

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ *MEF* И *ERMВ* ПРИ ПОДБОРЕ ДОНОРОВ ФЕКАЛЬНОЙ МИКРОБИОТЫ

А. В. Господарик¹ ✉, Л. А. Улаханова¹, С. С. Есиев¹, Е. В. Полякова¹, Я. Д. Шанский¹, Ю. А. Беспятых^{1,2,3}

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени Ю. М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Москва, Россия

³ Национальный научно-исследовательский институт общественного здоровья имени Н. А. Семашко, Москва, Россия

Трансплантацию фекальной микробиоты (ТФМ) назначают в качестве терапии для лечения различных патологий желудочно-кишечного тракта. Подбор донора является одним из наиболее важных и значимых этапов для ТФМ. Особое внимание в последнее время уделяют проблеме наличия генов устойчивости к разным группам антибиотиков в биоматериале. Целью исследования было провести анализ встречаемости генетических маркеров лекарственной устойчивости *mef* и *ermB* среди разных возрастных групп населения, включая младенцев на грудном вскармливании, а также определить микробиологический состав дистальной части кишечника у потенциально здоровых добровольцев доноров ТФМ. Всего было проанализировано 52 образца биологического материала (46 образцов кала и шесть — грудного молока) методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Ген устойчивости к макролидам (*mef*) среди разных возрастных групп был выявлен в 97,8% образцах кала, ген устойчивости к макролидам, линкозамидам, стрептограмину (*ermB*) — в 93,5%. В отдельно выделенной группе «мать – дитя» ген *mef* обнаружен во всех образцах грудного молока и кала. Ген *ermB* в этой группе подтвержден в трех из шести образцов грудного молока и четырех из шести образцов кала младенцев. В результате детекции генетических детерминант *mef* и *ermB* не только среди взрослого населения, но и у младенцев, было выдвинуто предположение, что использование трансплантата (кала), содержащего данные гены допустимо для ТФМ. Анализ микробиологического состава кала 23 здоровых добровольцев — потенциальных доноров ТФМ, показал очень низкий процент соответствия (8,7%) нормам микробиоты дистальной части кишечника.

Ключевые слова: ТФМ, гены резистентности, *mef*, *ermB*, доноры фекальной микробиоты, ПЦР

Финансирование: Грант АНО «Московский центр инновационных технологий в здравоохранении» (№ 2412-31).

Вклад авторов: А. В. Господарик — подбор участников исследования, анализ биологических образцов методом ПЦР, анализ литературы, написание статьи; Л. А. Улаханова — анализ литературы, написание статьи, бактериологический посев кала, бактериологический анализ; С. С. Есиев — анализ литературы, выделение нуклеиновых кислот из биологических образцов; Е. В. Полякова — практическая часть бактериологического анализа, выделение нуклеиновых кислот из биологических образцов; Я. Д. Шанский — статистическая обработка данных; Ю. А. Беспятых — концепция исследования, консультирование, написание и редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России (протокол номер 2022/05/31 от 31 мая 2022 г.). Добровольное информированное согласие подписано всеми участниками исследования.

✉ **Для корреспонденции:** Алина Владимировна Господарик
Красногорское шоссе, д. 15, г. Одинцово, Московская обл., 143007, Россия; alina.gospodarik@rocpm.org

Статья получена: 20.10.2022 **Статья принята к печати:** 25.11.2022 **Опубликована онлайн:** 16.12.2022

DOI: 10.24075/vrgmu.2022.059

THE ROLE OF *MEF* AND *ERMВ* DRUG RESISTANCE GENETIC MARKERS IN THE SELECTION OF FECAL MICROBIOTA DONORS

Gospodaryk AV¹ ✉, Ulakhanova LA¹, Esiev SS¹, Polyakova EV¹, Shansky YD¹, Bespyatykh JA^{1,2,3}

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center Of Physical-Chemical Medicine under the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

³ Semashko National Research Institute of Public Health, Moscow, Russia

Fecal microbiota transplantation (FMT) is prescribed to treat various gastrointestinal pathologies. One of the most important and significant stages of FMT is selection of the donor. In recent years, special attention has been paid to checking the biomaterial for genes marking resistance to various groups of antibiotics. This study aimed to analyze the occurrence of *mef* and *ermB* drug resistance genetic markers in population of various age groups, including breastfed infants, and to determine microbiological composition of the flora of distal part of the intestine of potentially healthy volunteering FMT donors. A total of 52 biological samples (46 stool samples and 6 breast milk samples) were analyzed by real-time polymerase chain reaction. The macrolides resistance gene (*mef*) was detected in 97.8% of stool samples (different age groups), the gene marking resistance to macrolides, lincosamides, streptogramin (*ermB*) — in 93.5%. In the isolated "mother-child" group, the *mef* gene was found in all samples of breast milk and feces. The *ermB* gene in this group was found in 3 out of 6 breast milk samples and 4 out of 6 infant stool samples. Since the *mef* and *ermB* genetic determinants were identified not only among in adults but also in infants, it was suggested that transplant material (feces) containing these genes can be used for FMT. The analysis of microbiological composition of stool samples from 23 healthy volunteers (potential FMT donors) revealed that it rarely (in 8.7% of cases only) corresponds to what is considered to be a normal microbiota of the intestine's distal part.

