

20-21 мая 2016 года

Владикавказ

2016

той или иной инфекции, при этом подтверждено у 89% лиц детского возраста (из них у 78% – признаки цитомегаловирусной инфекции).

Анализ распространенности данной патологии по принципу эколого-социального зонирования показал, что с наибольшей частотой левосторонние расщелины встречаются в Изобильненском, Александровском, Георгиевском, Новоалександровском, Андроповском, Туркменском, Красногвардейском, Шпаковском районах края и городах Ставрополе и Невинномысске.

В результате проведенной работы составлены схемы территориального зонирования Северо-Кавказского федерального округа по данной нозологии и подготовлены документы, регламентирующие работу специалистов первичного звена, сталкивающихся с пациентами с данными формами патологии.

Литература

1. Дементьева Д.М., Бобровский И.Н. Заболеваемость по основным классам болезней у детей в Ставропольском крае и их связь с экологическими факторами// Сибирский онкологический журнал. 2010. Приложение № 1. С.37-38

2. Дементьева Д.М., Бобровский И.Н., Францева В.О. Медико-демографические показатели здоровья взрослого населения в Ставропольском крае// Современные наукоемкие технологии. 2010. № 2. С. 78-79.

3. Дементьева Д.М., Бобровский И.Н. Смертность от врожденных пороков развития в Ставропольском крае //Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2009. № 7. С. 16.

УДК 579.61

АНАЛИЗ МОБИЛЬНОСТИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ЛАКТОБАЦИЛЛ

Анисимова Е.А., Ахатова Д.Р., Потапова А.С., Яруллина Д.Р.

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, г. Казань,
кафедра микробиологии (Зав. кафедрой – проф. Ильинская О.Н.;
научный руководитель – доц. Яруллина Д.Р.)
E.mail: elizaveta-real@mail.ru*

Антибиотикорезистентность (АР) пробиотических штаммов – необходимое условие их эффективности при лечении и профилактике антибиотикоассоциированной диареи, однако существует риск распространения генов АР в микробиоме кишечника. В работе у 34 штаммов рода *Lactobacillus*, выделенных из кисломолочных продуктов, пробиотиков и фекалий людей, определены уровни устойчивости к 12 клинически распространенным антибиотикам различной природы. С помощью метода ПЦР выполнен поиск генетических детерминант АР в геномной и плазмидной ДНК лактобацилл. Проверена возможность горизонтального транспорта генов устойчивости к эритромицину и тетрациклину от лактобацилл к условно-патогенным бактериям гастроинтестинальной микробиоты при трансформации. У лактобацилл *L. fermentum* 5-1, выделенных из ряженки, обнаружена способность передавать гены устойчивости к тетрациклину бактериям *Citrobacter freundii* при трансформации с помощью электропорации, следовательно, данный штамм является потенциальным источником генов

устойчивости к антибиотикам в микробиоме человека и непригоден для прямого использования в пробиотиках и пищевом производстве.

STUDY OF TRANSFERABLE ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES IN PROBIOTIC LACTOBACILLI

Anisimova E.A., Ahatova D.R., Potapova A.S., Yarullina D.R.

Antibiotic resistance (AR) is an important prerequisite for the effectiveness of probiotic strain at treatment and prevention of antibiotic-associated diarrhea. Yet, such probiotics are a reservoir of AR genes with the risk of transferring to other bacteria of intestinal microbiome. The levels of resistance of 34 strains of *Lactobacillus* isolated from human faeces, commercial probiotics and sour milk products to 12 antibiotics of various nature were determined. Using PCR AR genes were examined in the genomic and plasmid DNA of lactobacilli. Occurrence of horizontal gene transfer of erythromycin and tetracycline resistance genes from lactobacilli to pathogenic bacteria was studied. It was shown that *L. fermentum* 5-1 isolated from "ryazhenka" (fermented baked milk) was able to transfer tetracycline resistance gene to *Citrobacter freundii* during transformation with electroporation, and thus was considered as a potential vehicle of AR genes and could not be used in probiotics and food industry.

