

СОПОСТАВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ И ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ У КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *ESCHERICHIA COLI* И *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

*Ядыкова Л.Л.¹, Зыкова Д.А.¹, Баязитова Л.Т.², Тризна Е.Ю.¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет,
Российская Федерация, Казань, 420008, ул. Кремлевская, 18

²Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии,
Российская Федерация, Казань, 420015, ул. Большая Красная, 67

*E-mail: milayesyad@gmail.com

Резюме

Представители семейства *Enterobacteriaceae* являются одними из распространенных возбудителей инфекционных заболеваний по всему миру. Массовое ненадлежащее использование антибиотиков привело к развитию и распространению множественной лекарственной устойчивости у энтеробактерий. На данный момент известны различные механизмы резистентности, которые могут быть детерминированы генами устойчивости к антибиотикам. Однако, данные мониторинга распространения генов устойчивости на территории Российской Федерации разрознены или отсутствуют.

Методы. Исследовали клинические изоляты *E. coli* и *K. pneumoniae*, выделенные в КНИИЭМ Роспотребнадзора. Оценка чувствительности изолятов к антибиотикам проводили с помощью диско-диффузионного метода согласно рекомендаций МАКМАХ. Наличие генетических маркеров устойчивости у клинических изолятов определяли с помощью полимеразной цепной реакции.

Результаты. Клинические изоляты *E. coli* и *K. pneumoniae* обладали устойчивостью к разным классам антибиотиков, в тоже время нередко один изолят был невосприимчив к препаратам 3 классов. При этом Меропенем был эффективен в отношении большинства изолятов. Только у некоторых фенотипически устойчивых изолятов подтвердилось наличие распространенных генетических маркеров *texB*, *texD*, *ampC*, *aac(3)-IIa*, *aphA*, *aadB*, ассоциированных с резистентностью к разным классам антибиотиков. Это может ставить под сомнение актуальность использования данных маркеров для идентификации генов устойчивости.

Вывод. Мониторинг распространенности генов устойчивости необходим для оптимизации использования антибактериальных препаратов с учетом рисков горизонтального переноса генетических маркеров и понижения скорости их распространения среди патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Ключевые слова: антибиотик, антибиотикорезистентность, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*.

Цитирование: Ядыкова Л.Л., Зыкова Д.А., Баязитова Л.Т., Тризна Е.Ю. Сопоставление генетических маркеров резистентности и фенотипического профиля устойчивости к антимикробным препаратам у клинических изолятов *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* // *Biomics*. 2024. V.16(4). С.369-380. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-26

© Авторы

COMPARISON OF GENETIC MARKERS OF RESISTANCE AND PHENOTYPIC PROFILE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN CLINICAL ISOLATES OF *ESCHERICHIA COLI* AND *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

*Yadykova L.L.¹, Zykova D.A.¹, Bayazitova L.T.², Trizna E.Y.¹

Генетический профиль устойчивых изолятов *Enterobacteriaceae*

¹Kazan Federal University, 18 st. Kremlevskaya, Kazan, 420008, Russia

²Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 67 st. Bolshaya Krasnaya, Kazan, 420015, Russia

*E-mail: milayesyad@gmail.com

Resume

Bacteria of *Enterobacteriaceae* family are among the most common pathogens worldwide. The massive inappropriate use of antibiotics has led to the development and spread of multidrug resistance in them. Various mechanisms of resistance are now known and may be determined by antibiotic resistance genes. However, data of the spread of resistance genes among bacteria in the Russian Federation are scattered or absent.

Methods. The isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* were obtained from KRIEM of Rospotrebnadzor. The sensitivity of clinical isolates to antibiotics was assessed using the disk diffusion method according to the recommendations of the International Association of Microorganisms of the Russian Federation (IACMAC). The presence of genetic markers of resistance in clinical isolates was determined using the polymerase chain reaction.

Results. Clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* were resistant to different classes of antibiotics, and often one isolate was resistant to drugs of up to 3 classes. Meropenem was effective against the most of isolates. Only in some phenotypically resistant isolates the presence of common genetic markers *mexB*, *mexD*, *ampC*, *aac(3)-IIa*, *aphA*, *aadB* associated with antibiotic resistance was confirmed. This may call into question the relevance of using these markers to identify resistance genes.

Conclusion. Monitoring of the resistance genes spread is necessary to optimize the use of antibacterial drugs, taking into account the risks of horizontal transfer of genetic markers and to reduce the rate of their spread among pathogenic and opportunistic microorganisms.

Keywords: antibiotics. antibiotic resistance, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*

Citation: Yadykova L.L., Zykova D.A., Bayazitova L.T., Trizna E.Y. Comparison of genetic markers of resistance and phenotypic profile of antimicrobial resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Biomics*. 2024. V.16(4). P.369-380. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2024-26 (In Russian)

© The Authors

Введение

Устойчивость бактерий к антибактериальным препаратам значительно возросла за последние десятилетия [Oliveira et al., 2024], при этом у представителей *Enterobacteriaceae* часто обнаруживается множественная лекарственная устойчивость (МЛУ), что является серьезной проблемой в лечении вызываемых ими заболеваний [Saenz et al., 2004; Terreni et al., 2021].

У бактерий имеются различные механизмы защиты от антибиотиков. Грамотрицательные бактерии могут иметь одновременно многообразные механизмы устойчивости, например, подавление проникновения препаратов в клетку или интенсивный отток (efflux) препаратов из клетки, изменение сайтов связывания лекарственных препаратов с мишенью или модификация самих антибиотиков [Gaub, Rahman, 2023].

Escherichia coli и *Klebsiella pneumoniae* являются распространенными представителями семейства *Enterobacteriaceae*, которые обнаруживаются при различных инфекционных заболеваниях [Terreni et al., 2021; Barbu et al., 2023].