Keywords: FMT, antibiotic resistance gene, *mef*, *ermB*, fecal microbiota donor, PCR

Funding: Grant of ANO Moscow Center for Innovative Technologies in Healthcare (#2412-31).

Author contribution: Gospodaryk AV — selection of study participants, PCR analysis of biological samples, literature analysis, article authoring; Ulakhanova LA — literature analysis, article authoring, fecal culture, bacteriological analysis; Esiev SS — literature analysis, isolation of nucleic acids from biological samples; Polyakova EV — practical part of the bacteriological analysis, isolation of nucleic acids from biological samples; Shansky YD — statistical data processing; Bespyatykh JA — study concept, consulting, article authoring and editing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Federal Research and Clinical Center Of Physical-Chemical Medicine under the Federal Medical Biological Agency of Russia (Minutes #2022/05/31 of May 31, 2022). All study participants signed the voluntary informed consent form.

✉ **Correspondence should be addressed:** Alina V. Gospodaryk
Krasnogorskoe shosse, 15, Odintsovo, Moscow region, 143007, Russia; alina.gospodarik@rocpm.org

Received: 20.10.2022 **Accepted:** 25.11.2022 **Published online:** 16.12.2022

DOI: 10.24075/brsmu.2022.059

На сегодняшний день трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ) становится все более востребованным подходом к коррекции дисбиоза микробиоты, обусловленного различными патологическими состояниями. ТФМ представляет собой процедуру введения взвеси фекалий здорового донора в кишечный тракт реципиента с целью терапии или профилактики ряда заболеваний посредством изменения микробиома реципиента [1–3]. На основании большого числа рандомизированных исследований доказана высокая эффективность применения метода при рефрактерных и рецидивирующих формах кишечных инфекций, вызванных *Clostridium difficile* [1, 4, 5]. С 2013 г. процедура ТФМ официально одобрена Управлением по контролю пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (Food & Drug Administration, FDA) [6].

Выбор и скрининг доноров является одним из наиболее важных аспектов ТФМ, так как обеспечивает ее безопасность для пациента. Отбор доноров самый трудоемкий и ресурсозатратный и состоит из нескольких этапов: анкетирования (для сбора анамнеза заболеваний донора) и лабораторного обследования (предотвращает возможную передачу патогенов реципиенту). Лабораторное обследование донора включает в себя: базовые гематологические и биохимические исследования крови, анализ на гепатиты В и С, вирус иммунодефицита человека, сифилис, общий анализ мочи, копрограмму, анализ кала на скрытую кровь, простейшие и яйца гельминтов, бактериальный посев кала, анализ кала методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на патогенную кишечную флору и выявление генетических маркеров лекарственной устойчивости (наличие генов резистентности) [7, 8].

В последнее время наблюдается активное распространение микроорганизмов, несущих гены устойчивости к антибиотикам различных групп [9]. Обусловлено это, в частности, повсеместным повышением частоты применения антимикробных препаратов широкого спектра действия. Давление, оказываемое антибиотиками на микробную популяцию, приводит к мутации или трансформации генетического материала, обеспечивающего выработку новых механизмов адаптации к изменяющимся условиям [10]. Помимо этого, существует механизм передачи генов устойчивости от одной бактерии к другой, происходящий с помощью мобильных элементов (плазмиды, транспозоны и интегроны). Распространение генов устойчивости к антибиотикам происходит в результате техногенного развития разных секторов промышленности не только среди микроорганизмов, непосредственно взаимодействующих с человеком, но и в природе. Устойчивые бактерии были выделены из глубоких подземных траншей, в сточных водах, поверхностных и грунтовых водах, отложениях и почвах [11]. Они присутствуют также в организмах, живущих в местах, относительно не затронутых человеческой цивилизацией, таких как Антарктида и Арктика [12]. Распространение генов резистентности к антибиотикам возрастает с каждым годом. Так, в одном из исследований, длившемся с 2011 по 2015 г. были изучены частота и механизмы устойчивости к макролидам штаммов *Streptococcus pyogenes*, выделенных из микрофлоры человека. Результаты показали возросшую резистентность патогена к макролидам на 6,8–12,6% от общего числа исследуемых штаммов [13].

При подборе доноров для трансплантации микробиоты особый интерес вызывают гены, обуславливающие устойчивость бактерий родов *Streptococcus* и

Staphylococcus к макролидам, линкозамидам и стрептограммам. К данной группе относятся ген *mef* (*macrolide efflux*), продуктами которого являются эффлюксные белки, и ген *ermB* (*erythromycin ribosome methylation*), кодирующий 23S рРНК-метилазу, которая модифицирует молекулы мишени антибактериальных препаратов (АБП) [14, 15]. В другом исследовании отмечено широкое распространение генетических детерминант *mefA* и *ermB*, где оба гена резистентности были детектированы во всех образцах кишечной микробиоты больных хронической обструктивной болезнью легких (не применявших антибиотики минимум три месяца) как метагеномным методом, так и методом ПЦР в реальном времени [16, 17]. Гены резистентности в больших количествах были также обнаружены в образцах фекалий и даже меконии новорожденных детей [18].

Частое распространение данных генов среди потенциальных доноров для ТФМ вызывает проблему отбора подходящих индивидумов для предоставления здоровой микробиоты.

