УДК 579.61

**АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ЛАКТОБАЦИЛЛ:
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ И ИХ ГОРИЗОНТАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТ***Е.А. Анисимова, И.В. Горохова, Г.Р. Каримуллина, Д.Р. Яруллина**Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

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, если последние локализованы на плазмидах и транспозонах. Так, у лактобацилл выявлены гены устойчивости к тетрациклину *tetW*, *tetM*, *tetS*, *tetO*, *tetQ*, *tetK*, *tetL* [3] и описана их потенциальная мобильность [4, 5]. Также обнаружен ряд генов устойчивости к эритромицину *ermB*, *ermA*, *ermC*, *erm(T)* [4–7] и доказана возможность их конъюгативного переноса [3, 4]. Поэтому целью работы являлось выявление генетических детерминант устойчивости к клинически распространенным антибиотикам у потенциально пробиотических штаммов лактобацилл и анализ их мобильности.

У 72 штаммов лактобацилл, выделенных нами ранее из фекалий человека, кисломолочных продуктов, растительного материала и пробиотических препаратов, диско-диффузионным методом оценили устойчивость к 25 клинически распространенным антибиотикам. Мы показали, что большинство штаммов лактобацилл проявляли чувствительность к ингибиторам биосинтеза клеточной стенки: карбапенемам (имипенему – 95 % исследованных штаммов, меропенему – 84 %, эртапенему – 74 %) и пенициллинам (ампициллину – 97 % и амоксициллину – 85 %). Для лактобацилл также была характерна чувствительность к рифампицину (91 %), макролидам (klarитромицину – 77 % и эритромицину – 96 %), тетрациклину (83 %), линезолиду (95 %) и хлорамфениколу (96 %). У исследованных штаммов лактобацилл выявили высокий уровень резистентности к ванкомицину (89 %), аминогликозидам: амикацину (100 %), гентамицину (98 %), канамицину (96 %) и стрептомицину (79 %), а также к фторхинолонам: ципрофлоксацину (90 %) и норфлоксацину (95 %). Для исследуемых лактобацилл была характерна устойчивость к цефалоспорином – цефепиму (96 %), цефтазидиму (95 %), цефтриаксону (89 %), цефотаксиму (84 %), цефоперазону (84 %), цефоперазону/сульбактаму (63 %) и цефазолину (58 %).

С помощью комплекса молекулярно-биологических методов (в том числе секвенирования) в геномах лактобацилл выявили детерминанты устойчивости к ванкомицину (*vanX* – 75 % исследованных штаммов), стрептомицину (*aadA* – 1.4 %, *aadE* – 4 %), эритромицину (*ermB* – 4 %, *ermC* – 1.4 %, *mefA* – 1.4 %), тетрациклину (*tetM* – 8.3 %, *tetK* – 11 %, *tetL* – 4 %), фторхинолонам (*parC* – 21 %). В геномах 87 % устойчивых к цефалоспорином бактерий методом ПЦР обнаружен ген *blaTEM*, кодирующий β-лактамазы расширенного спектра, способные инактивировать цефалоспорины. Наличие гена *blaTEM* подтверждено секвенированием полученного ПЦР-продукта.

Штаммы лактобацилл, характеризующиеся устойчивостью к тетрациклину и эритромицину, представляют угрозу в качестве потенциальных источников распространения генов антибиотикорезистентности внутри кишечного микробиома или по трофическим цепям. Поэтому на следующем этапе провели исследования по выяснению природы обнаруженной устойчивости у лактобацилл и способности к ее передаче другим микроорганизмам. По результатам молекулярно-генетического анализа генов антибиотикорезистентности отобрали 6 штаммов лактобацилл для проверки возможности передачи генов устойчивости к тетрациклину и эритромицину условно-патогенным бактериям. У штаммов *L. fermentum* HF-A1, *L. fermentum* HF-B1, *L. fermentum* HF-A4, *L. fermentum* 3–4, *L. fermentum* 5–2 гены *tetK* и *tetM* находятся на плазмиде, и у всех пяти штаммов наличие данных генов имеет фенотипическое проявление в виде устойчивости к тетрациклину. Бактерии *L. fermentum* 5–1 обладают плазмидными генами *tetK* и *tetM*, но проявляют чувствительность к тетрациклину. В то же время штамм *L. fermentum* 5–1 несет ген устойчивости к эритромицину *ermB*.

В качестве потенциальных реципиентов генов *erm* и *tet* с помощью метода градиентного агара были отобраны чувствительные к тетрациклину бактерии *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* и *Listeria monocytogenes* и чувствительные к эритромицину *S. haemolyticus*.

