

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Бухарин О.В., Иванова Е.В., Здвижкова И.А., Перунова Н.Б.

АНАЛИЗ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *ESCHERICHIA COLI* С ГЕНЕТИЧЕСКИМИ ДЕТЕРМИНАНТАМИ *CLBBN* И *IUCBC*

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения РАН, ФГБУН Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН, 460014, г. Оренбург, Россия

В работе представлен анализ антибиотикорезистентности копро- ($n=62$) и уроштаммов *Escherichia coli* ($n=32$), носителей генетических детерминант аэробактина (*iucBC*) и колибактина (*clbBN*). Антибиотикорезистентность культур определяли тест-системой Сенсилатест Г-(I) (Erba Mannheim, Чехия), также штаммы протестированы на БЛРС. Гены, кодирующие синтез генотоксина – колибактина (*clbBN*) и сидерофора – аэробактина (*iucBC*), выявляли методом мультиплексной ПЦР с использованием оригинальных праймеров. Фенотипическую активность к продукции сидерофоров – посево штаммов на CAS-агар. В результате было установлено, что распространенность генетических детерминант *clbBN*, *iucBC* и их сочетаний встречается у $90,0 \pm 1,5\%$ копроштаммов и у $66,0 \pm 1,8\%$ уроштаммов. У $75,0-83,0\%$ штаммов генетические детерминанты соотносились с фенотипической активностью бактерий. Выявлены особенности устойчивости к антибиотикам среди культур *E. coli* с исследуемыми генетическими детерминантами. Так, копроштаммы, положительные по двум детерминантам (*clbBN+*, *iucBC+*) были резистентны к $67,0 \pm 4,2\%$ антимикробным препаратам, а уроштаммы (*iucBC+*) – к $91,7 \pm 2,2\%$. Установлен высокий процент резистентных штаммов среди копроштаммов (*clbBN+*) к тетрациклину ($52,0 \pm 5,2\%$), ампициллину и цефазолину ($65,0 \pm 4,8\%$), ($p \leq 0,05$) и уроштаммов (*iucBC+*) – к тетрациклину, гентамицину, ампициллину, цефазолину, азтреонам, цефуроксиму и ципрофлоксацину ($52,4 - 76,2\%$), ($p \leq 0,05$). Распространение антибиотикорезистентных штаммов *E. coli* может быть связано со способностью бактерий продуцировать сидерофоры – низкомолекулярные высокоаффинные хелаторы железа, необходимого для адаптации и длительного выживания микробных клеток в организме человека. Важно своевременно выявлять с помощью экспресс-методов антибиотикорезистентные штаммы энтеробактерий, обладающие хелатирующими факторами.

Ключевые слова: *E. coli*; антибиотикорезистентность; аэробактин; колибактин; адаптация; экспресс-метод.

Для цитирования: Бухарин О.В., Иванова Е.В., Здвижкова И.А., Перунова Н.Б. Анализ антибиотикорезистентности клинических изолятов *Escherichia coli* с генетическими детерминантами *clbBN* и *iucBC*. Клиническая лабораторная диагностика. 2023; 68 (8): 489-495. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-8-489-495>.

Для корреспонденции: Иванова Елена Валерьевна, д-р мед. наук, доц., зав. лаб. инфекционной симбиологии; e-mail: walerewna13@gmail.com

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.05.2023

Принята к печати 15.05.2023

Опубликовано 01.08.2023

Bukharin O.V., Ivanova E.V., Zdvizhkova I.A., Perunova N.B.

ANALYSIS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF CLINICAL *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES WITH GENETIC DETERMINANTS *CLBBN* AND *IUCBC*

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg Federal Research Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, 460014, Orenburg, Russia

The paper presents an analysis of the antibiotic resistance of copro ($n=62$) and urostrains of *Escherichia coli* ($n=32$), carriers of the genetic determinants of aerobactin (*iucBC*) and colibactin (*clbBN*). The antibiotic resistance of the cultures was determined using the Sensilatest G-(I) test system (Erba Mannheim, Czech Republic), and the strains were also tested for ESBL. Genes encoding the synthesis of genotoxin, colibactin (*clbBN*) and siderophore, aerobactin (*iucBC*), were detected by multiplex PCR using original primers. Phenotypic activity for the production of siderophores - sowing strains on CAS-agar. As a result, it was found that the prevalence of genetic determinants *clbBN*, *iucBC* and their combinations occurs in $90.0 \pm 1.5\%$ of coprostrains and in $66.0 \pm 1.8\%$ of urostrains. In $75.0-83.0\%$ of the strains, genetic determinants correlated with the phenotypic activity of bacteria. Peculiarities of resistance to antibiotics among *E. coli* cultures with studied genetic determinants were revealed. Thus, coprostrains positive for two determinants (*clbBN+*, *iucBC+*) were resistant to $67.0 \pm 4.2\%$ of antimicrobial drugs, and urostrains (*iucBC+*) were resistant to $91.7 \pm 2.2\%$. A high percentage of resistance among coprostrains (*clbBN+*) to tetracycline ($52.0 \pm 5.2\%$), ampicillin and cefazolin ($65.0 \pm 4.8\%$), ($p \leq 0.05$) and urostrains (*iucBC+*) to tetracycline was established, gentamicin, ampicillin, cefazolin, aztreonam, cefuroxime and ciprofloxacin ($52.4 - 76.2\%$), ($p \leq 0.05$). The spread of antibiotic-resistant strains of *E. coli* may be associated with the ability of bacteria to produce siderophores, low-molecular-weight, high-affinity iron chelators necessary for adaptation and long-term survival of microbial cells in the human body. It is important to timely detect, using modern express methods, antibiotic-resistant strains of enterobacteria that have chelating factors.