Целью данной работы было провести анализ встречаемости генетических маркеров лекарственной устойчивости *mef* и *ermB* среди различных возрастных групп населения, а также определить микробиологический состав дистальной части кишечника у потенциальных доноров микробиоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор образцов

Первичный отбор доноров проводили на основании анкетирования и согласно разработанному алгоритму [7]. Критерии включения: любой пол; возраст 18–55 лет, не принимавших антибактериальные препараты с лечебной целью от года и более. Образцы кала в данной группе исследуемых отбирали для определения состава микрофлоры, обнаружения патогенных микроорганизмов и анализа наличия генов резистентности. Критерии исключения: наличие в анамнезе заболеваний, связанных с нарушением состава кишечной микробиоты, хронических заболеваний и/или прием АБП. Согласно полученным данным из 57 обследованных добровольцев в исследование включены 23 здоровых добровольца, потенциальных донора фекальной микробиоты. Остальные добровольцы исключены из дальнейшего анализа ввиду отклонений от нормы показателей анализа крови.

Дополнительно в исследование включена группа «мать–дитя». Методом случайной выборки на основании информированного согласия биологический материал был получен от следующих категорий участников исследования: а) младенцы до 1 года, находящиеся на грудном вскармливании и никогда не принимавшие АБП; б) младенцы до 1 года на искусственном вскармливании, никогда не принимавшие АБП; в) дети 1–3 лет, никогда не принимавшие АБП; г) дети 3–7 лет, не принимавшие АБП больше года. В группу «мать–дитя» вошли шесть пар (кормящая мать/ребенок на грудном вскармливании), у которых были отобраны образцы кала (матери и младенца) и грудного молока.

Всего в исследование включено 52 образца биологического материала, из них 46 образцов кала и шесть образцов грудного молока. Среди образцов кала ($n = 46$) 29 получено от взрослого населения, девять — от младенцев (2–11 месяцев), шесть детей находилось

Таблица 1. Метод бактериологического посева кала

Разведение	Группа идентифицируемых микроорганизмов	Питательная среда	Количество вносимой суспензии, мл	Время культивирования, ч	Оценка результатов
2	3	4	5	6	7
10^{-8}	<i>Bifidobacterium</i>	Блаурокк	1	72	Окраска по Граму, микроскопирование
10^{-7}	<i>Lactobacillus</i>	МРС-2			
10^{-5}	<i>Clostridium</i>	Железо-сульфитный агар	1	72	Выделение сероводорода (окраска среды в черный цвет), газообразование
	Гемолитические виды бактерий	Кровяной агар			
10^{-3}	Энтеробактерии	Эндо	0.1	48	Учет бактерий по ферментации лактозы: + розовые колонии и питательная среда; — прозрачные колонии, цвет среды не изменяется
	Патогенные грибы	Сабуро			
	<i>Staphylococcus</i>	Желточно-солевой агар			
	Enterococcus	Молочно-ингибиторная среда			
10^{-1}	Патогенные энтеро-бактерии	XLD-агар	0.1	20–22	<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> spp. прозрачные, у сальмонелл — бесцветные с черным центром, <i>E. coli</i> — непрозрачные желтые с желтой зоной вокруг, <i>Proteus mirabilis</i> — желтые с черным центром
		SS-агар			

на грудном вскармливании и трое — на искусственном; четыре образца — дети 1–3 лет; четыре образца — дети 3–7 лет.

Забор кала и грудного молока осуществляли в индивидуальный стерильный пластиковый контейнер. Образец весом 10–20 г (кал) и 10–20 мл (молоко) не подвергали заморозке, а как можно скорее отправляли в термоконтейнере для исследования либо хранили не более 8 ч при температуре 4 °С до момента его передачи.

Бактериологический посев кала

Посев проводили согласно нормативным документам [19]. Образец нативного образца кала массой 1 г гомогенизировали в 9 мл физиологического раствора (10^{-1}), оставляли при комнатной температуре на 10–15 мин. Полученную суспензию высевали на плотные питательные среды для выявления патогенных энтеробактерий (SS- и XLD-агар (HiMedia Laboratories; Индия) и селенитовый бульон (Биокомпас-С; Россия) для выделения патогенных кишечных палочек. Из исходного разведения (10^{-1}) готовили ряд последующих до 10^{-8} .

Из приготовленных разведений делали посеvy на питательные среды для культивирования различных групп микроорганизмов (на полужидкие питательные среды суспензию вносили в количестве 1 мл, на плотные — 0,1 мл, растирали стерильным шпательом по поверхности среды):

– разведение 10^{-8} — бифидобактерии на полужидкую питательную среду Блаурокк (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия);

– разведение 10^{-7} — лактобактерии на полужидкую питательную среду МРС-2 (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия) и бифидобактерии на среду Блаурокк (ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенск, Россия);

– разведение 10^{-5} — клостридии, посев производили глубинным методом на железосульфитный агар («Биокомпас-С»; Россия), в количестве 1 мл; грамотрицательные энтеробактерии — среда Эндо (HiMedia Laboratories; Индия); гемолитические виды бактерий — кровяной агар (HiMedia Laboratories; Индия).