Понижение проникновения препарата в клетку как один из способов защиты клетки

происходит за счет ограничения прохождения антибиотиков в клетку путем уменьшения притока, например, регулируя проницаемость внешней мембраны и увеличивая скорость оттока веществ [Gaub, Rahman, 2023]. Другим известным способом защиты бактерий от токсичных веществ являются эффлюксные насосы. Грамотрицательные бактерии имеют клеточную оболочку с внутренней и внешней мембраной, в которые погружены транспортные белки, затрагивающие одну или несколько мембран [Gaurav et al., 2023]. На данный момент известно пять основных семейств эффлюксных насосов: ABC (от англ. «ATPbinding cassette»), MFS (от англ. «major facilitator superfamily»), MATE (от англ. «multidrug and toxic compound extrusion»), RND (от англ. «resistance-nodulation-division»), SMR (от англ. «small multidrug resistance») [Khan et al., 2024].

Далее, при невозможности удаления токсичного соединения из клетки, бактерии могут изменять молекулярные мишени для антибиотиков, предотвращая их связывание с мишенью [Martinez-Trejo et al., 2022]. Например, некоторые бактерии могут нести мутированные гены внеклеточных пенициллинсвязывающих белков (ПСБ), которые

Генетический профиль устойчивых изолятов *Enterobacteriaceae*

гомологичны исходным белкам, но обладают более низким сродством к β -лактамным антибиотикам [Lakhundi et al., 2018].

Также устойчивость к антибиотикам может достигаться за счет инактивации самого препарата. Так, β -лактамазы могут инактивировать β -лактамный антибиотик путем гидролиза аминоксвязи в ядре β -лактамного кольца, что приводит к значимому снижению эффективности препарата [Gaub, Rahman, 2023]. Также существует множество ферментов, модифицирующих молекулу антибиотика, из-за чего происходит изменение конфигурации молекулы, что создает стерическое препятствие для связывания препарата с мишенью [Munita, Arias, 2016]. Так, аминогликозид-модифицирующие ферменты, которые делят на три класса – аминогликозидацетилтрансферазы (AAC), аминогликозиднуклеотидилтрансферазы (ANT) и аминогликозидфосфотрансферазы (APH) – меняют структуру аминогликозидного антибиотика путем ацетилирования, аденилирования и фосфорилирования, соответственно [Khan et al., 2024; Thacharodi et al., 2022].

На данный момент в клинической практике практически не исследуется наличие генетических маркеров устойчивости к антибактериальным препаратам у резистентных клинических изолятов, что показывает неполную картину профиля устойчивости бактерий. При постоянном использовании антибактериальных препаратов происходит селекция клонов бактерий, способных выживать при больших дозах токсичного для них вещества, и несущих действующие механизмы защиты, закрепленные генетически. Далее, гены устойчивости могут распространяться среди других микроорганизмов благодаря горизонтальному переносу генов. При этом детекция рекомендованных маркеров зачастую не определяется, что может объясняться постоянными мутациями в генах устойчивости к антибиотикам у бактерий.

В данной работе мы провели сопоставление генетических маркеров резистентности и фенотипического профиля устойчивости к антимикробным препаратам у клинических изолятов *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* и показали, что только у некоторых фенотипически устойчивых изолятов подтверждается наличие распространенных генетических маркеров резистентности к разным классам антибиотиков.

Материалы и методы

В работе были исследованы клинические изоляты, предоставленные Казанским научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии (КНИИЭМ) Роспотребнадзора. Всего было исследовано 40 изолятов *E. coli*: 19 изолятов, взятых из мочи (73, 100, 140, 152, 157, 161, 186, 188, 214, 250, 278, 286, 298, 309, 1691, 2060, 2263, НКС1,

НКС17), 8 из различных отделов кишечника (107, 167, 284, 308, 318, 390, 391, 2086), 7 из зева (7, 320, 349, 382, 388, 398, 928), 6 из гинекологических посевов (112, 165, 343, 345, 360, 3745) и 40 изолятов *K. pneumoniae*: 24 изолята, выделены из зева (70, 73, 93, 113, 127, 143, 216, 241, 265, 292, 316, 330, 423, 444, 457, 461, 3235, 3240, 3318, 3347, 3376, 3395, 3397, 3431), 5 из мочи (188, 433, 462, 3373, 3405), 5 из гинекологических посевов (239, 331, 341, 430, 3306), 4 из различных отделов кишечника (84, 107, 294, 3297), 2 из ран (3402, 3429). Проведение исследований одобрено локальным этическим комитетом по решению ЛЭК-№2 от 15 марта 2023 г. Все пациенты подписали информированное согласие.

Оценку фенотипического проявления толерантности клинических изолятов к антибиотикам проводили при помощи диско-диффузионного метода по рекомендациям МАКМАХ (<https://www.antibiotic.ru/files/321/clrec-dsma2021.pdf>) с нанесением дисков с антибактериальными препаратами Азтреонам (30 мкг/диск), Гентамицин (10 мкг/диск), Амикацин (30 мкг/диск), Ципрофлоксацин (5 мкг/диск), Левофлоксацин (5 мкг/диск), Амоксициллин + клавулановая кислота (20 мкг/10 мкг/диск), Пиперациллин (100 мкг/диск), Цефепим (30 мкг/диск), Цефтазидим (10 мкг/диск), Цефтриаксон (30 мкг/диск), Меропенем (10 мкг/диск), (НИЦФ-Научно-исследовательский центр фармакотерапии, г. Санкт-Петербург). Полученные диско-диффузионным методом результаты были интерпретированы и представлены при помощи онлайн-платформы для анализа и обмена данными антибиотикорезистентности AMRcloud (<https://amrcloud.net/ru/>).

Для поиска генетических маркеров устойчивости изолятов к антибактериальным препаратам проводили полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с выделенной из изолятов ДНК. В качестве праймеров использовали олигонуклеотиды, комплементарные к консервативным участкам генов резистентности к антибиотикам (Таблица 1). ПЦР проводили с помощью термоциклера «BioRad» с использованием Taq-полимеразы в условиях, рекомендованных производителем (Биолабмикс, Россия).

Программа ПЦР: денатурация ДНК при 95 °С в течение 4 мин, затем: 94 °С – 30 сек, отжиг праймеров – 1 мин, 72 °С – время из расчета 1000 нуклеотидов в минуту, всего – 34 цикла, с заключительным синтезом при 72 °С в течение 5 мин. Температуру отжига праймеров рассчитывали с использованием сервера Tm Calculator (<https://tmcaculator.neb.com>, дата доступа 08/02/2023).