Key words: *E. coli*, antibiotic resistance, aerobactin, colibactin, adaptation, express method.

For citation: Bukharin O.V., Ivanova E.V., Zdvizhkova I.A., Perunova N.B. Antibiotic resistance analysis of coprostrains and urostrains of *Escherichia coli*, carriers of genetic determinants *clbBN*, *iucBC*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (8): 489-495 (in Russ.) DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-8-489-495>

For correspondence: *Ivanova Elena Valerievna*, Doctor of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Laboratory of Infectious Symbiology; e-mail: walerevna13@gmail.com

Information about authors:

Bukharin O.V., <https://orcid.org/0000-0002-6039-5265>;

Ivanova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-4974-8947>;

Zdvizhkova I.A., <https://orcid.org/0000-0003-2185-2408>;

Perunova N.B., <https://orcid.org/0000-0002-6352-8879>.

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 03.05.2023

Accepted 15.05.2023

Published 01.08.2023

Введение. Проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов одна из наиболее серьезных проблем современности. Во всем мире регистрируются штаммы представителей семейства *Enterobacteriaceae* с множественной лекарственной устойчивостью, а также панрезистентностью, что становится глобальной проблемой [1]. Поскольку энтеробактерии являются одними из наиболее распространенных возбудителей как внебольничных, так и внутрибольничных инфекций, в том числе инфекций мочевыводящих путей и желудочно-кишечного тракта, перитонита, менингита и сепсиса [2]. Штаммы *E. coli* играют важную роль в формировании резистентных бактериальных популяций у широкого круга хозяев, и часто используются в качестве биоиндикатора для мониторинга устойчивости к противомикробным препаратам из-за их способности легко приобретать факторы резистентности [3]. Микробиологический мониторинг эпидемически значимых антибиотикорезистентных штаммов в природных экосистемах, включая организм человека, позволяет повысить качество решения вопросов инфекционной клиники и разработать новые подходы к выявлению факторов, способствующих распространению антибиотикорезистентных штаммов в микробной популяции.

Показано, что устойчивость к антибактериальным препаратам представителей семейства *Enterobacteriaceae* связана с наличием у них мобильных генетических элементов, таких как плазмиды, которые также содержат гены факторов вирулентности: токсины, спайки (фимбрии), липополисахариды, полисахаридные капсулы, протеазы и сидерофоры [4]. В нашей работе мы обратили внимание на генетические детерминанты, связанные с продукцией хелатирующих факторов – колибактина и аэробактина. Многие представители семейства *Enterobacteriaceae* продуцируют различные по структуре сидерофоры - низкомолекулярные высокоаффинные хелаторы железа и других биологических металлов [5].

Для синтеза хелатирующих молекул *E. coli*, таких как сидерофоры (энтеробактин, сальмохелины и иерсиниабактин) и генотоксин (колибактин), необходимы 4'-фосфопантетирилтрансферазы (4'-phosphopantetheinyl transferase (PPTase)). Только две PPTase были четко идентифицированы: EntD и ClbA. Ген, кодирующий EntD, является частью основного

генома *E. coli*, тогда как ClbA кодируется на острове патогенности *pks*, который необходим для синтеза колибактина [6]. Синтез колибактина - пептид-поликетид обеспечивается кластером поликетидсинтазного генного островка *pks*, первичными краевыми маркерами которого являются гены *clbB* и *clbN*. Аэробактин представляет собой низкомолекулярное производное лизина и лимонной кислоты, продукция которого кодируется опероном *iucABCdiuA*, локализованным в хромосоме кишечных палочек и клебсиелл, включающим 5 генов, из которых два – *iucB* и *iucC* – непосредственно участвуют в синтезе сидерофора.

