

DOI 10.52368/2078-0109-2024-60-2-95-100
УДК 579.62: 577.29

АНАЛИЗ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ *ESCHERICHIA COLI* ИЗ КИШЕЧНИКА ПОРОСЯТ С ДИАРРЕЕЙ

*, **, ***Сыромятников М.Ю. ORCID ID 0000-0001-9028-0613, *Шабунин С.В. ORCID ID 0000-0002-2689-6998,
, *Нестерова Е.Ю. ORCID ID 0000-0003-0918-3547, **Гладких М.И. ORCID ID 0000-0003-1173-1565,
**Буракова И.Ю. ORCID ID 0000-0002-5881-0845, **Смирнова Ю.Д. ORCID ID 0000-0002-5820-1804,
, *Морозова П.Д. ORCID ID 0009-0000-0075-9170, **Грязнова М.В. ORCID ID 0000-0003-2076-3868,
*Михайлов Е.В. ORCID ID 0000-0001-5457-1325

*ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии
и терапии», г. Воронеж, Российская Федерация

**ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий»,
г. Воронеж, Российская Федерация

***ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»,
г. Воронеж, Российская Федерация

*Работа посвящена анализу распространенности генов антибиотикорезистентности в культурах *E. coli*, изолированных из кишечника поросят с диареей. С использованием высокопроизводительного секвенирования удалось выявить 26 генов антибиотикорезистентности. Они относились к 7 группам антибиотиков: аминогликозиды, бета-лактамы, хинолоны, сульфонамиды, тетрациклины, диаминопиримидины, фениколы. Относительная обильность гена *QnrD* была максимальной в исследуемой выборке изолятов *E. coli* (50%). Для остальных последовательностей генов антибиотикорезистентности процентное соотношение каждой отдельной группы генов не превышало 10%. Наибольшее количество разнообразия генов было характерно для класса генов резистентности к бета-лактамам (*AmpC1_Ecoli*, *OXA-10*, *OXA-14*, *OXA-16*, *Penicillin_Binding_Protein_Ecoli*, *TEM-143*, *TEM-166*, *TEM-215* и *TEM-76*, *TEM-95*). **Ключевые слова:** поросята, кишечник, гены, антибиотикорезистентность, высокопроизводительное секвенирование, антибиотик.*

ANALYSIS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES OF *ESCHERICHIA COLI* FROM THE GUT OF THE PIGLETS WITH DIARRHEA

*, **, ***Syromyatnikov M.Yu., *Shabunin S.V., **, ***Nesterova E.Yu., **Gladkikh M.I., **Burakova I.Yu.,
Smirnova Yu.D., **, *Morozova P.D., **Gryaznova M.V., *Mikhaylov E.V.

*FSBSI "All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy",
Voronezh, Russian Federation

**FSBEI HE "Voronezh State University of Engineering Technologies", Voronezh, Russian Federation

***FSBEI HE "Voronezh State University", Voronezh, Russian Federation

*The study is devoted to the analysis of the prevalence of antibiotic resistance genes in cultures of *E. coli* isolated from the gut of the piglets with diarrhea. With the use of high-throughput sequencing, it was possible to identify 26 antibiotic resistance genes. They belonged to 7 groups of antibiotics: aminoglycosides, beta-lactam antibiotics, quinolones, sulfonamides, tetracyclines, diaminopyrimidine, phenicols. The relative abundance of the *QnrD* gene was maximal in the studied sample of *E. coli* isolates (50%). For other sequences of antibiotic resistance genes, the percentage ratio of each separate group of genes did not exceed 10%. The largest number of gene variants was characteristic of the class of genes resistant to beta-lactam antibiotics (*AmpC1_Ecoli*, *OXA-10*, *OXA-14*, *OXA-16*, *Penicillin_Binding_Protein_Ecoli*, *TEM-143*, *TEM-166*, *TEM-215* and *TEM-76*, *TEM-95*). **Keywords:** piglets, gut, genes, antibiotic resistance, high-throughput sequencing, antibiotic.*

Введение. Антибиотики применяются в медицине и одновременно широко используются в сельском хозяйстве [1]. Животноводство наиболее часто сталкивается с необходимостью применения антибиотиков для лечения различных заболеваний, их профилактики, обработки помещений содержания, более активного набора мышечной массы животных и, соответственно, нуждается в глубоком изучении проблемы антибиотикорезистентности [2].