Эксперименты были выполнены в трех биологических повторах с тремя техническими повторами в каждом опыте.

Генетический профиль устойчивых изолятов *Enterobacteriaceae*

Таблица 1 – Олигонуклеотиды, использованные для детекции генов антибиотикорезистентности

| Название | Последовательность, 5'→3' | Маркер устойчивости к антибиотику | Источник |
|----------------|---------------------------|--|----------------------|
| mexB for | GTGTTCCGGCTCGCAGTACTC | Пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы, монобактамы, фторхинолоны | Yoneda et al., 2005 |
| mexB rew | AACCGTCGGGATTGACCTTG | | |
| mexD for | CGAGCGCTATTTCGCTGC | Карбапенемы, фторхинолоны | Xavier et al., 2010 |
| mexD rew | GGCAGTTGCACGTCGA | | |
| mexY for | CCGCTACAACGGCTATCCCT | Аминогликозиды | Yoneda et al., 2005 |
| mexY rew | AGCGGGATCGACCAGCTTTC | | |
| ampC for | CTGTTCCGAGATCGGCTC | Пенициллины, цефалоспорины | Xavier et al., 2010 |
| ampC rew | CGGTATAGGTCGCGAG | | |
| aac(3)-IIa for | ACTGTGATGGGATACGCGTC | Аминогликозиды | Saenz et al., 2004 |
| aac(3)-IIa rew | CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA | | |
| aphA1 for | ATGGGCTCGCGATAATGTC | Аминогликозиды | Maynard et al., 2003 |
| aphA1 rew | CTCACCGAGGCAGTTCCAT | | |
| aadB for | CGTCATGGAGGAGTTGGACT | Аминогликозиды | Diaz et al., 2004 |
| aadB rew | CGCAAGACCTCAACCTTTTC | | |

Table 1 – Oligonucleotides for the detection of antibiotic resistance genes

| Names | Sequence, 5'→3' | Antimicrobial resistance marker | Literature |
|----------------|-----------------------|---|----------------------|
| mexB for | GTGTTCCGGCTCGCAGTACTC | Penicillins, cephalosporins, carbapenems, monobactams, fluoroquinolones | Yoneda et al., 2005 |
| mexB rew | AACCGTCGGGATTGACCTTG | | |
| mexD for | CGAGCGCTATTTCGCTGC | Carbapenems, fluoroquinolones | Xavier et al., 2010 |
| mexD rew | GGCAGTTGCACGTCGA | | |
| mexY for | CCGCTACAACGGCTATCCCT | Aminoglycosides | Yoneda et al., 2005 |
| mexY rew | AGCGGGATCGACCAGCTTTC | | |
| ampC for | CTGTTCCGAGATCGGCTC | Penicillins, cephalosporins | Xavier et al., 2010 |
| ampC rew | CGGTATAGGTCGCGAG | | |
| aac(3)-IIa for | ACTGTGATGGGATACGCGTC | Aminoglycosides | Saenz et al., 2004 |
| aac(3)-IIa rew | CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA | | |
| aphA1 for | ATGGGCTCGCGATAATGTC | Aminoglycosides | Maynard et al., 2003 |
| aphA1 rew | CTCACCGAGGCAGTTCCAT | | |
| aadB for | CGTCATGGAGGAGTTGGACT | Aminoglycosides | Diaz et al., 2004 |
| aadB rew | CGCAAGACCTCAACCTTTTC | | |

Результаты

В результате анализа было определено, что аминогликозиды обладают низкой эффективностью в отношении изолятов *E. coli* (Рисунок 1). В группе фторхинолонов антибиотик 3-го поколения Левофлоксацин показал противомикробную активность выше, чем 2-го поколения Ципрофлоксацин. Среди бета-лактамов антибиотиков наибольшая эффективность наблюдалась у карбапенема (Меропенема): чувствительными оказались 37,5% изолятов, с промежуточной устойчивостью – 42,5%, устойчивыми – 20%. При этом половина изолятов (9 из 19), взятых их мочи, была чувствительна к антибиотику. Также 2 из 8 образца из различных отделов кишечного тракта, 2 из 7 образца из зева, 2 из 6 образца из гинекологических посевов, были также чувствительны в Меропенему. Кроме того, была

обнаружена значимая корреляция источника выделения изолятов и их устойчивости к Меропенему ($r = 0.33$ по критерию Спирмена, $p < 0,05$).

В другой группе бета-лактамов антибиотиков – монобактамах, к Азтреонаму были устойчивы 72,5% изолятов, промежуточная резистентность была выявлена у 12,5%, чувствительность – 15%. Цефтриаксон из группы цефалоспоринов класса бета-лактамов подавлял 10% изолятов *E. coli*, частично подавлял 10% изолятов, и оказался неэффективным в отношении 80% изолятов. В отношении Цефепима 10% изолятов фенотипически обладали чувствительностью, в то время как 90% изолятов были резистентны к цефалоспоринолу. Также 85% изолятов оказались устойчивыми к пенициллину Пиперациллину и 75% – Амоксициллину с ингибитором бета-лактамаз клавулановой кислотой. В то же время 15% и 25% изолятов были чувствительны к

Генетический профиль устойчивых изолятов *Enterobacteriaceae*

Пиперациллину и Амоксициллину + клавулановой кислоте соответственно. Так, 9 чувствительных изолятов были получены из 19 образцов мочи и 1 чувствительный изолят был отобран из 7 образцов зева. В отношении

Амоксициллина с клавулановой кислотой также наблюдалась корреляция источника выделения изолятов и их резистентности ($r = 0.45$ по критерию Спирмена, $p < 0,005$).