Бактерии рода *Lactobacillus* входят в состав естественной микробиоты кишечника человека, где выполняют ряд полезных для здоровья функций [1]. Данная особенность обусловила их широкое применение в пробиотиках и продуктах функционального питания. Бактерии этой группы имеют статус GRAS (Generally Regarded As Safe) и включены в список QPS (Qualified Presumption of Safety) Евросоюза [2], поэтому без ограничения используются в пищевой и фармацевтической промышленности. Тем не менее, показано, что используемые в пробиотикотерапии устойчивые к антибиотикам бактерии потенциально могут служить источником распространения генов антибиотикорезистентности (АР), если последние локализованы на плаزمидах и транспозонах. Наиболее подвержены горизонтальному транспорту гены устойчивости к хлорамфениколу, эритромицину и тетрациклину [3]. Лактобациллы как правило чувствительны к этим антибиотикам [3, 4, 5], но иногда у них обнаруживаются генетические детерминанты устойчивости к данным препаратам. Так, у лактобацилл выявлены гены устойчивости к тетрациклину tet(W), tet(M), tet(S), tet(O), tet(Q), tet(K), tet(L) [6] и описана их потенциальная мобильность [7, 8]. Также обнаружен ряд генов устойчивости к эритромицину (erm(B) [9, 10, 8], erm(A), erm(C), erm(T) [9]) и доказана возможность их конъюгативного переноса [6, 7].

Целью данной работы является выявление генетических детерминант устойчивости к клинически распространенным антибиотикам у потенциально пробиотических штаммов лактобацилл и оценка возможности их передачи условно-патогенной гастроинтестинальной микрофлоре.

Материалы и методы: В работе использовали 34 штамма лактобацилл, выделенные нами ранее из фекалий людей, кисломолочных продуктов и коммерческих пробиотиков [11]. Диско-диффузионным методом [МУК 4.2.1890-04] определили профили антибиотикорезистентности к 12 антибиотикам различной природы: b-лактамам, аминогликозидам, макролидам, клиндамицину, ванкомицину, рифампицину, ципрофлоксацину, тетрациклину и хлорамфениколу. Геномную ДНК бактерий выделяли фенол-хлороформным методом [12], плазмидную ДНК – методом щелочного лизиса [12]. Гены АР амплифицировали с помощью ПЦР с использованием специфических праймеров: для генов устойчивости к тетрациклину – tet(M), tet(W), tet(S), tet(K), tet(L), к эритромицину – erm(B1), erm(B2), erm(A), erm(C), erm(T), mefA, mefE. Для визуализации продуктов амплификации использовали электрофорез в горизонтальном агарозном геле. Возможность передачи генов АР проверяли методом трансформации бактерий-реципиентов геномной и плазмидной ДНК лактобацилл. В качестве реципиентов генетических детерминант устойчивости к антибио-

тикам использовали бактерии: *Escherichia coli*, *Acinetobacterbaumannii*, *Citrobacterfreundii* (коллекция Института медицинской микробиологии г. Гиссен, Германия). Для повышения компетентности использовали предобработку клеток раствором CaCl_2 [12] и электропорацию. Приобретенные гены AP в геномах бактерий-реципиентов регистрировали с помощью метода ПЦР с использованием специфических праймеров.

Результаты и обсуждения: У исследованных лактобацилл обнаружена высокая устойчивость к ципрофлоксацину и ванкомицину, что полностью согласуется с данными литературы – устойчивость к этим антибиотикам среди лактобацилл встречается достаточно часто [13,3,4,5] и, вероятно, является природной [12]. Также лактобациллы демонстрировали высокую устойчивость к аминогликозидным антибиотикам, что ранее было показано в работах [3,4,14]. Пониженную чувствительность бактерий рода *Lactobacillus* к аминогликозидам также считают природной и связывают с низкой проницаемостью антибактериальных препаратов этой группы через мембраны лактобацилл [4,13,14]. У исследованных лактобацилл распространена чувствительность к макролидам (эритромицину), линкозаминам (клиндамицину) и тетрациклину. В целом о бактериях рода *Lactobacillus* известно, что они чувствительны к ингибиторам биосинтеза белка [4,5,13], кроме аминогликозидов [6]. Большинство исследованных лактобацилл также демонстрировали чувствительность к рифампицину и б-лактамам (ампициллину).

Горизонтальному транспорту особенно подвержены гены устойчивости к эритромицину (*Erm*) и тетрациклину (*Tet*) [3]. Поэтому особую тревогу вызывает обнаружение резистентности к *Tet* у штаммов *L. fermentum* 3-4 и *L. fermentum* 5-2, выделенных из кисломолочных продуктов, и штаммов *L. fermentum* HF-A1, *L. fermentum* HF-B2 и *L. fermentum* HF-A4, выделенных из фекалий человека. У штамма *L. fermentum* 5-1, выделенного из ряженки, обнаружена устойчивость к *Erm* и промежуточная устойчивость к *Tet*. В геномах антибиотикорезистентных лактобацилл с помощью ПЦР-анализа было проверено наличие 12 генов, кодирующих устойчивость к *Erm* и *Tet*. В результате были обнаружены гены *ermB* и *ermA* в геномной ДНК двух штаммов лактобацилл и целый ряд генов AP (*tetM*, *tetK*, *ermA*, *ermC*, *mefA*) – в плазмидной ДНК. У некоторых штаммов, не проявляющих устойчивость к *Erm*, выявлены молчащие гены *ermA*, *ermC* и *mefA*. При электропорации чувствительных к *Tet* клеток *C. freundii* плазмидной ДНК *Tet*-резистентных лактобацилл *L. fermentum* 5-1 была обнаружена возможность передачи генетических детерминант устойчивости к *Tet* (рисунок 1). В остальных вариантах эксперимента горизонтальный транспорт генов AP лактобацилл не зафиксирован.