Основным механизмом горизонтального переноса генов антибиотикорезистентности в природе считается конъюгация. Наиболее распространенным методом изучения мобильности генов антибиотикорезистентности является метод «конъюгации на мембране». Он представляет собой совместную инкубацию клеток донора и реципиента, плотно контактирующих на нитроцеллюлозном фильтре, что повышает способность к конъюгативному переносу генетического материала [8]. В проведенном нами эксперименте «конъюгации на мембране» не происходила передача устойчивости к тетрациклину от лактобацилл к бактериям-реципиентам. Далее мы проверили возможность передачи генов устойчивости к тетрациклину от лактобацилл в процессе трансформации. Известно, что филогенетически далекие друг от друга микроорганизмы в естественных экониках могут обмениваться генами лекарственной устойчивости посредством трансформации [9]. Поскольку точно неизвестно, какие факторы в природе инициируют переход клеток в состояние компетентности, реципиентные бактерии были подвергнуты электропорации. Проведенная после этого трансформация плазмидной ДНК *L. fermentum* 5–1 привела к появлению у *Citrobacter freundii* устойчивости к тетрациклину. Из бактерий-трансформантов, выросших на селективной среде с тетрациклином, выделили ДНК и в ней методом ПЦР детектировали ген *tetK* размером 278 п.о. Факт того, что чувствительные к тетрациклину бактерии *L. fermentum* 5–1, несущие гены устойчивости к тетрациклину, могут служить вектором распространения антибиотикорезистентности в микробиоме кишечника, вызывает тревогу. Однако отметим, что при электропорации компетентные клетки создаются искусственно, что повышает вероятность приобретения чужеродного материала реципиентом от донора. Поэтому важно исследовать транспорт генов антибиотикорезистентности не только *in vitro*, но и *in vivo* в условиях максимально приближенных к условиям ЖКТ.

Поэтому на завершающем этапе работы проверили возможность передачи генов антибиотикорезистентности от лактобацилл бактериям кишечной микробиоты. Исследование выполнили на мышах, которым в течение двух недель вводили *per os* смесь из четырех штаммов-доноров генов антибиотикорезистентности: *L. fermentum* 5–1, *L. plantarum* AG1, *L. paracasei* E1 и *L. plantarum* Act-2. В хромосомной ДНК данных лактобацилл ранее мы обнаружили гены устойчивости к ванкомицину *vanX* (все штаммы), цефалоспорином *blaTEM* (*L. paracasei* E1, *L. plantarum* Act-2), ципрофлоксацину *parC* (*L. plantarum* Act-2), эритромицину *ermB* (*L. fermentum* 5–1, *L. plantarum* AG1) и тетрациклину *tetK* (*L. paracasei* E1). В плазмидной ДНК штамма *L. fermentum* 5–1 детектировали гены *tetK* и *tetM*. Мы показали, что введение мышам лактобацилл-доноров, привело к повышению уровня фенотипической устойчивости к тетрациклину у микробного кишечного сообщества животных. С помощью ПЦР в реальном времени установили, что в метагеномной ДНК, выделенной из фекалий опытных мышей, происходило увеличение количества гена *tetM*, не связанное с размножением введенных лактобацилл. Распространение генов устойчивости к эритромицину (*ermB*), ванкомицину (*vanX*), ципрофлоксацину (*parC*), стрептомицину (*aadE*) и генов, кодирующих β -лактамазы расширенного спектра действия (*blaTEM*), от лактобацилл в микробном сообществе толстого кишечника не происходило.

Таким образом, в данной работе мы показали, что чувствительные к тетрациклину бактерии *L. fermentum* 5–1, несущие гены устойчивости *tetM* и *tetK* на плазмидной ДНК, могут служить потенциальными векторами накопления и распространения генов антибиотикорезистентности в микробном сообществе ЖКТ. Практическое применение таких штаммов лактобацилл в пищевой отрасли и в пробиотикотерапии недопустимо, поскольку является опасным с позиций распространения устойчивости к антимикробным препаратам, что, по современным оценкам, представляет собой одну из самых серьезных угроз глобальной национальной безопасности. В связи с вышесказанным, отбор штаммов микроорганизмов для конструирования пробиотиков должен включать проверку их антибиотикорезистентности, а при ее выявлении – анализ мобильности генетических детерминант данного признака. Такой новый подход к скринингу штаммов позволит не допустить распространения антибиотикорезистентности среди патогенных микроорганизмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-00-00456 и 18-34-00268 в рамках Программы повышения конкурентоспособности КФУ с использованием оборудования Междисциплинарного ЦКП КФУ для обеспечения клеточных, геномных и постгеномных исследований в Приволжском регионе.

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. Gueimonde M., Sánchez B., et al Antibiotic resistance in probiotic bacteria // Front Microbiol. 2013; 4: 202.
4. 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.
5. Zonenschain D., Rebecchi A., Morelli L. Erythromycin – and tetracycline-resistant lactobacilli in Italian fermented dry sausages // J Appl Microbiol. 2009; 107(5):1559–68
6. 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.
7. 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.
8. Gevers D., Huys G., Swings J. In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria // FEMS Microbiol Lett 2003; 225:125–130.
9. Domingues S, Harms K, Fricke WF, et al. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes. // PLoS Pathog; 2012; 8(8):e1002837.