Антибиотики являются кормовой добавкой и в малых дозах стимулируют рост животных, однако следствием их содержания в корме является увеличение уровня резистентности микроорганизмов. Многие сельскохозяйственные животные являются резервуаром антибиотикорезистентных бактерий, таких как *Campylobacter* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. и др. Контроль здоровья сельскохозяйственных животных – важнейший аспект ведения хозяйства. Бактериальные и вирусные болезни, например, стафилококкоз, эшерихиоз, сальмонеллез, отечная болезнь свиней, псевдомоноз, пастереллез, могут приводить к падежу скота [3].

Применение антибиотиков увеличило эффективность животноводства, однако споры относительно пользы этих препаратов в сельском хозяйстве актуальны. В настоящее время наблюдается тенденция отказа от антибиотиков и стремление снизить проблему резистентности путем изменения структуры рынка и разработки новых решений на замену старым [4]. Антибиотикорезистент-

ность в животноводстве – не только глобальная экономическая проблема, она также несет угрозу человеку при потреблении с пищей остатков лекарственных средств. Селекция резистентных кишечных бактерий, нарушение микробного состава кишечника и аллергические реакции – лишь некоторые из возможных последствий употребления остаточного количества антибиотиков в продуктах питания. Для ряда антибиотиков доказано существование токсичности, канцерогенности, мутагенности, следовательно, для них не может быть установлена допустимая суточная доза, и они не могут использоваться у продуктивных животных [5]. Наличие генов антибиотикорезистентности может предполагать наличие резистентных к антибиотикам штаммов бактерий. Поэтому важно проводить мониторинг присутствия тех или иных генов антибиотикорезистентности у сельскохозяйственных животных, в первую очередь свиней, кур и коров. Это позволит вовремя корректировать терапию и повышать биобезопасность продукции животноводства.

Цель исследований – анализ наличия и распространенности генов антибиотикорезистентности у культур *E. coli*, изолированных из кишечника поросят с признаками диареи с помощью метода высокопроизводительного секвенирования.

Материалы и методы исследований. Штаммы *E. coli*, изолированные из кишечника поросят (возрастом 2-5 суток) с признаками диареи. Всего было изолировано 5 культур кишечной палочки от 5 животных.

Выделение ДНК осуществляли коммерчески доступным набором HiPure DNA Micro Kit (Magen, Гуанчжоу, Китай) согласно протоколу производителя. Для приготовления библиотек использовали коммерческий набор MGIEasy Fast FS Library Prep Module (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Очистку библиотек секвенирования осуществляли с помощью магнитных частиц MGIEasy DNA Clean Beads (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Адаптеры лигировали с помощью набора адаптеров A для праймеров MGIEasy UDB (MGI, Шэньчжэнь, Китай). Качество полученных библиотек оценивалось коммерчески доступным набором Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Уолтем, Массачусетс, США) на приборе Qubit (США). Циркуляризацию проводили с помощью модуля MGIEasy Dual Barcode Circularization Module (MGI, Шэньчжэнь, Китай).

Объединение библиотек и секвенирование проводили с использованием платформы MGI DNBSEQ-G50 с моделью проточной ячейки для секвенирования DNBSEQ-G50RS: FCL (MGI, Шэньчжэнь, Китай). DNB создавали набором DNBSEQ-G50RS. Оценка качества необработанных данных проводилась с помощью FastQC. При этом, последовательности, где $Q < 30$, расценивались как базы низкого качества.

С помощью программного обеспечения GROOT проводилось профилирование резистома с помощью заранее рассчитанного индекса ARG-ANNOT. Оно осуществлялось за счет графического представления наборов генов с локально-чувствительной схемой индексации, чтобы обеспечить быструю классификацию считываний метагеномных последовательностей по сходству. Иерархическое выравнивание классифицированных ридов позволяет точно выявить полноразмерные последовательности генов с использованием схемы оценки. Для идентификации генов устойчивости к антибиотикам полученные последовательности после выравнивания сопоставляются с эталонными последовательностями ARG, извлеченными из единой кластеризованной базы данных.