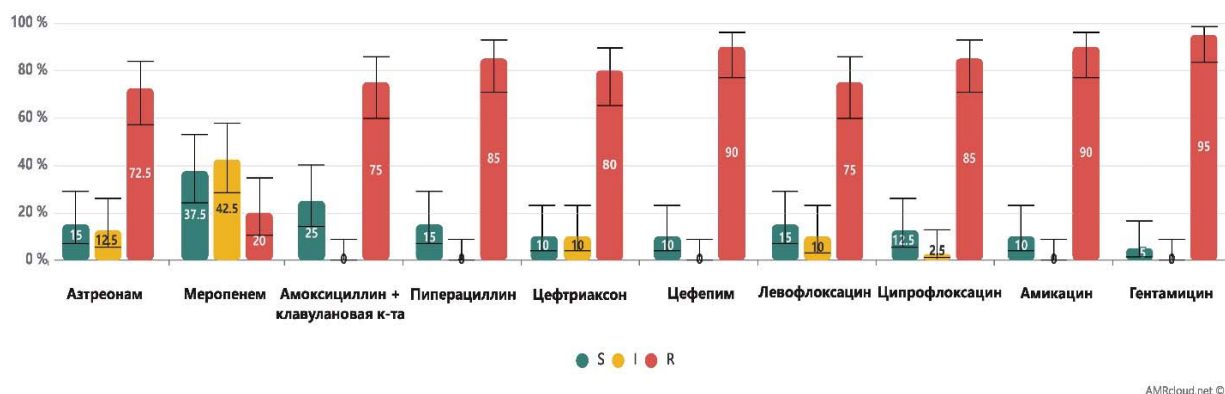


Рисунок 1 – Профиль устойчивости клинических изолятов *E. coli* к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом с 95% ДИ в данном исследовании. S - чувствительный, I – промежуточная чувствительность, R – резистентный. Визуализировано с помощью AMRcloud.net.

Figure 1 - Resistance profile of clinical *E. coli* isolates to antibacterial drugs by disk diffusion method with 95% CI in this study. S - sensitive, I - intermediate sensitivity, R - resistant. Visualized using AMRcloud.net.

В отношении клинических изолятов *K. pneumoniae* антибиотики из группы аминогликозидов не приводили к значительному подавлению роста бактерий (Рисунок 2). Лишь 2,5% образцов оказались чувствительными к Амикацину, остальные 97,5% были устойчивыми. 100% образцов были устойчивыми к Гентамицину. Также в отношении фторхинолонов 97,5% изолятов показали устойчивость к Левофлоксацину и 100% - Ципрофлоксацину. Из класса бета-лактамов антибиотиков цефалоспорины Цефепим и Цефтазидим

показали отсутствие результативного подавления роста бактерий. Оба пенициллина были эффективны в отношении 2,5% изолятов, остальные 97,5% оказались резистентными. К монобактаму 100% образцов оказались устойчивыми. В отношении Меропенема чувствительность среди исследуемых изолятов *K. pneumoniae* была обнаружена только в 2,5% случаев, промежуточная чувствительность была показана в 17,5%, в то время как резистентными были 80% изолятов.

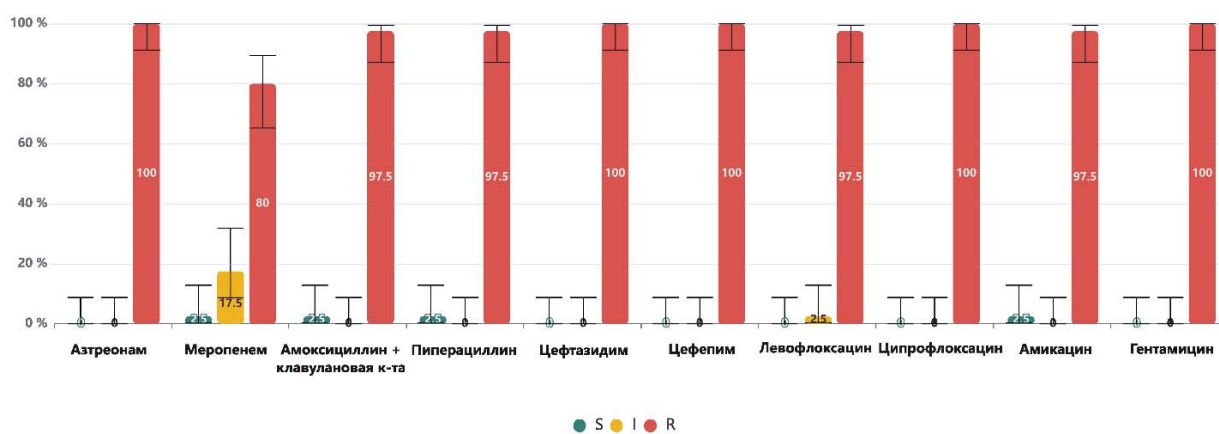


Рисунок 2 – Профиль устойчивости клинических изолятов *K. pneumoniae* к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом с 95% ДИ в данном исследовании. S - чувствительный, I – промежуточная чувствительность, R – резистентный. Визуализировано с помощью AMRcloud.net.

Figure 2 - Resistance profile of clinical isolates of *K. pneumoniae* to antibacterial drugs by disk diffusion method with 95% CI in this study. S - sensitive, I - intermediate sensitivity, R - resistant. Visualized using AMRcloud.net.

Генетический профиль устойчивых изолятов *Enterobacteriaceae*

Таблица 2 – Сопоставление генетических маркеров резистентности и фенотипического профиля устойчивости к антимикробным препаратам у клинических изолятов *E. coli*.

Table 2 – Matching of genetic markers of resistance and the phenotypic profile of resistance to antimicrobial drugs in clinical isolates of *E. coli*.

| Изолят <i>E. coli</i> Isolate <i>E. coli</i> | АТМ ATM | МПН MPN | АКК ACC | ПИП PIP | ЦРО CRO | ЦМП CMP | ЛФЦ LFC | ЦИП CIP | АК AK | ГЕН GEN |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------|------------|
| 7 | | | | | | | | | | |
| 73 | | | | | | | | | | |
| 100 | | | | | | | | | | |
| 107 | | | | | | | | | | |
| 112 | | | | | | | | | | |
| 140 | | | | | | | | | | |
| 152 | | | | | | | | | | |
| 157 | | | | | | | | | | |
| 161 | | | | | | | | | | |
| 165 | | | | | | | | | | |
| 167 | | | | | | | | | | |
| 186 | | | | | | | | | | |
| 188 | | | | | | | | | | |
| 214 | | | | | | | | | | |
| 250 | | | | | | | | | | |
| 278 | | | | | | | | | | |
| 284 | | | | | | | | | | |
| 286 | | | | | | | | | | |
| 298 | | | | | | | | | | |
| 308 | | | | | | | | | | |
| 309 | | | | | | | | | | |
| 318 | | | | | | | | | | |
| 320 | | | | | | | | | | |
| 343 | | | | | | | | | | |
| 345 | | | | | | | | | | |
| 349 | | | | | | | | | | |
| 360 | | | | | | | | | | |
| 382 | | | | | | | | | | |
| 388 | | | | | | | | | | |
| 390 | | | | | | | | | | |
| 391 | | | | | | | | | | |
| 398 | | | | | | | | | | |
| 928 | | | | | | | | | | |
| 1691 | | | | | | | | | | |
| 2060 | | | | | | | | | | |
| 2086 | | | | | | | | | | |
| 2263 | | | | | | | | | | |
| 3745 | | | | | | | | | | |
| NKC1 | | | | | | | | | | |
| NKC17 | | | | | | | | | | |