В организме человека хелатирующие молекулы способны извлекать железо из комплексов с белками, выполняющими функцию неспецифической защиты млекопитающих от инфекций. Бактериальные сидерофоры и генотоксин играют важную роль в вирулентности и способны оказывать токсическое действие на клетки хозяина. Сидерофоры бактерий выполняют сигнальную функцию, регулируя как свой собственный синтез, так и синтез других факторов вирулентности [7]. Вместе с тем, появляется все больше доказательств того, что хелатирующие факторы энтеробактерий имеют решающее значение в процессах колонизации различных биотопов хозяина, способствующих повышению их адаптационного потенциала и выживанию в организме человека [8]. Понимание взаимосвязей между устойчивостью к антибиотикам и факторами, обеспечивающими распространение энтеробактерий, может иметь решающее значение на этапе выявления эпидемически значимых антибиотикорезистентных штаммов в природных экосистемах. Цель исследования – провести анализ антибиотикорезистентности среди клинических изолятов *Escherichia coli* с генетическими детерминантами *clbBN*, *iucBC*, кодирующими синтез колибактина и аэробактина.

Материал и методы. В работе использованы клинические изоляты *Escherichia coli*, выделенные от 94 пациентов (от 18 до 50 лет) с патологией желудочно-кишечного тракта при обследовании на дисбиоз кишечника (копроштаммы, $n=62$) и из мочи пациентов с инфекцией мочевыводительной системы (уроштаммы, $n=32$). Культуры были идентифицированы с помощью биохимического метода с использованием тест-системы «Lachema 24» (Pliva-Lachema, Чехия)

и с помощью времяпролетной масс-спектрометрии (масс-спектрометр MALDI ToF MS серии Microflex LT с программным обеспечением Maldi BioType 3,0 (Bruker Daltonics, Германия).

Поиск наиболее консервативных участков нуклеотидных последовательностей и подбор праймеров видоспецифичного диапазона для выявления отобранных генов, кодирующих синтез гентокина-колибактина (*clbBN*) и сидерофора-аэробактина (*iucBC*), осуществлен на основе базы данных «GenBank» («National Library of Medicine», США). Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей изучаемых генов и предполагаемых продуктов их трансляции, выровненных по методу ClustalW, в виде дендрограмм выполнен с применением пакета программного обеспечения «Lasergene 7.1» («DNASTAR, Inc.», США). Верификация специфичности полученных олигонуклеотидов производилась с помощью сервиса Standard Nucleotide BLAST («National Library of Medicine», США).

Реакция ПЦР проводилась в ДНК-амплификаторе «Терцик МС-2» (Россия) в режиме ускоренного регулирования температуры. Получаемые ампликоны подвергались агарозному гель-электрофорезу (BioRad, Sub-Cell GT, США) [9]. Регистрация результатов производилась на основе присутствия полос люминесценции бромида этидия в агарозном геле, расположенных в диапазоне молекулярных масс, соответствующих локализации маркерных фрагментов рBS/Msp (Лаборатория ООО «Медиген», Россия). Скрининг микроорганизмов на способность секретировать сидерофоры в условиях голодания по железу производился путем посева на специфическую среду, содержащую краситель хром азурол S (CAS агар) [10].

Определение антибиотикорезистентности штаммов *E. coli* проводили с использованием тест-системы Сенсилатест Г-(I) (Erba Mannheim, Чехия). У штаммов была определена чувствительность к 12 антибио-

тикам: тетрациклину, хлорамфениколу, гентамицину, ампициллин/сульбактаму, ампициллину, амикацину, цефазолину, цефуроксиму, азтреонам, колистину, триметоприм сульфаметоксазолу, ципрофлоксацину. При характеристике антибиотикочувствительности микроорганизмов использовали общепринятые показатели: «чувствительные» (S), «умеренно резистентные» (I), «резистентные» (R).

Все изоляты энтеробактерий, у которых была выявлена резистентность (категория умеренно резистентный или резистентный) к одному из тестируемых цефалоспоринов, были протестированы на выявление бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) методом «двойных дисков» с использованием набора дисков производства ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» (Санкт-Петербург). Расширение зоны подавления роста между одним или несколькими дисками с оксимино-β-лактамами и диском, содержащим клавулановую кислоту, указывало на наличие БЛРС.

Результаты проведенных исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel (Microsoft Office Excel 2010, США) и «STATISTICA 10.0» (StatSoft, TIBCO, США), включая методы параметрического (критерий Стьюдента), непараметрического (U-критерий Манна-Уитни) анализов.

Результаты. Для выявления генетических детерминант энтеробактерий были сконструированы оригинальные праймеры для выявления детерминант аэробактина (*iucBC*) и колибактина (*clbBN*) (см. таблицу) [11]. С помощью тест-системы ПЦР подбор праймеров видоспецифичного диапазона проводили таким образом, чтобы их отжиг происходил при одном температурном режиме. Это позволило за счет мультиплекс-реакции за один цикл амплификации провести скрининг детерминант *iucBC* и *clbBN* одновременно.