Результаты исследований. Анализ результатов высокопроизводительного секвенирования изолятов *E. coli* от поросят с диареей позволил получить в общей сложности 83448 ридов, соответствующих генам антибиотикорезистентности 7 различных групп. На основании этих данных было установлено, что большая часть прочтений принадлежала к группе генов устойчивости к хинолонам (более 80%). Наименьшее количество нуклеотидных последовательностей в исследованных образцах принадлежало генам резистентности к аминогликозидным, сульфонамидным и тетрациклиновым антибиотикам, что соответствовало менее 1% (рисунок 1).

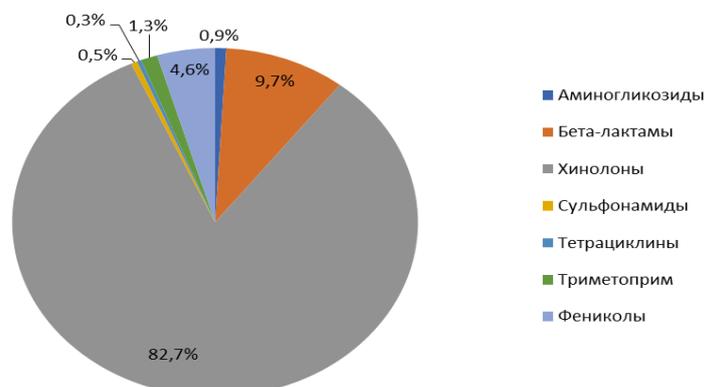


Рисунок 1 – Относительное содержание генов резистентности к антибиотикам в кишечнике поросят

Биоинформатический анализ прочтений позволил идентифицировать 26 генов антибиотикорезистентности. Принадлежность к группе каждого из них отражена в таблице 1.

Таблица 1 – Гены антибиотикорезистентности и соответствующие им классы антибиотиков

| № | Классы | Сокр. | Гены устойчивости |
|---|----------------|--------|---|
| 1 | Аминогликозиды | (AGly) | <i>Aac6-Aph2, Aac6-Ir, StrA, StrB</i> |
| 2 | Бета-лактамы | (Bla) | <i>AmpC1_Ecoli; OXA-10, OXA-14, OXA-16; Penicillin_Binding_Protein_Ecoli; TEM-143, TEM-166, TEM-215, TEM-76, TEM-95</i> |
| 3 | Хинолоны | (Flq) | <i>QnrB19, QnrB5, QnrD, QnrVC4</i> |
| 4 | Сульфонамиды | (Sul) | <i>SulI</i> |
| 5 | Тетрациклины | (Tet) | <i>TetD</i> |
| 6 | Триметоприм | (Tmt) | <i>DfrA1, DfrA14, DfrA27</i> |
| 7 | Фениколы | (Phe) | <i>CmlA5, CmlA1; FloR</i> |

На рисунке 2 изображена относительная обильность генов резистентности к хинольным антибиотикам. В образцах было детектировано 4 разновидности генов устойчивости к хинолам: *QnrB19*, *QnrB5*, *QnrD* и *QnrVC4*. Доминирующим среди них оказался ген *QnrD* – 39 925 прочтений, что соответствовало содержанию порядка 59% относительно других генов данной выборки. Ранее было установлено, что штаммы *E. coli*, содержащие плазмиду с этим геном, могут обладать мультирезистентностью к большинству применяемых в сельском хозяйстве антибиотиков. Это связывают с комплексным взаимодействием *qnrD*-плазмид и особых комплексов устойчивости, располагающихся на интегронах класса А [6].

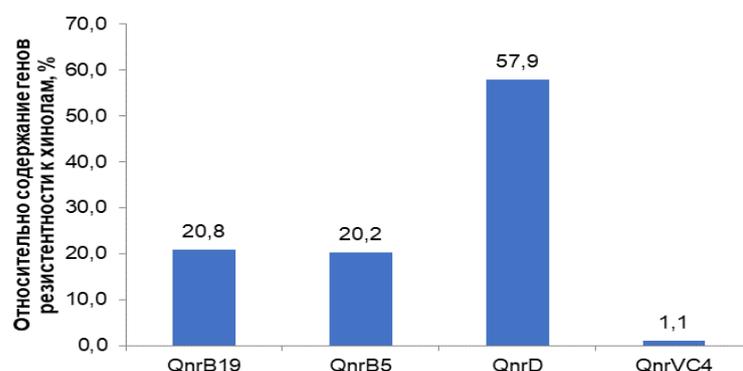


Рисунок 2 – Распространенность генов антибиотикорезистентности к хинолам

С помощью высокопроизводительного секвенирования было идентифицировано 10 генов устойчивости к антибиотикам бета-лактамы группы. Наибольшей обильностью характеризовался *Penicillin_Binding_Protein_Ecoli* (24%) (рисунок 3).