Примечание: АТМ - Азтреонам, МПН - Меропенем, АКК – Амоксициллин + клавулановая к-та, ПИП – Пиперациллин, ЦРО – Цефтриаксон, ЦМП – Цефепим, ЛФЦ - Левофлоксацин, ЦИП - Ципрофлоксацин, АК - Амикацин и ГЕН – Гентамицин. Цветовое обозначение: белый – отсутствие фенотипической устойчивости

Генетический профиль устойчивых изолятов *Enterobacteriaceae*

и генетических маркеров устойчивости, зеленый – наличие фенотипической устойчивости (R/I) и отсутствие генетических маркеров устойчивости, красный – отсутствие фенотипической устойчивости и наличие генетических маркеров устойчивости, желтый – наличие фенотипической устойчивости (R/I) и генетических маркеров устойчивости.

Note: ATM – Aztreonam, MPN – Meropenem, ACC – Amoxicillin + clavulanic acid, PIP – Piperacillin, CRO – Ceftriaxone, CMP – Cefepime, LFC – Levofloxacin, CIP – Ciprofloxacin, AK – Amikacin and GEN – Gentamicin. Color coding: white – absence of phenotypic resistance and genetic markers of resistance, green – presence of phenotypic resistance (R/I) and absence of genetic markers of resistance, red – absence of phenotypic resistance and presence of genetic markers of resistance, yellow – presence of phenotypic resistance (R/I) and genetic markers of resistance.

Наличие генетических маркеров определяли с помощью ПЦР с идентификацией по конечной точке с помощью электрофореза в агарозном геле. У 4 клинических изолятов *E. coli* был обнаружен ген устойчивости, связанный с эффлюксным насосом по выведению антибиотиков из клетки *texB* (Таблица 2). У 2 изолятов кишечной палочки был идентифицирован ген устойчивости к карбопенемам и фторхинолонам *texD*. В отношении аминогликозидных антибиотиков ген *aac(3)-IIa* был найден у 11 изолятов (107, 112, 165, 286, 298, 308, 388, 391, 928, 2263, NKC17), ген *aphA1* – 6 изолятов (107, 157, 214, 309, 2263, 3745) (Таблица 2). Генетические маркеры *texY*, *ampC* и *aadB* не были обнаружены ни у одного из исследуемых изолятов *E. coli* (Таблица 2).

В результате анализа клинических изолятов *K. pneumoniae*, был обнаружен генетический маркер *texB* в одном случае (143), который может быть причиной толерантности изолята к пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам, монобактамам, фторхинолонам (Таблица 3). Наличие гена *texD* было показано у 4 изолятов (113, 143, 188, 216), что могло

способствовать проявлению у них устойчивости к карбопенемам и фторхинолонам (Таблица 3). У изолята 292 был обнаружен ген *ampC*, который часто встречается у бактерий с резистентностью к пенициллинам и цефалоспорином по всему миру, в том числе и у данного клинического образца (Таблица 3). Генетический маркер устойчивости к аминогликозидам *aac(3)-IIa* был выявлен у 21 клинического изолята (84, 93, 143, 216, 239, 241, 292, 294, 316, 444, 3235, 3297, 3306, 3318, 3347, 3373, 3395, 3397, 3402, 3429, 3431), для которых была показана фенотипическая толерантность к Амикацину и Гентамицину (Таблица 3). Ген *aphA1* был обнаружен у 4 клинических образцов (93, 107, 316, 341) с резистентностью к аминогликозидным антибиотикам (Таблица 3). Также три клинических изолята (84, 93, 3402) по результатам ПЦР содержали ген устойчивости к аминогликозидам *aadB*, что подтверждалось их фенотипической толерантностью к Амикацину и Гентамицину (Таблица 3). Генетический маркер *texY* не был обнаружен в исследуемых клинических образцах.

Таблица 3 – Сопоставление генетических маркеров резистентности и фенотипического профиля устойчивости к антимикробным препаратам у клинических изолятов *K. pneumoniae*.

Table 3 – Matching of genetic markers of resistance and the phenotypic profile of resistance to antimicrobial drugs in clinical isolates of *K. pneumoniae*.

| Изолят <i>K. pneumoniae</i> Isolate <i>K. pneumoniae</i> | АТМ ATM | МПН MPN | АКК ACC | ПИП PIP | ЦАЗ CAZ | ЦМП CMP | ЛФЦ LFC | ЦИП CIP | АК AK | ГЕН GEN |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|----------|------------|
| 70 | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green |
| 73 | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green |
| 84 | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Yellow | Yellow |
| 93 | Green | Green | White | White | Green | Green | Green | Green | Yellow | Yellow |
| 107 | Green | White | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Yellow | Yellow |
| 113 | Green | Yellow | Green | Green | Green | Green | Yellow | Green | Green | Green |
| 127 | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green |
| 143 | Yellow | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Yellow | Yellow |
| 188 | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green |
| 216 | Green | Yellow | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Yellow | Yellow |
| 239 | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Yellow | Yellow |
| 241 | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Yellow | Yellow |
| 265 | Green | White | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green | Green |
| 292 | Green | White | Yellow | Yellow | Yellow | Yellow | Green | Green | Yellow | Yellow |