– разведение 10^{-3} высевали на среду Эндо («Биокомпас-С»; Россия); для выявления патогенных грибов — среду Сабуро («Биотехновация»; Россия); стафилококков — желточно-солевой агар (HiMedia Laboratories; Индия); энтерококков — молочно-ингибиторную среду («Биокомпас-С»; Россия) (табл.1).

Оценку бактериологического анализа проводили:

– через 20–22 ч на средах Эндо, кровяной агар, SS- и XLD-агар;

– через 48 ч на средах Сабуро, желточно-солевой агар и молочно-ингибиторной;

– через 72 ч на средах Блаурокк, МРС-2, железосульфитный агар.

На средах Эндо подсчитывали число и процент лактозонегативных (бесцветных) колоний по отношению

Таблица 2. Бактериологическое исследование образцов кала потенциально здоровых добровольцев

№ п/п	Микрофлора	Норма, КОЕ/г	Число добровольцев, человек		p
			В пределах нормы	Отклонение от нормы	
1	<i>Bifidobacterium spp</i>	10 ⁶ и выше	13	10	0,678
2	<i>Lactobacillus spp</i>	10 ⁶ –10 ⁷	12	11	0,835
3	Общее количество энтеробактерий	10 ⁷ –10 ⁸	12	11	0,835
4	<i>Escherichia spp</i>	10 ⁷ –10 ⁸	12	11	0,835
5	<i>Enterococcus spp</i>	10 ⁶ –10 ⁷	4	19	0,004
6	Условно-патогенные энтеробактерии: <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Enterobacter gergoviae</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Citrobacter amalonaticus</i> . лактозонегативная <i>Escherichia coli</i>	< 10 ⁴	8	15	0,211
7	Патогенные микроорганизмы семейства кишечных	Не должно быть	23	0	< 0,001
8	<i>Staphylococcus</i>	≤ 10 ⁴ / не должно быть	9	14	0,404
	<i>S. aureus</i>	≤ 10 ⁴ / не должно быть	21	2	< 0,001
9	<i>Candida spp</i>	≤ 10 ⁴	23	0	< 0,001
10	Неферментирующие грамотрицательные бактерии в т.ч. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas putida</i>	≤ 10 ⁴	19	4	0,004
11	Сульфитредуцирующие анаэробы рода <i>Clostridium</i>	≤ 10 ⁶	12	11	0.835

ко всему числу выросших колоний. Колонии со слабовыраженными ферментативными свойствами (слабое разложение лактозы — розовые колонии) подсчитывали по отношению к общему числу колоний кишечной палочки. Согласно имеющимся рекомендациям, родовой состав лактозонегативных энтеробактерий, не относящихся к патогенным бактериям семейства кишечных, можно не детализировать, а ограничиться определением на среде Эндо общей суммы лактозонегативных колоний.

Экстракция ДНК из биологического материала

Экстракцию ДНК из биологического материала (кал, грудное молоко) выполняли с использованием набора «ДНК-СОРБЕНТ» («Литех»; Россия) согласно протоколу производителя. Выделение ДНК из грудного молока выполняли по схеме выделения ДНК из слюны, ликвора, синовиальной жидкости. До проведения ПЦР выделенную ДНК хранили при температуре –20 °С.

Анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости

Анализ проводили с использованием моноплексного набора «РЕЗИСТОМ.Mef» (выявление *mef*-генов резистентности *Streptococcus spp.* к макролидам) и «РЕЗИСТОМ. ErmB» (выявление *erm*-генов резистентности *Streptococcus spp.* и *Staphylococcus spp.* к макролидам, линкозамидам и стрептомицину В) формата ФЛУОРОПОЛ-РВ («Литех»; Россия) методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories; США). Всего было протестировано 52 образца ДНК, выделенной из биологического материала (кала и молока). Для контроля

качества выделения ДНК, а также предотвращения возникновения ложноотрицательных результатов в наборе использовали внутренний экзогенный контроль (детектируемый по каналу HEX), который вносится в исследуемые образцы на этапе экстракции ДНК. ПЦР проводили в следующем режиме: 80 °С — 2 мин, 95 °С — 1 мин 30 с, затем 40 циклов: 95 °С — 15 с, 60 °С — 30 с, 72 °С — 40 с.

Статистический анализ

Статистическую обработку выполняли с использованием программы Statistica 10.0 (StatSoft Inc.; США). Значимость различий наблюдаемых частот генов АБР в группах оценивали по критерию χ^2 Пирсона с поправкой Йейтса. Значимость различий частот для бактериологических показателей оценивали по критерию Мак-Немара. Различие считали статистически значимым при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно данным анкетирования и результатам клинических исследований (общий и биохимический анализ крови) из 57 обследованных добровольцев для дальнейшего исследования включены 23 человека — потенциальных донора фекальной микробиоты.

Для установления вероятного минимального возраста формирования носительства и путей передачи генов резистентности к макролидам (*mef* и *ermB*) сформирована группа «мать–дитя» (6 человек). Из данной группы в исследование включено 12 образцов кала и 6 образцов грудного молока.