Перечень используемых в работе генетических детерминант сидерофоров

Генетические детерминанты	Гены	Используемые затравки	Длина ампликонов (н.п.)
Аэробактин	<i>iucB</i>	U: 5'-GTGGCCTGCATCTGCTGGTTGGTG-3' L: 5'-GTGCGCTGCGTACGTGGCTCFATTC-3'	115
	<i>iucC</i>	U: 5'-CGCTGGCTGAAACCGGATGAAAGT-3' L: 5'-ACCACCCGGAACAGTTGCGTAAAGC-3'	143
Колибактин	<i>clbB</i>	U: 5'-ACGGGAAATGCACAGAGGTCAC-3' L: 5'-TAGCGAACGCCGGTAAACAC-3'	200
	<i>clbN</i>	U: 5'-GCCCTGCACATCATCAATC-3' L: 5'-GCTACGCCATCGCTCCTAAATAC-3'	162

В результате было установлено, что 82,0±2,3% клинических изолятов эшерихий являются носителями данных генетических детерминант в различных комбинациях. Среди кишечных изолятов только у 11 (10,0±3,6%) культур не выявлялись генетические детерминанты хелатирующих факторов, тогда как в ДНК остальных штаммов (90,0±1,5%) распределение детерминант происходило следующим образом:

23 культуры (37,0±1,8%) были положительными по колибактину (*clbBN*+), 22 штамма (35,0±1,9 %) – по двум детерминантам (*clbBN*+, *iucBC*+) и 11 (18,0±2,1 %) штаммов – только по аэробактину (*iucBC*+) . То есть, среди кишечных изолятов преобладали в 72,0±2,5 % ($p \leq 0,05$) случаев штаммы с детерминантами *clbBN* и его сочетаний с *iucBC*.

Выявленная широкая распространенность гене-

тических детерминант *clbBN* и *iucBC* среди клинических изолятов кишечных палочек, подтверждают решающее значение хелатирующих факторов в способности бактериальных клеток к захвату железа, что повышает жизнеспособность микроорганизмов внутри организма человека. Вместе с тем, наличие у трети копроштаммов комбинации *clbBN* и *iucBC* свидетельствует о необходимости для бактерий синтезировать и/или использовать разные сидерофоры, включая энтеробактин, который обнаружен практически во всех штаммах *E. coli*, как комменсальных, так и патогенных.

Анализ генетических детерминант *clbBN* и *iucBC* среди уроштаммов показал, что в их ДНК в 66,0±1,8% случаев определяются только гены аэробактина (*iucBC+*), остальные культуры были отрицательными по исследуемым детерминантам. Известно, что аэробактин кодируется плазмидами вирулентности (ColV и ColBM) и его рецептор проявляет большую эффективность в захвате железа в условиях дефицита железа, чем другие сидерофоры [12]. Кроме того, некоторые данные свидетельствуют, что у аэробактина выявляется и ряд других преимуществ (растворимость, химическая стабильность и др.) [7], а это приобретает особенное значение в биотопах, бедных железом, таких как мочевыделительная система человека.

Анализ фенотипической способности штаммов секретировать сидерофоры показал наличие связи этого признака с исследуемыми генетическими детерминантами среди клинических штаммов эшерихий. Установлено, что способность штаммов *E. coli* секретировать сидерофоры в условиях голодания по железу в 75,0 - 83,0% случаев соотносится с наличием генетических детерминант (*clbBN*, *iucBC*), выявленных с помощью разработанных праймеров. Подобное соотношение наблюдается и при сравнении ряда других гено- и фенотипических профилей микроорганизмов на примере факторов персистенции стафилококков [13].

На следующем этапе работы была изучена резистентность клинических изолятов *E. coli* к антибиотикам. Устойчивость штаммов *E. coli* определялась с помощью тест-системы Сенсилатест Г- (I). Среди копроштаммов, носителей детерминант колибактина (*clbBN+*), высокий процент устойчивых штаммов отмечен к тетрациклину (52,0±5,2%), ампициллину и цефазолину (65,0±4,8%), ($p \leq 0,05$). Не более 17,0±3,1% культур были резистентны к хлорамфениколу и 34,7±3,6% культур — к триметоприм-сульфаметоксазолу. У копроштаммов с детерминантами аэробактина (*iucBC+*) более половины (54,5±4,1%) были устойчивы к ампициллину и около трети культур (27,3±2,2%) - к тетрациклину, хлорамфениколу, ципрофлоксацину и триметоприм-сульфаметоксазолу.

Культуры, положительные по двум детерминантам (*clbBN+*, *iucBC+*) были резистентны к 67,0±4,2% препаратов (к 8-ми из 12 наименований антимикробных препаратов), ($p \leq 0,05$). Однако, процент резистентных штаммов в популяции *E. coli* (*clbBN+*, *iucBC+*) отмечался в 13,63% - 36,4% случаев. Так, 13,63±4,5% штаммов были устойчивы к тетрациклину, цефурок-

симу, ципрофлоксацину и триметоприм-сульфаметоксазолу. Штаммы, резистентные к хлорамфениколу, ампициллину и цефазолину составляли 36,4±4,1% популяции кишечной палочки. У изолятов *E. coli*, не являющихся носителями генетических детерминант (*clbBN-*, *iucBC-*), только у 16,0±3,1% штаммов отмечалась устойчивость к ампициллину/сульбактаму, цефазолину, триметоприм-сульфаметоксазолу и ципрофлоксацину. Независимо от наличия генетических детерминант или их сочетаний, все копроштаммы были чувствительны к колистину и азтреонам.