Генетический профиль устойчивых изолятов *Enterobacteriaceae*

| | | | | | | | | | | |
|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| 294 | | | | | | | | | | |
| 316 | | | | | | | | | | |
| 330 | | | | | | | | | | |
| 331 | | | | | | | | | | |
| 341 | | | | | | | | | | |
| 423 | | | | | | | | | | |
| 430 | | | | | | | | | | |
| 433 | | | | | | | | | | |
| 444 | | | | | | | | | | |
| 457 | | | | | | | | | | |
| 461 | | | | | | | | | | |
| 462 | | | | | | | | | | |
| 3235 | | | | | | | | | | |
| 3240 | | | | | | | | | | |
| 3297 | | | | | | | | | | |
| 3306 | | | | | | | | | | |
| 3318 | | | | | | | | | | |
| 3347 | | | | | | | | | | |
| 3373 | | | | | | | | | | |
| 3376 | | | | | | | | | | |
| 3395 | | | | | | | | | | |
| 3397 | | | | | | | | | | |
| 3402 | | | | | | | | | | |
| 3405 | | | | | | | | | | |
| 3429 | | | | | | | | | | |
| 3431 | | | | | | | | | | |

Примечание: АТМ - Азтреонам, МПН - Меропенем, АКК – Амоксициллин + клавулановая к-та, ПИП – Пиперациллин, ЦАЗ – Цефтазидим, ЦМП – Цефепим, ЛФЦ - Левофлоксацин, ЦИП - Ципрофлоксацин, АК - Амикацин и ГЕН – Гентамицин. Цветовое обозначение: белый – отсутствие фенотипической устойчивости и генетических маркеров устойчивости, зеленый – наличие фенотипической устойчивости (R/I) и отсутствие генетических маркеров устойчивости, красный – отсутствие фенотипической устойчивости и наличие генетических маркеров устойчивости, желтый – наличие фенотипической устойчивости (R/I) и генетических маркеров устойчивости.

Note: ATM – Aztreonam, MPN – Meropenem, ACC – Amoxicillin + clavulanic acid, PIP – Piperacillin, CRO – Ceftriaxone, CMP – Cefepime, LFC – Levofloxacin, CIP – Ciprofloxacin, AK – Amikacin and GEN – Gentamicin. Color coding: white – absence of phenotypic resistance and genetic markers of resistance, green – presence of phenotypic resistance (R/I) and absence of genetic markers of resistance, red – absence of phenotypic resistance and presence of genetic markers of resistance, yellow – presence of phenotypic resistance (R/I) and genetic markers of resistance.

Обсуждение

Диагностика наличия генетических маркеров, ассоциированных с подавлением действия антибиотиков, показывает расхождение генетических детерминант с фенотипической устойчивостью, что говорит о постоянной эволюции антибиотикорезистентности у бактерий. Полученные результаты диско-диффузионного анализа показали, что клинические изоляты *E. coli* были чувствительны к антибиотику из группы карбопенемов – Меропенему в большей степени, чем к остальным бета-лактамам. Возможно, это связано с тем, что карбопенемы более стабильны в присутствии бета-лактамаз. Эти

препараты применяются в случаях тяжелых инфекций, когда остальные бета-лактамы не показывают эффективность [Softley et al., 2020]. Амоксициллин + клавулановая кислота смогли подавить рост четверти всех исследуемых изолятов, что в сравнении с другими антибиотиками демонстрирует более высокую эффективность. Вероятно, это связано с ингибированием клавулановой кислотой β -лактамаз, которые являются частью природной резистентности семейства *Enterobacteriaceae*. В отношении остальных антибиотиков, используемых в данном исследовании, была показана чувствительность изолятов *E. coli* не более 15% от общего количества.

Генетический профиль устойчивых изолятов *Enterobacteriaceae*

В отношении клинических изолятов *K. pneumoniae* большинство антибиотиков, используемых в исследовании оказались неэффективными. Только в отношении Меропенема была показана чувствительность у 2,5% клинических изолятов, а также промежуточная чувствительность у 17,5%. Таким образом, можно сделать вывод, что все исследуемые изоляты *K. pneumoniae* обладали множественной лекарственной устойчивостью, о чем свидетельствует наличие у них фенотипической устойчивости к трем классам антибиотиков.

Полученные нами результаты были сопоставлены с информацией, представленной на онлайн-сервисе по учету и мониторингу резистентности в России AMRmap.ru (дата доступа 8.11.2024). В отношении *E. coli* количество резистентных среди исследуемых изолятов значительно превышало число чувствительных, что разнилось с данными представленными по Российской Федерации. Данные резистентности *K. pneumoniae* по России были схожими с полученными результатами в отношении Азтреонама, Амоксициллина и клавулановой кислоты, Цефтазидима, Цефепима и Ципрофлоксацина, где различие составляло около 20%.

В настоящее время информация о распределении генетических маркеров устойчивости к антибиотикам по России практически отсутствует, что не позволяет увидеть обширную картину их распространения. Наш анализ идентификации генов устойчивости показал широкое распространение генетического маркера *aac(3)-IIa* среди представителей семейства *Enterobacteriaceae*: *E. coli* (28%) и *K. pneumoniae* (53%). Другой генетический маркер резистентности к аминогликозидам *aphA1* был найден у 6 изолятов *E. coli* (15%) и 4 изолятов *K. pneumoniae* (10%), у которых фенотипически также подтверждалась устойчивость к Амикацину и Гентамицину. Ген *aadB* был найден только у 7,5% изолятов *K. pneumoniae*, который также отвечал за резистентность к аминогликозидным антибиотикам, что подтвердилось фенотипически. Результаты исследования показывают распространенность генов АМЕ, детерминированных инактивацией аминогликозидных антибиотиков.

Ген β -лактамазы *ampC* обнаруживался у 2,5% образцов *K. pneumoniae*. Известно, что для многих *Enterobacteriaceae* характерна низкая экспрессия AmpC, однако она индуцируется в ответ на воздействие β -лактамов [Berrazeg, 2015].