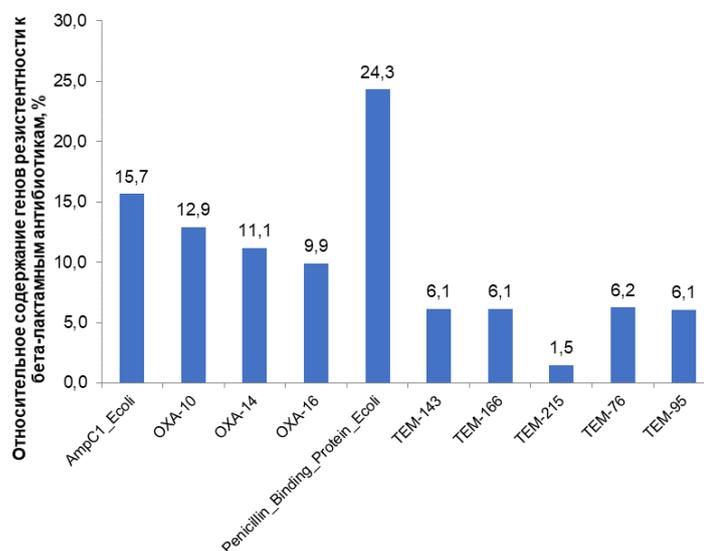


Рисунок 3 – Распространенность генов антибиотикорезистентности к бета-лактамам

В пределах от 11 до 15% варьировал показатель встречаемости генов *AmpC1_Ecoli* (15%), *OXA-10* (12%) и *OXA-14* (11%). Распространенность гена *OXA-16* составляла 9% относительно данной выборки, а генов *TEM-143*, *TEM-166*, *TEM-76* и *TEM-95* – 6%. Лишь 1% прочтений приходился на ген *TEM-215*. Как правило, резистентность к антибиотикам бета-лактамной группы ассоциирована с наличием в геноме бактерий мобильных генетических элементов – геномных островков, способных быстро эволюционировать, а также повышенным синтезом β -лактамаз класса А и иных типов, связанных с плазмидами. Наряду с ними, хромосомные мутации способны вызывать развитие устойчивости к определенным антибиотикам, например, за счет изменения в функционировании откачивающих насосов [7].

Антибиотики группы фениколов относятся к препаратам широкого спектра действия, применяемых в животноводстве в качестве средств для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта и болезней дыхательных путей. В исследуемых образцах было обнаружено 3 варианта генов, характеризующихся устойчивостью к данным антибиотикам: *CmlA5* (52%), *CmlA1* (44%) и *FloR* (2%) (рисунок 4).

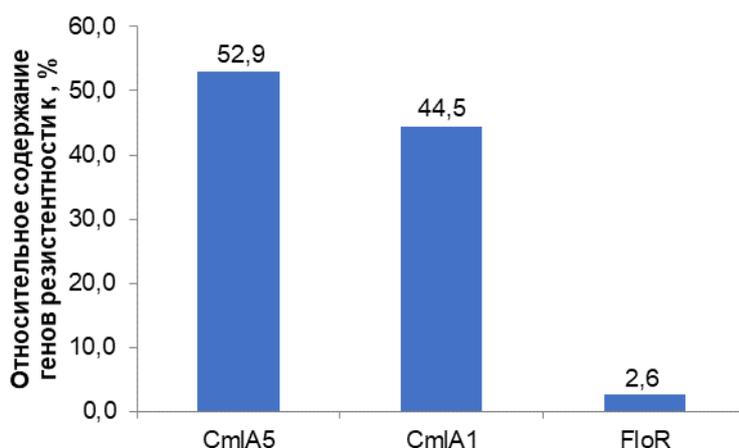


Рисунок 4 – Распространенность генов антибиотикорезистентности к фениколам

Гены группы *CmlA* и *FloR* обеспечивают устойчивость бактериальных штаммов к флорфениколу. Главным образом подобная резистентность объясняется наличием интегронов класса А в составе бактериальных культур, а также конъюгативных плазмид, содержащих данные гены [8].