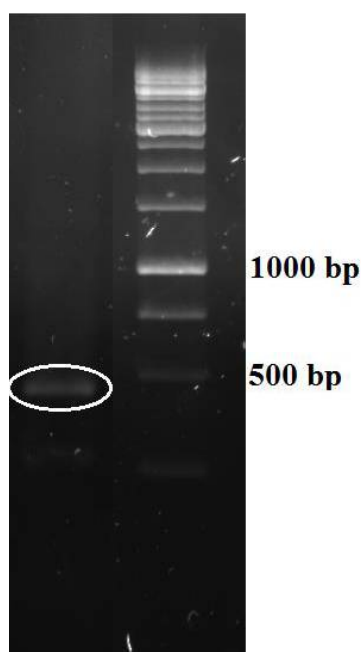


Рисунок 1. Обнаружение гена *tetK* в геноме *Citrobacterfreundii* после введения плазмидной ДНК *Lactobacillusfermentum* 5-1 методом трансформации с электропорацией

Выводы: Впервые получены данные об устойчивости лактобацилл, выделенных нами из кисломолочных продуктов, пробиотиков и фекалий человека, к клинически распространенным антибиотикам. Показано, что штамм *L. fermentum* 5-1 из ряженки является непригодным для использования в пробиотиках и пищевом производстве, так как может служить источником генов устойчивости к антибиотикам в микробиоме человека. Полученные результаты необходимо учитывать при составлении обоснованных тактических схем практического применения пробиотических лактобацилл в соответствии с критериями безопасности.

Литература

1. Giraffa G., Chanishvili N., Widyastuti Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology // *Res. Microbiol.* 2010; 161(6):480-487.
2. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2012 update), // *EFSA J.* 2012; 10(12):3020.
3. Danielsen M., Wind A. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents // *Int J Food Microbiol.* 2003; 82: 1: 1-11.
4. Kirtzalidou E., Pramateftaki P., Kotsou M., Kyriacou A. Screening for lactobacilli with probiotic properties in the infant gut microbiota // *Anaerobe* 2011; 17: 6: 440-443.
5. Rojo-Bezares B., Sáenz Y., et al. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine // *Int J Food Microbiol* 2006; 111: 3: 234-240.
6. Gueimonde M., Sánchez B., et al Antibiotic resistance in probiotic bacteria// *Front Microbiol.* 2013; 4: 202.
7. Feld L., Schjorring S., et al A. Selective pressure affects transfer and establishment of a *Lactobacillus plantarum* resistance plasmid in the gastrointestinal environment // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2008; 61: 845– 852.
8. Zonenschain D., Rebecchi A., Morelli L. Erythromycin- and tetracycline-resistant lactobacilli in Italian fermented dry sausages // *J Appl Microbiol.* 2009; 107(5):1559-68
9. Egervarn M., Roos S., Lindmark H. Identification and characterization of antibiotic resistance genes in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum* // *Journal of Applied Microbiology* 2009; 107: 1658–1668.
10. Jacobsen L., Wilcks A., et al. Horizontal transfer of tet(M) and erm(B) resistance plasmids from food strains of *Lactobacillus plantarum* to *Enterococcus faecalis* JH2-2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats // *FEMS Microbiol.* 2007; 59(1):158-66.
11. Бруслик Н.Л., Ахатова Д.Р., Тойменцева А.А., Абдулхаков С.Р., Ильинская О.Н., Яруллина Д.Р. Оценка лекарственной устойчивости пробиотических лактобацилл // *Антибиотики и химиотерапия.* 2015; 60: 3-4: 6-13.
12. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual* (1989)// Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
13. Katla A.K., Kruse H., Johnsen G., Herikstad H. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int J Food Microbiol* 2001; 67: 1-2: 147-152.
14. Charteris W.P., Kelly P.M., Morelli L., Collins J.K. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J Food Prot* 1998; 61: 12: 1636-1643.