Белок MexB *P. aeruginosa* схож со своим аналогом AcrB из *E. coli* с 70% идентичностью и 83,2% сходством последовательностей [Vasudevan et al., 2014]. Также он может функционально заменять AcrB в клетках *E. coli* [Du et al., 2013; Venter et al., 2015]. Поэтому мы решили проверить возможно ли

определить гены устойчивости белков других эффлюксных насосов в клетках *E. coli* и *K. pneumoniae*. Результаты ПЦР показали наличие генетических маркеров *mexB* у 10% изолятов *E. coli* и у 2,5% *K. pneumoniae*, маркер *mexD* был найден в 5% образцах кишечной палочки и 10% - *K. pneumoniae*. Данный результат дает мотив проверить гомологичность последовательностей генов устойчивости между белками эффлюксных помп RND этих бактерий.

Маркеры *mexY*, *ampC* и *aadB* в исследуемых изолятах *E. coli* и *mexY* - *K. pneumoniae* не были найдены, что может говорить об отсутствии идентичных MexY белков в бактериях и, вероятно, альтернативных AmpC и AadB механизмов защиты в клетках кишечной палочки.

Заключение

В результате исследования был показан высокий процент фенотипической устойчивости клинических изолятов *E. coli* к различным антибиотикам (72,5% - 95% устойчивых образцов), кроме Меропенема (20% устойчивых образцов). В отношении изолятов *K. pneumoniae* была показана практически полная резистентность к используемым антибиотикам (80% - 100% устойчивых образцов).

Учет распространения генетических маркеров устойчивости к антибиотикам в России мало изучен. Самыми частыми маркерами у *E. coli* в данном исследовании оказались *aac(3)-IIa* (28% изолятов), *aphA1* (15% изолятов) с подтвержденной фенотипической резистентностью. У исследуемых изолятов *K. pneumoniae* самым распространенным генетическим маркером являлся *aac(3)-IIa* (5% изолятов). Мониторинг распространенности генов устойчивости необходим для оптимизации использования антибактериальных препаратов с учетом рисков горизонтального переноса генетических маркеров и возможностью понижения скорости их распространения среди патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.

Благодарности

Благодарим сотрудников ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» за предоставленные клинические изоляты.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2022-0017.

Декларация о конфликте интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.

Генетический профиль устойчивых изолятов *Enterobacteriaceae*

Участие авторов в создании статьи

Я.Л.Л. – проведение исследования, сбор и интерпретация результатов; З.Д.А. – проведение исследования; Б.Л.Т. – предоставление материала исследования; Т.Е.Ю. – интерпретация результатов и осуществление стилистической обработки содержания статьи.

Литература

1. Barbu I.C., Gheorghie-Barbu I., Grigore G.A., Vrancianu C.O., Chifiriuc M.C. Antimicrobial Resistance in Romania: Updates on Gram-Negative ESCAPE Pathogens in the Clinical, Veterinary, and Aquatic Sectors // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. V. 24(9). 7892. doi: 10.3390/ijms24097892
2. Berrazeg M., Jeannot K., Ntsogo Enguene V. Y., Broutin L., Loeffert S., Fournier D., Plesiat P. Mutations in β -Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015. V. 59(10). P.6248-6255. doi: 10.1128/AAC.00825-15
3. Diaz P.Q., Bello H.T., Dominguez M.Y., Trabal N.F., Mella S.M., Zemelman R.Z., Gonzalez G.R. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de beta-lactamasas // *Rev Med Chil*. 2004. V. 132(10). P. 1173-1178. doi:10.4067/s0034-98872004001000003
4. Du D. Wang-Kan X., Neuberger A., Veen H. W., Pos K. M., Piddock L. J. V., Luisi B. F. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation // *Nature Reviews Microbiology*. 2018. V.16. P.523-539. doi: 10.1038/s41579-018-0048-6
5. Gauba A., Rahman K.M., Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Negative Bacteria // *Antibiotics (Basel)*. 2023. V. 12(11). 1590. doi:10.3390/antibiotics12111590
6. Khan R.T., Sharma V., Khan S.S., Rasool S. Prevention and potential remedies for antibiotic resistance: current research and future prospects // *Front Microbiol*. 2024. V. 3(15). 1455759. doi: 10.3389/fmicb.2024.1455759
7. Lakhundi S., Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology // *Clin Microbiol*. 2018. V. 31(4). e00020-18. doi: 10.1128/cmr.00020-18.
8. Martínez-Trejo A., Ruiz-Ruiz J.M., Gonzalez-Avila L.U., Saldana-Padilla A., Hernandez-Cortez C., Loyola-Cruz M. A., Bello-Lopez J. M., Castro-Escarpulli G. Evasion of Antimicrobial Activity in *Acinetobacter baumannii* by Target Site Modifications: An Effective Resistance Mechanism // *Int J Mol Sci*. 2022. V. 23(12) 6582. doi:10.3390/ijms23126582
9. Maynard C., Fairbrother J.M., Bekal S., Sanschagrin F., Levesque R.C., Brousseau R., Masson L., Lariviere S., Harel J. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs // *Antimicrob Agents Chemother*. 2003. V. 47(10). P. 3214-3221. doi: 10.1128/AAC.47.10.3214-3221.2003
10. Munita J.M., Arias C.A. Mechanisms of Antibiotic Resistance // *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*. 2016. P. 481–511. doi: 10.1128/9781555819286.ch17
11. Oliveira M., Antunes W., Mota S., Madureira-Carvalho A., Dinis-Oliveira R.J., Dias da Silva D. An Overview of the Recent Advances in Antimicrobial Resistance // *Microorganisms*. 2024. V. 12(9). 1920. doi:10.3390/microorganisms12091920
12. Saenz Y., Brinas L., Dominguez E., Ruiz J., Zarazaga M., Vila J., Torres C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins // *Antimicrob Agents Chemother*. 2004. V. 48(10). P. 3996-4001. doi:10.1128/AAC.48.10.3996-4001.2004
13. Softley C.A., Zak K.M., Bostock M.J., Fino R., Zhou R.X., Kolonko M., Mejdí-Nitiu R., Meyer H., Sattler M., Popowicz G. M. Structure and Molecular Recognition Mechanism of IMP-13 Metallo- β -Lactamase // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020. V. 64(7). e01077-20. doi: 10.1128/AAC.01077-20
14. Terreni M., Taccani M., Pregolato M. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives // *Molecules*. 2021.V. 26(9). 2671. doi:10.3390/molecules26092671
15. Thacharodi A., Lamont I. L. Aminoglycoside-Modifying Enzymes Are Sufficient to Make *Pseudomonas aeruginosa* Clinically Resistant to Key Antibiotics // *Antibiotics*. 2022. V. 11(7). 884. doi: 10.3390/antibiotics11070884
16. Vasudevan A. Mohanalakshmi N., Dineshkumar K., Hopper W. Identification of inhibitors for RND efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* using structure - based pharmacophore modeling approach // *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014. V.6. P.84–89. doi: 10.1371/journal.pone.0101840
18. Venter. H., Mowla R., Ohene-Agyei T., Ma S. RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition // *Front Microbiol*. 2015. V. 6(18). 377. doi: 10.3389/fmicb.2015.00377