Таким образом, среди копроштаммов *E. coli*, носителей одной из детерминант (колибактина или аэробактина), выявлена резистентность к менее половины изученных препаратов (41,7±4,3%, к 5 антибиотикам), а доля резистентных штаммов составляла 17,0-65,0% популяции. У штаммов кишечной палочки с комбинацией детерминант *clbBN* и *iucBC*, устойчивость отмечалась уже к восьми антибактериальным препаратам (67,0±4,2%), ($p \leq 0,05$), при этом доля антибиотикорезистентных штаммов в популяции была равна 13,63% - 36,4%.

В результате исследования антибиотикорезистентности уроштаммов *E. coli*, носителей детерминант аэробактина, установлено, что данные культуры чаще проявляли антибиотикоустойчивость среди клинических изолятов (к 91,7±2,2% препаратов, 11-ти из 12 антибиотиков), ($p \leq 0,05$) (рис. 1). Высокий процент резистентных штаммов (52,4 - 76,2%), ($p \leq 0,05$) зарегистрирован к тетрациклину, гентамицину, ампициллину, цефазолину, азтреонам, цефуроксиму и ципрофлоксацину.



Рис. 1. Антибиотикорезистентность уроштаммов *E. coli* к разным фармакологическим группам антибиотиков. *clbBN* - генетические детерминанты, кодирующие синтез колибактина, *iucBC* - генетические детерминанты, кодирующие синтез аэробактина.

Около четверти штаммов были не чувствительны к хлорамфениколу и триметоприм-сульфаметоксазолу, а также колистину. Известно, что колистин является препаратом резерва, подходящим для лечения опасных для жизни инфекций, вызываемых карбапенем-устойчивыми энтеробактериями (*E. coli*, *Klebsiella* и т.д.). Уроштаммы, не имеющие в ДНК детерминант

аэробактина, были устойчивы в $20,0 \pm 2,3\%$ случаев к тетрациклину, гентамицину, колистину и ципрофлоксацину, в $40,0 \pm 3,8\%$ - к ампициллину и в $60,0 \pm 5,1\%$ - к цефазолину.

Проанализирована устойчивость всех клиниче-

ских изолятов *E. coli* по методу двойных дисков. Заключение о продукции БЛРС делали в случае расширения зоны подавления роста между одним или несколькими дисками с цефалоспоридами III поколения и диском, содержащим клавулановую кислоту (рис 2).

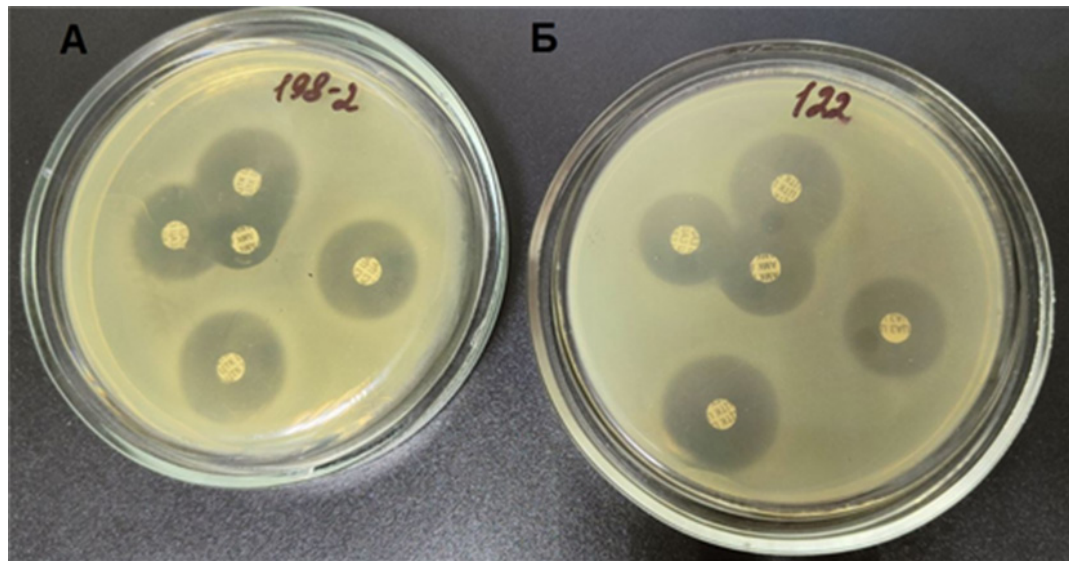


Рис. 2. Выявление β -лактамаз расширенного спектра действия у исследуемых штаммов *E. coli* методом «двойных дисков». А – положительный результат, Б – отрицательный результат.