Детальный анализ изолятов *E. coli* позволил выявить 3 гена устойчивости к триметоприму. К ним относят *DfrA1*, *DfrA14* и *DfrA27* (рисунок 5).

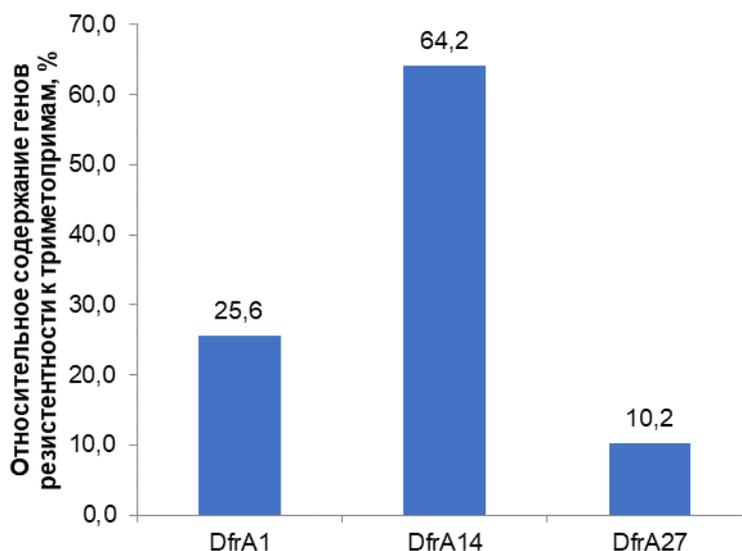


Рисунок 5 – Распространенность генов антибиотикорезистентности к триметоприму

Среди исследуемых образцов штаммов *E. coli* самым распространенным оказался ген *DfrA14*, его значение относительной обильности составило 64%. Процентное количество гена резистентности *DfrA1* было равно 25%. Развитие подобной резистентности может быть связано с отсутствием в клетке *E. coli* периплазматического глутатиона, который влияет на противомикробные свойства триметоприма [9].

Биоинформатический анализ генома штаммов *E. coli*, изолированных из кишечника поросят с диареей, позволил выявить 4 гена устойчивости *Aac6-Aph2*, *Aac6-Ir*, *StrA* и *StrB*, которые принадлежали к противомикробным препаратам аминогликозидной группы (рисунок 6).

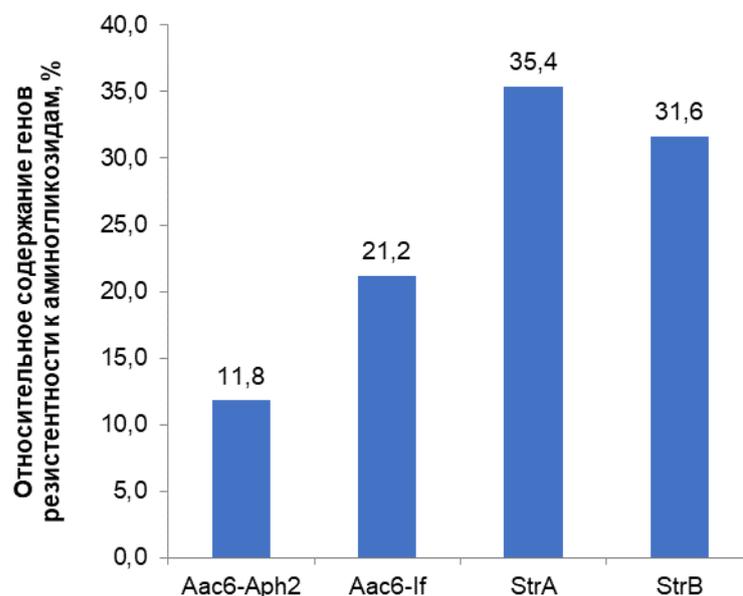


Рисунок 6 – Распространенность генов антибиотикорезистентности к аминогликозидам

Наиболее часто встречающимися генами, ассоциированными с аминогликозидами, оказались *StrA* и *StrB*. При этом ген *StrA* доминировал в исследуемой выборке (35%). Минимальные значения относительной обильности были характерны для гена *Aac6-Aph2* (11%), в то время как количество *Aac6-Ir* составило порядка 21% среди всех детектированных последовательностей. Такое распространение *StrA* и *StrB* относительно других генов, принадлежащих к антибиотикам аминогликозидной группы, можно объяснить генетической связью между цистронами рибосомальных белков 30S и локусом последовательности гена резистентности *Str*, которая позволяет им эффективнее трансформироваться в бактериальные клетки [10].