Генетический профиль устойчивых изолятов *Enterobacteriaceae*

19. Xavier D.E., Picao R.C., Girardello R., Fehlberg L.C., Gales A.C. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil // *BMC Microbiol.* 2010. V. 10. 217. doi:10.1186/1471-2180-10-217
20. Yoneda K., Chikumi H., Murata T., Gotoh N., Yamamoto H., Fujiwara H., Nishini T., Shimizu E. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction // *FEMS Microbiol Lett.* 2005. V. 243(1). P. 125-131. doi: 10.1016/j.femsle.2004.11.048

References

1. Barbu I.C., Gheorghe-Barbu I., Grigore G.A., Vrancianu C.O., Chifiriuc M.C. Antimicrobial Resistance in Romania: Updates on Gram-Negative ESCAPE Pathogens in the Clinical, Veterinary, and Aquatic Sectors. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023. V. 24(9). 7892. doi: 10.3390/ijms24097892
2. Berrazeg M., Jeannot K., Ntsogo Enguene V. Y., Broutin L., Loeffert S., Fournier D., Plesiat P. Mutations in β -Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2015. V. 59(10). P.6248-6255. doi: 10.1128/AAC.00825-15
3. Diaz P.Q., Bello H.T., Dominguez M.Y., Trabal N.F., Mella S.M., Zemelman R.Z., Gonzalez G.R. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie pneumoniae productoras de beta-lactamasas. *Rev Med Chil.* 2004. V. 132(10). P. 1173-1178. doi:10.4067/s0034-98872004001000003
4. Du D. Wang-Kan X., Neuberger A., Veen H. W., Pos K. M., Piddock L. J. V., Luisi B. F. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology.* 2018. V.16. P.523-539. doi: 10.1038/s41579-018-0048-6
5. Gauba A., Rahman K.M., Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel).* 2023. V. 12(11). 1590. doi:10.3390/antibiotics12111590
6. Khan R.T., Sharma V., Khan S.S., Rasool S. Prevention and potential remedies for antibiotic resistance: current research and future prospects. *Front Microbiol.* 2024. V. 3(15). 1455759. doi: 10.3389/fmicb.2024.1455759
7. Lakhundi S., Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin Microbiol.* 2018. V. 31(4). e00020-18. doi: 10.1128/cmr.00020-18.
8. Martínez-Trejo A., Ruiz-Ruiz J.M., Gonzalez-Avila L.U., Saldana-Padilla A., Hernandez-Cortez C., Loyola-Cruz M. A., Bello-Lopez J. M., Castro-Escarpulli G. Evasion of Antimicrobial Activity in *Acinetobacter baumannii* by Target Site Modifications: An Effective Resistance Mechanism. *Int J Mol Sci.* 2022. V. 23(12) 6582. doi:10.3390/ijms23126582
9. Maynard C., Fairbrother J.M., Bekal S., Sanschagrin F., Levesque R.C., Brousseau R., Masson L., Lariviere S., Harel J. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003. V. 47(10). P. 3214-3221. doi:10.1128/AAC.47.10.3214-3221.2003
10. Munita J.M., Arias C.A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens.* 2016. P. 481-511 doi: 10.1128/9781555819286.ch17
11. Oliveira M., Antunes W., Mota S., Madureira-Carvalho A., Dinis-Oliveira R.J., Dias da Silva D. An Overview of the Recent Advances in Antimicrobial Resistance. *Microorganisms.* 2024. V. 12(9). 1920. doi:10.3390/microorganisms12091920
12. Saenz Y., Brinas L., Dominguez E., Ruiz J., Zarazaga M., Vila J., Torres C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004. V. 48(10). P. 3996-4001. doi:10.1128/AAC.48.10.3996-4001.2004
13. Softley C.A., Zak K.M., Bostock M.J., Fino R., Zhou R.X., Kolonko M., Mejdí-Nitiu R., Meyer H., Sattler M., Popowicz G. M. Structure and Molecular Recognition Mechanism of IMP-13 Metallo- β -Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2020. V. 64(7). e01077-20. doi: 10.1128/AAC.01077-20
14. Terreni M., Taccani M., Pregnotato M. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. *Molecules.* 2021.V. 26(9). 2671. doi:10.3390/molecules26092671
15. Thacharodi A., Lamont I. L. Aminoglycoside-Modifying Enzymes Are Sufficient to Make *Pseudomonas aeruginosa* Clinically Resistant to Key Antibiotics. *Antibiotics.* 2022. V. 11(7). 884. doi: 10.3390/antibiotics11070884
16. Vasudevan A. Mohanlakshmi N., Dineshkumar K., Hopper W. Identification of inhibitors for RND efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* using structure - based pharmacophore modeling approach. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2014. V.6. P.84-89. doi: 10.1371/journal.pone.0101840

Генетический профиль устойчивых изолятов *Enterobacteriaceae*

18. Venter. H., Mowla R., Ohene-Agyei T., Ma S. RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. *Front Microbiol.* 2015. V. 6(18). 377. doi: 10.3389/fmicb.2015.00377
19. Xavier D.E., Picao R.C., Girardello R., Fehlberg L.C., Gales A.C. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiol.* 2010. V. 10. 217. doi:10.1186/1471-2180-10-217
20. Yoneda K., Chikumi H., Murata T., Gotoh N., Yamamoto H., Fujiwara H., Nishini T., Shimizu E. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol Lett.* 2005. V. 243(1). P. 125-131. doi: 10.1016/j.femsle.2004.11.048