Таблица 3. Распространение генов устойчивости *mef* и *ermB* в кале среди разных возрастных групп населения

Гены	Группа «мать–дитя»		Дети на искусственном вскармливании	Дети 1–3 лет	Дети 3–7 лет	Взрослые
	кал младенца	кал матери				
<i>mef</i>	6/6	6/6	3/3	4/4	3/4	23/23
<i>ermB</i>	4/6	6/6	2/3	4/4	4/4	23/23

Примечание: * — численно отражено отношение количества образцов, в которых был выявлен ген, к общему количеству образцов в данной группе.

Таблица 4. Распространение генов устойчивости *mefA* и *ermB* в группе «мать–дитя»

Гены	Мать–дитя		
	Грудное молоко	Кал младенца	Кал матери
<i>mef</i>	6/6	6/6	6/6
<i>ermB</i>	3/6	4/6	6/6

Примечание: * — численно отражено соотношение количества образцов, в которых был выявлен ген, к общему количеству образцов в данной группе.

Бактериологический анализ

В ходе работы была проведена предварительная оценка качественного и количественного бактериологического состава образцов кала потенциально здоровых добровольцев ($n = 23$). Результаты бактериологического посева соответствовали нормативным документам [20] и представлены в табл. 2.

Содержание видов облигатной микрофлоры, таких как *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, находится в норме у 52,2% исследуемых; *Enterococcus* — у 8,7%. Условно-патогенные бактерии факультативной микрофлоры не превышают нормы у 34,8% добровольцев и представлены видами *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter amalonaticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Enterobacter gergoviae*, лактозонегативная *Escherichia coli*.

Таким образом, анализ бактериологического посева показал, что соответствие нормам по всем показателям только 8,7% добровольцев, что составляет лишь четыре человека из 23 обследованных.

Молекулярно-генетический анализ

Проведенный анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости к макролидам показал, что все 23 добровольца донора имеют положительный результат на оба гена (*mef* и *ermB*).

Поэтому для установления возможного возрастного периода появления данных генов, связи их наличия непосредственно с приемом АБП и путей передачи была сформирована выборка добровольцев «мать–дитя» и детей разных возрастных групп. Анализ генов резистентности *mef* и *ermB* проводили не только на образцах кала, но и дополнительно в образцах грудного молока. В табл. 3 представлены данные по наличию генов устойчивости в кале у всех добровольцев ($n = 46$) разных возрастных групп.

Согласно полученным данным при анализе образцов кала *mef*-ген устойчивости к макролидам был выявлен в 45/46 (97,8%) образцах (табл. 3 и 4). Данный ген отсутствовал только в одном исследуемом образце, кале ребенка 7 лет. Наличие *ermB*-гена устойчивости к макролидам, линкозамидам, стрептограмину было подтверждено в 43/46 (93,5%) образцах (табл. 3 и 4). Ген *ermB* не детектирован в образцах кала трех младенцев, находящихся на грудном и искусственном вскармливании.

Наличие одновременно генов устойчивости *mef* и *ermB* выявлено в 44/52 образцах (84,6%).

Статистический анализ частот обнаружения генов *mef* и *ermB* не показал значимых различий между возрастными группами ($p = 0,258$).

В группе «мать–дитя», где ребенок находится на грудном вскармливании (табл. 4), генетические детерминанты (ген *mef*) обнаружены во всех образцах грудного молока матери и кала младенцев. Наличие гена *ermB* подтверждено для трех из шести образцов грудного

молока и четырех из шести образцов кала младенцев. Стоит отметить, что из трех младенцев, получающих грудное молоко, не содержащее ген *ermB*, в образцах кала одного данный ген тем не менее выявлен. При изучении совместного распределения генов устойчивости *mef* и *ermB* в группе «кормящая мать–ребенок на грудном вскармливании» не выявлено отсутствие значимых различий между подгруппами ($p = 0,423$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Отбор доноров для проведения трансплантации фекальной микрофлоры является одним из самых сложных и важных этапов терапии, что обусловлено необходимостью исключить или свести к минимуму нежелательные последствия трансплантации для реципиента. Отдельное внимание стоит уделять резистентным бактериям, которые при трансплантации могут спровоцировать появление устойчивых клонов среди микрофлоры реципиента [21]. В то же время отрицательный результат бактериологического анализа не может гарантировать отсутствие самих генов резистентности.

Определение бактериологического состава кала позволяет выявить фекальную микрофлору, отражающую микробный состав дистальных отделов кишечника, и определить качественное и количественное содержание микрофлоры. Изменение соотношения отдельных видов микроорганизмов позволяет диагностировать дисбиотические нарушения пищеварительного тракта.

Толстая часть кишечника здорового человека представлена в основном тремя группами бактерий: 1) облигатная микрофлора (более 90%) включает в себя непатогенные виды бактерий (бифидобактерии, бактероиды, лактобактерии, кишечную палочку, энтерококки) и выполняет основные физиологические функции организма (пищеварение, всасывание); 2) факультативная микрофлора (менее 10%) включает в себя условно-патогенные микроорганизмы (клостридии, стафилококки, протеи, кампилобактерии, дрожжеподобные грибы и др.) и участвует в защитной и пищеварительной функциях; 3) транзитная (случайная) микрофлора (не более 1%), представлена синегнойной палочкой, грибами рода кандиды, патогенными энтеробактериями и др. По результатам бактериологического анализа кала в нашей выборке здоровые доноры (четыре человека из 23) характеризовались достаточным количеством бифидобактерий, лактобактерий, эшерихий и энтерококков, а также содержали в пределах нормы условно-патогенные бактерии, что соответствует нормативным документам [22]. Большая часть обследованных (17 из 23) имели дисбиотические нарушения: недостаточное количество представителей облигатной микрофлоры, либо повышенное содержание факультативной и транзитной микрофлоры, что может быть вызвано несбалансированным питанием и частыми стрессами.