Результаты высокопроизводительного секвенирования изолятов *E. coli* позволили выявить наличие двух генов устойчивости к двум противомикробным препаратам. Ими оказались тетрациклин и ассоциированный с ним ген *TetD*, а также сульфонамиды и ген *Sull*. Данные гены встречались в образцах, принадлежащих к одному животноводческому комплексу, а их значения относительной обильности не превышали 3%.

Заключение. По результатам проведенных исследований в изолированных клетках *E. coli* было идентифицировано 26 генов резистентности к 7 классам антибиотиков: аминогликозидам, бета-лактамам, хинолонам, сульфонамидам, тетрациклинам, триметоприму и фениколам. Самым распространенным геном оказался *QnrD*, вызывающий устойчивость к хинолонам. На долю этого гена приходилось 50% полученных «ридов» секвенирования. Для остальных последовательностей процентное соотношение каждой отдельной группы генов не превышало 10%. При этом относительное содержание генов устойчивости к аминогликозидам, сульфонамидам и тетрациклинам в анализируемой выборке составляло менее 1%. Наибольшее количество разновидностей генов было характерно для класса генов резистентности к бета-лактамам. К ним относились: *AmpC1_Ecoli*, *OXA-10*, *OXA-14*, *OXA-16*, *Penicillin_Binding_Protein_Ecoli*, *TEM-143*, *TEM-166*, *TEM-215* и *TEM-76*, *TEM-95*.

Вопрос антибиотикорезистентности в сельском хозяйстве является большой проблемой по причине серьезных последствий для экономической составляющей производства, а также потенциального неблагоприятного воздействия на здоровье человека. На основании этого, наши данные являются вкладом в изучение проблемы антибиотикорезистентности бактериальных штаммов, вызывающих диарею у поросят.

Conclusion. Based on the results, 26 resistance genes to 7 classes of antibiotics were identified in isolated *E. coli* cells: aminoglycosides, beta-lactam antibiotics, quinolones, sulfonamides, tetracyclines,

trimethoprim and phenicols. The most common gene was *QnrD*, which causes resistance to quinolones. This gene accounted for 50% of the resulting sequencing reads. For the remaining sequences, the percentage of each individual gene group did not exceed 10%. At the same time, the relative content of resistance genes to aminoglycosides, sulfonamides and tetracyclines in the analyzed sample was less than 1%. The largest number of gene varieties was characteristic of the class of genes resistant to beta-lactam antibiotics. These included: *AmpC1_Ecoli*, *OXA-10*, *OXA-14*, *OXA-16*, *Penicillin_Binding_Protein_Ecoli*, *TEM-143*, *TEM-166*, *TEM-215* and *TEM-76*, *TEM-95*.

The issue of antibiotic resistance in agriculture is a major concern due to the serious economic implications of production as well as the potential adverse impact on human health. Based on this, our data contribute to the study of the problem of antibiotic resistance of bacterial strains that cause diarrhea in piglets.