В результате проведенной работы был выявлен только один копроштамм *E. coli* с расширением зоны подавления роста, что говорит о наличии у него продукции БЛРС. Данный штамм обладал двумя исследуемыми генетическими детерминантами - колибактина и аэробактина.

Обсуждение. Одной из важнейших проблем современного здравоохранения является преодоление антибиотикорезистентности бактерий, включая энтеробактерии. В современной литературе можно встретить ряд подходов к решению данной проблемы, направленных на создание новых природных антимикробных препаратов, модификацию химических радикалов известных антибиотиков и разработку ксенобиотиков [14]. Однако известно, что микробные клетки обладают удивительной пластичностью в отношении стрессовых воздействий среды, что позволило им выработать различные механизмы адаптации и выживания [15]. Высокая адаптивность микроорганизмов проявляется и в повышении устойчивости клетки за счет реализации специальных генетических программ, обеспечивающих механизмы накопления и передачи генов устойчивости между бактериями при действии антибиотиков [16].

Показано, что у грамотрицательных бактерий именно плазмиды участвуют в приобретении устойчивости к большинству классов антибиотиков, включая β -лактамы, аминогликозиды, тетрациклины, сульфаниламиды, триметопримы, макролиды, полимиксины и хинолоны [17]. Большинство генов, коди-

рующих бета-лактамазы, расположены на хромосоме, однако описаны ферменты, гены которых расположены на плазидах, в транспозонах или в генных каскадах. Сочетание генов различных бета-лактамаз на мультикопийных плазидах приводит к устойчивости к широкому спектру препаратов [14]. Плазмиды также содержат гены факторов вирулентности: токсины, фимбрии, липополисахариды, полисахаридные капсулы, протеазы и сидерофоры [3].

Из-за разнообразия механизма приобретения факторов резистентности и вирулентности штаммов, корреляция между устойчивостью и вирулентностью является сложной проблемой [18]. В литературе большинство работ указывает на связь факторов вирулентности и антибиотикорезистентности, однако мало что известно о типе и степени этой взаимосвязи и необходимы дальнейшие исследования для изучения этого вопроса. Кроме того, мы обратили внимание, что сидерофоры бактерий рассматриваются преимущественно с позиции факторов вирулентности. Вместе с тем, сидерофоры и другие хелатирующие факторы могут иметь решающее значение в формировании адаптивного потенциала энтеробактерий в организме хозяина и распространении антибиотикорезистентных штаммов в микробной популяции.

Настоящее исследование позволило провести анализ чувствительности к антибиотикам у клинических изолятов *Escherichia coli* с генетическими детерминантами *clbBN*, *iucBC*, кодирующими синтез хелатирующих факторов – колибактина и аэробактина.

Выбор генетических детерминант сидерофоров микроорганизмов был составлен на основании перечня изученных генов с доказанной ролью в инфекционных процессах. Колибактин относится к цикломодулинам, которые индуцируют хромосомную нестабильность и повреждение ДНК, развитие рака мочевого пузыря и колоректального рака. Вместе с тем, в настоящее время появляются данные, что колибактин - это еще и генотоксин бактерий кишечного микробиома, способный активировать резидентные профаги этих бактерий, что ведет к гибели микробной клетки. Кроме того, показано, что биосинтез колибактина требует ферментативной активности PPTase, которая в свою очередь опосредованно способствует продукции таких сидерофоров как энтеробактин, сальмохелины и иерсиниабактин [19].

Кроме того, все больше работ направлено на изучение патогенного потенциала микроорганизмов, синтезирующих сидерофор - аэробактин. Данный сидерофор через связывание железа переносит его внутрь бактериальной клетки для дальнейшего накопления в биотопах, бедных железом (таких, как мочевыводящий тракт), повышая устойчивость к действию антимикробных белков хозяина. Кроме того, в некоторых работах показана положительная корреляция между устойчивостью к антибиотикам, особенно к фторхинолонам и сульфонидами, и продукцией сидерофоров штаммами *E. coli* на уровне фенотипа [20]. Также, в работе была показана связь между повышенной устойчивостью к фторхинолонам и продукцией сидерофоров на примере культур *Enterococcus* [21].

Учитывая тот факт, что *E. coli* способны секретировать 4 известных сидерофора (энтеробактин, сальмохелины, аэробактин и иерсиниабактин) [6], предложенная нами мультиплекс ПЦР-реакция позволяет отобрать штаммы, носители генов кодирующих синтез аэробактина и связанные с колибактином сидерофоры: энтеробактина, сальмохелина и иерсиниабактина, тем самым охватывая весь спектр сидерофоров, синтезируемых кишечной палочкой. В проведенном исследовании была установлена широкая распространенность генетических детерминант *clbBN* и *iucBC* среди клинических изолятов кишечных палочек, подтверждающих решающее значение хелатирующих факторов в способности бактериальных клеток к захвату железа, что повышает жизнеспособность микроорганизмов внутри организма человека. Вместе с тем, полученные данные демонстрируют высокий уровень антибиотикорезистентности у штаммов, носителей генетических детерминант, кодирующих синтез колибактина и аэробактина.