Очевидно, что бактериологическое исследование кала не может дать полную картину разнообразия

микробиоты кишечника, поскольку в микробиоте могут присутствовать некультивируемые бактерии, а также бактерии в незначительном количестве, вследствие чего тоже не поддающиеся культивированию на искусственных питательных средах. На сегодняшний день для более точного изучения кишечной микробиоты применяют полногеномное секвенирование и метагеномный анализ. В то же время необходимо понимать, что в рамках медицинского обследования пациентам проводят только бактериологический анализ в сочетании с биохимическими маркерами, и на основании их результатов делают заключение о состоянии здоровья. Так называемые методы омиксного анализа не являются на сегодняшний день рутинными в практике врача-клинициста. Безусловно, для понимания точного механизма действия ТФМ и, возможно, вычленения наиболее активных компонентов необходимы мультидисциплинарные комплексные исследования. В то же время все больше лечебных учреждений внедряют в свою практику ТФМ и могут использовать для подбора доноров лишь рутинные исследования. Таким образом, важно понимание значимости анализа наличия генов резистентности в биоматериале, применяемом для ТФМ.

В данной работе сфокусировано внимание на анализе встречаемости генов *tef* и *ermB*, обуславливающих резистентность к макролидам, линкозамидам и стрептомицину В. Согласно полученным данным в образцах кала всех 23 здоровых добровольцев обнаружены оба гена резистентности, *tef* и *ermB*.

В дополнительно сформированной группе мать–дети были выявлены следующие результаты. Ген *tef* обнаружили во всех образцах грудного молока и в образцах кала следующих категорий участников, которые никогда не принимали АБП: младенцев до 1 года, находящихся на грудном вскармливании; младенцев на искусственном вскармливании; детей 1–3 лет. Данный ген был выявлен также у всех взрослых и троих детей, возрастом 3–7 лет, которые больше года не принимали АБП. Результаты нашего исследования совпадают с данными другой работы, где частота встречаемости гена *tef* в кале новорожденных составляет 100% [22].

Ген *ermB* не был детектирован в образцах кала трех младенцев. При этом двое из них находились на грудном

вскармливании и молоко матери не содержало данный ген, одного младенца вскармливали искусственно. Стоит также отметить, что у одного из младенцев, молоко матери которого не содержит ген *ermB*, данный ген присутствует в кале. У двух детей до года, находящихся на искусственном вскармливании, в кале присутствует ген *ermB*. Вопрос приобретения генетических детерминант в кале новорожденных в пренатальный период, во время родов или после не изучен окончательно. В предыдущих исследованиях было подтверждено, что гены резистентности в фекалиях новорожденных были приобретены после рождения (например, через грудное молоко и/или воздух или питьевую воду, поскольку в амниотической жидкости и меконии новорожденных гены резистентности не были обнаружены) [23–25].

ВЫВОДЫ

Анализ микробиологического состава кала 23 потенциально здоровых добровольцев показал, что только 8,7% участников исследования имеют соответствующую нормам микробиоту дистальной части кишечника и могут быть рассмотрены в качестве потенциальных доноров для ТФМ. Это может свидетельствовать о проблеме с составом микробиоты населения в целом. Дополнительно в ходе исследования проанализирована встречаемость генетических маркеров лекарственной устойчивости *tef* и *ermB* среди разных возрастных групп населения, включая младенцев. Показана высокая частота выявления гена устойчивости к макролидам (*tef*) — 97,8%, гена устойчивости к макролидам, линкозамидам, стрептограмину (*ermB*) — 93,5%. В группе «мать–дети» ген *tef* обнаружен во всех образцах кала и грудного молока. Таким образом, ввиду того, что гены *tef* и *ermB* можно обнаружить не только у взрослого населения, но и в столь раннем возрасте нами было выдвинуто предположение, что использование трансплантата (кала), содержащего данные гены, допустимо для ТФМ. Представленные данные могут помочь клиницистам, внедряющим методику ТФМ в практику, при самостоятельном поиске доноров и подготовке биоматериала.