Список литературы. 1. Fluit, A.C. Molecular detection of antimicrobial resistance / A.C. Fluit, M.R. Visser, F.J. Schmitz // *Clin Microbiol Rev.* – 2001 – No. 14, (4) – P. 836-71. doi 10.1128/CMR.14.4.836-871.2001. 2. Белая, Я.С. Проблема антибиотикорезистентности микроорганизмов в современном мире / Я.С. Белая, В.О. Лемешевский. – Минск : Белорусский государственный университет, 2020. – С. 145 - 150. 3. Removal of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in a three-stage pig manure management system: The implications of microbial community structure / Zhao S. [i dr.] // *J Environ Manage.* – 2022 – P. 116185. doi 10.1016/j.jenvman.2022.116185. 4. Davies, J. Origins and evolution of antibiotic resistance / J. Davies, D. Davies // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2010. – No. 74, (3) – P. 417-33. doi 10.1128/MMBR.00016-10. 5. Pig manure treatment strategies for mitigating the spread of antibiotic resistance / M. Zalewska [i dr.] // *Sci Rep.* – 2023. – No. 13, (1) – P. 11999. doi 10.1038/s41598-023-39204-4. 6. A *qnrD*-plasmid promotes biofilm formation and class 1 integron gene cassette rearrangements in *Escherichia coli* / A. Babosan [i dr.] // *Antibiotics (Basel).* – 2022. – No. 11, (6). – P. 715. doi: 10.3390/antibiotics11060715. 7. Emergence of resistance to quinolones and β -lactam antibiotics in enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* causing traveler's diarrhea / E. Guiral [i dr.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2019. – No. 63, (2). – P. e01745-18. doi 10.1128/AAC.01745-18. 8. Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the *floR* gene in *Escherichia coli* isolated from cattle / A. Cloeckaert [i dr.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2000. – No. 44, (10). – P. 2858-60. doi 10.1128/AAC.44.10.2858-2860.2000. 9. Reducing the periplasmic glutathione content makes *Escherichia coli* resistant to trimethoprim and other antimicrobial drugs / Y. Song [i dr.] // *Microbiology Spectrum.* – 2021. – No. 9, (3). – P. e0074321. doi 10.1128/Spectrum.00743-21. 10. O'Neil, D.M. Cotransduction of *strA* and ribosomal protein cistrons in *Escherichia coli*-*Salmonella typhimurium* hybrids / D.M. O'Neil, P.S. Sypherd // *Journal of Bacteriology.* – 1971. – No. 105, (3). – P. 947-56. doi 10.1128/jb.105.3.947-956.1971.

References. 1. Fluit, A.S. Molecular detection of antimicrobial resistance / A.S. Fluit, M.R. Visser, F.J. Schmitz // *Clin Microbiol Rev.* – 2001 – No. 14, (4) – P. 836-71. doi 10.1128/CMR.14.4.836-871.2001. 2. Belaya, YA.S. Problema antibiotikorezistentnosti mikroorganizmov v sovremennom mire / YA.S. Belaya, V.O. Lemeshevskij. – Minsk : Belorusskij gosudarstvennyj universitet, 2020. – S. 145 - 150. 3. Removal of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in a three-stage pig manure management system: The implications of microbial community structure / Zhao S. [i dr.] // *J Environ Manage.* – 2022 – P. 116185. doi 10.1016/j.jenvman.2022.116185. 4. Davies, J. Origins and evolution of antibiotic resistance / J. Davies, D. Davies // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2010. – No. 74, (3) – P. 417-33. doi 10.1128/MMBR.00016-10. 5. Pig manure treatment strategies for mitigating the spread of antibiotic resistance / M. Zalewska [i dr.] // *Sci Rep.* – 2023. – No. 13, (1) – P. 11999. doi 10.1038/s41598-023-39204-4. 6. A *qnrD*-plasmid promotes biofilm formation and class 1 integron gene cassette rearrangements in *Escherichia coli* / A. Babosan [i dr.] // *Antibiotics (Basel).* – 2022. – No. 11, (6). – P. 715. doi: 10.3390/antibiotics11060715. 7. Emergence of resistance to quinolones and β -lactam antibiotics in enteroaggregative and enterotoxigenic *Escherichia coli* causing traveler's diarrhea / E. Guiral [i dr.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2019. – No. 63, (2). – P. e01745-18. doi 10.1128/AAC.01745-18. 8. Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the *floR* gene in *Escherichia coli* isolated from cattle / A. Cloeckaert [i dr.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* – 2000. – No. 44, (10). – P. 2858-60. doi 10.1128/AAC.44.10.2858-2860.2000. 9. Reducing the periplasmic glutathione content makes *Escherichia coli* resistant to trimethoprim and other antimicrobial drugs / Y. Song [i dr.] // *Microbiology Spectrum.* – 2021. – No. 9, (3). – P. e0074321. doi 10.1128/Spectrum.00743-21. 10. O'Neil, D.M. Cotransduction of *strA* and ribosomal protein cistrons in *Escherichia coli*-*Salmonella typhimurium* hybrids / D.M. O'Neil, P.S. Sypherd // *Journal of Bacteriology.* – 1971. – No. 105, (3). – P. 947-56. doi 10.1128/jb.105.3.947-956.1971.

Поступила в редакцию 13.02.2024.