Учитывая способность сидерофоров захватывать железо, хелаторы можно рассматривать как факторы, способствующие адаптации и длительному выживанию (персистенции) в микробной клетке в организме человека, и непосредственно участвующие в распространении штаммов в природных эконисах. Мониторинг генетических детерминант *clbBN* и *iucBC* у антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов позволит существенно сократить время анализа и повысить информативность выявления антибиотико-

резистентных штаммов *E. coli* с сидерофорпродуцирующим потенциалом, что может в дальнейшем быть использовано для разработки современных подходов к предотвращению распространения устойчивых клонов в микробных популяциях человека.

Заключение. Таким образом, знание и понимание взаимосвязей между устойчивостью к антимикробным препаратам и хелатирующими факторами бактерий, может иметь решающее значение на этапе выявления эпидемически значимых антибиотикорезистентных штаммов в организме человека. Вместе с тем, хелатирующие молекулы могут иметь решающее значение в формировании адаптивного потенциала энтеробактерий в организме хозяина и их распространении в микробной популяции. В связи с этим, необходимы современные экспресс-методы для выявления антибиотикорезистентных штаммов, обладающих сидерофорпродуцирующим потенциалом.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-6, 10, 18-21 см. REFERENCES)

- Кузнецова Д.А., Рыкова В.А., Подладчикова О.Н. Сидерофоры бактерий: структура, функции и роль в патогенезе инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:14-22. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-14-22.
- Кузнецова М.В., Гизатуллина Ю.С. Генетические профили адгезии и адгезивная изменчивость уропатогенных штаммов кишечной палочки. *Инфекция и иммунитет*. 2021; 11(3):481-90. DOI: 10.15789/2220-7619-GAP-1413.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984: 159-68.
- Андрющенко С.В., Здвизжкова И.А., Перунова Н.Б., Бухарин О.В., Котова Е.В., Степанова Т.Ф. и др. Система мониторинга патогенного энтеробактериального метода полимеразной цепной реакции. Патент РФ № 2662930С1; 2017.
- Кузнецова М.В., Гизатуллина Ю.С. Филогенетическое разнообразие и биологические свойства уропатогенных штаммов *Escherichia coli*. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2019; (3). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/filogeneticheskoe-raznoolobrazie-i-biologicheskie-svoystva-uropatogennyh-shtammov-escherichia-coli> (дата обращения: 21.04.2023).
- Пашкова Т.М., Попова Л.П., Карташова О.Л. Фено- и генотипический профиль стафилококков как возбудителей эндогенных инфекций. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН* 2019; (3). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/feno-i-genotipicheskii-profil-stafilokokkov-kak-vozbuditeley-endogennyh-infektsiy> (дата обращения: 21.04.2023).
- Ефименко Т.А., Терехова Л.П., Ефременкова О.В. Современное состояние проблемы антибиотикорезистентности патогенных бактерий. *Антибиотики и химиотерапия*. 2019; 64 (6):64-8. DOI: 10.24411/0235-2990-2019-10033.
- Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М.: Медицина; 2005.
- Земляноко О.М., Рогоза Т.М., Журавлева Г.А. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам. *Экологическая генетика*. 2018; 16(3):4-17. DOI: 10.17816/ecogen1634-17.
- Зубарева В.Д., Соколова О.В., Безбородова Н.А., Шкуратова И.А., Кривоногова А.С., Бытов М.В. Молекулярные механизмы и генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам у микроорганизмов (Обзор). *Сельскохозяйственная биология*. 2022; 57(2):237-56. DOI: 10.15389/agrobiology.2022.2.237rus.