Литература

1. Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, Rajilić-Stojanović M, Kump P, Satokari R, et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut*. 2017; 66 (4): 569–80. DOI: 10.1136/gutjnl-2016-313017.
2. Baurwall SMD, Lee MM, Eriksen MK, Mullish BH, Marchesi JR, Dahlerup JF, et al. Faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridioides difficile* infection: An updated systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*. 2020; 23: 29–30. PMID: 33437951; PMCID: PMC7788438. DOI: 10.1016/j.eclinm.2020.100642.
3. Wang Y, Zhang S, Borody T, Zhang F. Encyclopedia of fecal microbiota transplantation: a review of effectiveness in the treatment of 85 diseases. *Chinese Medical Journal*. 2022; 10.1097/CM9.0000000000002339 DOI: 10.1097/CM9.0000000000002339.
4. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am J Gastroenterol*. 2013; 108 (4): 478–98.
5. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20 (Suppl 2): 1–26.
6. Enforcement Policy Regarding Investigational New Drug Requirements for Use of Fecal Microbiota for Transplantation to Treat *Clostridium difficile* Infection Not Responsive to Standard Therapies. 2013; www.fdagov.
7. Щербачев П. Л., Белова Н. Д., Генерозов Э. В., Жгун Е. С., Иванова О. И., Ильина Е. Н. и др. Применение фекальной трансплантации в лечении заболеваний пищеварительного тракта (первый клинический опыт). *Доктор.Ру*. 2019; 3 (158): 40–46. DOI: 10.31550/1727-2378-2019-158-3-40-46.
8. Якупова А. А., Абдулхаков С. Р., Сафин А. Г., Алиева И. М., Ослопова Ю. В., Абдулхаков Р. А. Трансплантация фекальной микробиоты: критерии выбора донора, подготовки и хранения биоматериала (обзор современных рекомендаций). *Терапевтический архив*. 2021; 93 (2): 215–21. DOI: 10.26442/00403660.2021.02.200615.
9. Эйдельштейн М. В. Экстремально- и панрезистентные клоны бактериальных возбудителей в клинике. Тезисы

- докладов ежегодной Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Контроль и профилактика инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП-2015)», 25 ноября 2015, Москва Журнал МедиАль. 2015; 3 (17).
10. Туркутюков В. Б. Молекулярно-генетический мониторинг резистентности микроорганизмов к антибиотикам. Тихоокеанский медицинский журнал. 2011; 2 (44): 28–31.
 11. Zhuangab M, Achmonab Y, Cao Y, Liang X, Chen L, Wange H, et al. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution*. 2021; 285. Article 117402. DOI: [10.1016/j.envpol.2021.117402](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402).
 12. Roberts MC. Environmental macrolide–lincosamide–streptogramin and tetracycline resistant bacteria *Front. Microbiol.* 2011. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00040>.
 13. Катосова Л. К., Лазарева А. В., Хохлова Т. А., Пономаренко О. А., Алябьева Н. М. Распространение и механизмы устойчивости к макролидам *Streptococcus pyogenes*, выделенных у детей. *Антибиотики и химиотерапия*. 2016; 61 (3–4): 23–29.
 14. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Morris L, Buckridge S, Felmingham D. Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both erm(B)- and mef(A)-mediated macrolide resistance. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (2): 764–8. DOI: [10.1128/JCM.42.2.764-768.2004](https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.764-768.2004). PMID: 14766850; PMCID: PMC344484.
 15. Reinert RR, Ringelstein A, van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Schmitz FJ. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (3): 1294–300. DOI: [10.1128/JCM.43.3.1294-1300.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.3.1294-1300.2005). PMID: 15750098; PMCID: PMC1081259.
 16. Икрянникова Л. Н., Сенина М. Е., Лисицина Е. С., Огородова Л. М., Федосенко С. В., Карнаушкина М. А. и др. Видовая идентификация и анализ генетических маркеров лекарственной устойчивости стрептококков с помощью количественной мультиплексной полимеразной цепной реакции у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. *Пульмонология*. 2014; (6): 40–48. Доступно по ссылке: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2014-0-6-40-48>.
 17. Федосенко С. В., Огородова Л. М., Ильина Е. Н., Сенина М. Е., Лисицина Е. С., Карнаушкина М. А. и др. Генетические детерминанты устойчивости орофарингеальных стрептококков к антибактериальным средствам у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких и больших бронхиальной астмой. *Терапевтический архив*. 2015; 87 (8): 51–57. DOI: [10.17116/terarkh201587851-57](https://doi.org/10.17116/terarkh201587851-57).
 18. Gosalbes MJ, Vallès Y, Jiménez-Hernández N, Balle C, Riva P, Miravet-Verde S, et al. High frequencies of antibiotic resistance genes in infants' meconium and early fecal samples. *J Dev Orig Health Dis.* 2016; 7: 35–44. DOI: [10.1017/S2040174415001506](https://doi.org/10.1017/S2040174415001506).
 19. Эпштейн-Литвак Р. В., Вильшанская Ф. Л. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника. *Методические рекомендации*. М., 1977; 20 с.
 20. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника: ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ Минздрава России № 231 от 09.06.03. (Отраслевой стандарт).
 21. U.S. Food and Drug Administration. Information pertaining to additional safety protections regarding use of fecal microbiota for transplantation — screening and testing of stool donors for multi-drug resistant organisms. 2019. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/information-pertaining-additional-safety-protections-regarding-use-fecal-microbiota-transplantation>.
 22. Klassert TE, Zubiria-Barrera C, Kankel S, Stock M, Neubert R, Lorenzo-Diaz F, et al. Early Bacterial Colonization and Antibiotic Resistance Gene Acquisition in Newborns. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 332. DOI: [10.3389/fcimb.2020.00332](https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00332). PMID: 32754449; PMCID: PMC7366792.
 23. Zhang K, Jin M, Yang D, Shen Z, Liu W, Yin J, et al. Antibiotic resistance genes in gut of breast-fed neonates born by caesarean section originate from breast milk and hospital ward air. *BMC Microbiol.* 2022; 36. DOI: [10.1186/s12866-022-02447-8](https://doi.org/10.1186/s12866-022-02447-8).
 24. Huang MS, Cheng CC, Tseng SY, Lin YL, Lo HM, Chen PW. Most commensally bacterial strains in human milk of healthy mothers display multiple antibiotic resistance. *Microbiology Open.* 2019; 8 (1): e00618 doi.org/10.1002/mbo3.618.
 25. Carvalho MJ, Sands K, Thomson, Portal KE, Mathias J, Milton R, et al. Antibiotic resistance genes in the gut microbiota of mothers and linked neonates with or without sepsis from low- and middle-income countries. *Nat Microbiol.* 2022; 7: 1337–47. Available from: doi.org/10.1038/s41564-022-01184-y.