REFERENCES

- Cansizoglu M., Toprak E. Fighting against evolution of antibiotic

- resistance by utilizing evolvable antimicrobial drugs. *Curr. Genet.* 2017; 63(6):973-6. DOI: 10.1007/s00294-017-0703-x. Epub. 2017 May 11. PMID: 28497241.
2. Mathlouthi N., Al-Bayssari C., El Salabi A., Bakour S., Ben Gwierif S., Zorgani A.A., Jridi Y. et al. Carbapenemases and extended-spectrum β -lactamases producing Enterobacteriaceae isolated from Tunisian and Libyan hospitals. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2016; 10(7):718-27. DOI: 10.3855/jidc.7426. PMID: 27482803.
 3. Tadesse D., Zhao S., Tong E., Ayers S., Singh A., Bartholomew M.J., McDermott P.F. Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from humans and food animals, United States, 1950-2002. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(5):741-9. DOI: 10.3201/eid1805.111153. PMID: 22515968; PMCID: PMC3358085.
 4. Koraimann G. Spread and Persistence of Virulence and Antibiotic Resistance Genes: A Ride on the F Plasmid Conjugation Module. *EcoSal. Plus.* 2018; 8(1). DOI: 10.1128/ecosalplus.ESP-0003-2018. PMID: 30022749.
 5. Prabhakar P.K. Bacterial siderophores and their potential applications: a review. *Curr. Mol. Pharmacol.* 2020; 13(4):295-305. DOI: 10.2174/187446721366620051809445.
 6. Martin P., Marcq I., Magistro G., Penary M., Payros D. et al. Interplay between Siderophores and Colibactin Genotoxin Biosynthetic Pathways in *Escherichia coli*. *Plos Pathogens.* 2013; 9(7). DOI: 10.1371/journal.ppat.1003437.
 7. Kuznetsova D.A., Rykova V.A., Podladchikova O.N. Bacterial siderophores: structure, functions and role in the pathogenesis of infections. *Problemy osobo opashykh infektsiy.* 2022; 3:14-22. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-14-22. (in Russian)
 8. Kuznetsova M.V., Gizatullina Yu.S. Genetic adhesion profiles and adhesive variability in uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infektsiya i immunitet.* 2021; 11(3):481-90. DOI: 10.15789/2220-7619-GAP-1413. (in Russian)
 9. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Methods of genetic engineering. Molecular cloning. Moscow: Mir; 1984: 159-68. (in Russian)
 10. Himpsl S.D., Mobley H.L.T. Siderophore Detection Using Chrome Azurol S and Cross-Feeding Assays. *Methods Mol. Biol.* 2019; 2021:97-108. DOI: 10.1007/978-1-4939-9601-8_10. PMID: 31309499.
 11. Andryushchenko S.V., Zdvizhkova I.A., Perunova N.B., Bukharin O.V., Kotova E.V., Stepanova T.F. et al. Monitoring system for pathogenic enterobacterial polymerase chain reaction method. Patent RF № 2662930C1; 2007. (in Russian)
 12. Kuznetsova M.V., Gizatullina Yu.S. Phylogenetic diversity and biological properties of uropathogenic strains of *Escherichia coli*. *Byulleten` Orenburgskogo nauchnogo tsentra Ural'skogo otdeleniya RAN.* 2019. (3). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/filogeneticheskoe-raznoobrazie-i-biologicheskie-svoystva-uropatogennyh-shtammov-escherichia-coli> (date of access: 04/21/2023). (in Russian)
 13. Pashkova T.M., Popova L.P., Kartashova O.L. Pheno- and genotypic profile of staphylococci as causative agents of endogenous infections. *Byulleten` Orenburgskogo nauchnogo tsentra Ural'skogo otdeleniya RAN.* 2019; (3) URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/feno-i-genotipicheskiy-profil-stafilokokkov-kak-vozbuditeley-endogennyh-infektsiy> (date of access: 04/21/2023). (in Russian)
 14. Efimenko T.A., Terekhova L.P., Efremenkova O.V. The current state of the problem of antibiotic resistance of pathogenic bacteria. *Antibiotiki i khimioterapiya.* 2019; 64(6):64-8. DOI: 10.24411/0235-2990-2019-10033. (in Russian)
 15. Bukharin O.V., Gintsburg A.L., Romanova Yu.M., El-Registan G.I. Survival mechanisms of bacteria. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
 16. Zemlyanko O.M., Rogoza T.M., Zhuravleva G.A. Mechanisms of multiple resistance of bacteria to antibiotics. *Ekologicheskaya genetika.* 2018; 16(3):4-17. DOI: 10.17816/ecogen1634-17. (in Russian)
 17. Zubareva V.D., Sokolova O.V., Bezborodova N.A., Shkuratova I.A., Krivonogova A.S., Bytov M.V. Molecular mechanisms and genetic determinants of resistance to antibacterial drugs in microorganisms (Review). *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya.* 2022; 57(2):237-56. DOI: 10.15389/agrobiology.2022.2.237rus. (in Russian)
 18. Hennequin C., Robin F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2016; 35(3):333-41. DOI: 10.1007/s10096-015-2559-7.
 19. Tronnet S., Garcie C., Rehm N., Dobrindt U., Oswald E., Martin P. Iron Homeostasis Regulates the Genotoxicity of *Escherichia coli* That Produces Colibactin. *Infection and immunity.* 2016; 84(12):3358-68. DOI: 10.1128/IAI.00659-16.
 20. Mohamed T. Khazaal, Hoda H. El-Hendawy, Mona I. Mabrouk, Ahmed H. I. Faraag, Marwa R. Bakkar. Antibiotic resistance and siderophores production by clinical *Escherichia coli* strains. *Bio-Technologia.* 2022; 103(2):169-84. DOI: 10.5114/bta.2022.116211.
 21. Lisiecki P. Antibiotic resistance and siderophore production in Enterococci. *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia.* 2014; 66(1):1-10.