References

1. Cammarota G, Ianiro G, Tilg H, Rajilić-Stojanović M, Kump P, Satokari R, et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. *Gut.* 2017; 66 (4): 569–80. DOI: [10.1136/gutjnl-2016-313017](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-313017).
2. Baunwall SMD, Lee MM, Eriksen MK, Mullish BH, Marchesi JR, Dahlerup JF, et al. Faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridioides difficile* infection: An updated systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine.* 2020; 23: 29–30. PMID: 33437951; PMCID: PMC7788438. DOI: [10.1016/j.eclinm.2020.100642](https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100642).
3. Wang Y, Zhang S, Borody T, Zhang F. Encyclopedia of fecal microbiota transplantation: a review of effectiveness in the treatment of 85 diseases. *Chinese Medical Journal.* 2022; 10.1097/CM9.0000000000002339 DOI: [10.1097/CM9.0000000000002339](https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002339).
4. Surawicz CM, Brandt LJ, Binion DG, Ananthakrishnan AN, Curry SR, Gilligan PH, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections. *Am J Gastroenterol.* 2013; 108 (4): 478–98.
5. Debast SB, Bauer MP, Kuijper EJ, European Society of Clinical M, Infectious D: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: update of the treatment guidance document for *Clostridium difficile* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 (Suppl 2): 1–26.
6. Enforcement Policy Regarding Investigational New Drug Requirements for Use of Fecal Microbiota for Transplantation to Treat *Clostridium difficile* Infection Not Responsive to Standard Therapies. 2013; www.fdagov.
7. Shherbakov PL, Belova ND, Generozov EhV, Zhgun ES, Ivanova OI, Il'ina EN, i dr. Primenenie fekal'noj transplantacii v lechenii zabolevanij pishhevaritel'nogo trakta (pervyj klinicheskij opyt). *Doktor.Ru.* 2019; 3 (158): 40–46. DOI: [10.31550/1727-2378-2019-158-3-40-46](https://doi.org/10.31550/1727-2378-2019-158-3-40-46). Russian.
8. Yakupova AA, Abdulxakov SR, Safin AG, Alieva IM, Oslopova YuV, Abdulxakov RA. Transplantaciya fekal'noj mikrobioty: kriterii vybora donora, podgotovki i xraneniya biomateriala (obzor sovremennyx rekomendacij). *Terapevicheskij arxiv.* 2021; 93 (2): 215–21. DOI: [10.26442/00403660.2021.02.200615](https://doi.org/10.26442/00403660.2021.02.200615). Russian.
9. Ehjdshtejn MV. Ehkstremal'no- i panrezistentnye klony bakterial'nyx vzbuditelej v klinike. Tezisy dokladov ezhegodnoj Vserossijskoj nauchno-prakticheskoy konferencii s mezhdunarodnym uchastiem «Kontrol' i profilaktika infekcij, svyazannyx s okazaniem medicinskoj pomoshhi (ISMP-2015)», 25 noyabrya 2015, Moskva Zhurnal MediAl'. 2015, 3 (17). Russian.
10. Turkutyukov VB. Molekulyarno-geneticheskij monitoring rezistentnosti mikroorganizmov k antibiotikam. *Tixookeanskij medicinskij zhurnal.* 2011; 2 (44): 28–31. Russian.
11. Zhuangab M, Achmonab Y, Cao Y, Liang X, Chen L, Wange H, et al. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environmental Pollution.* 2021; 285. Article 117402. DOI: [10.1016/j.envpol.2021.117402](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402).
12. Roberts MC. Environmental macrolide–lincosamide–streptogramin and tetracycline resistant bacteria *Front. Microbiol.* 2011. Available from: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00040>.
13. Katosova LK, Lazareva AV, Xoxlova TA., Ponomarenko OA, Alyabeva NM. Rasprostranenie i mexanizmy ustojchivosti k makrolidam *Streptococcus pyogenes*, vydelennyx u detej.

- Antibiotiki i ximioterapiya. 2016; 61 (3–4): 23–29. Russian.
14. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Morris L, Buckridge S, Felmingham D. Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both erm(B)- and mef(A)-mediated macrolide resistance. *J Clin Microbiol.* 2004; 42 (2): 764–8. DOI: 10.1128/JCM.42.2.764–768.2004. PMID: 14766850; PMCID: PMC344484.
 15. Reinert RR, Ringelstein A, van der Linden M, Cil MY, Al-Lahham A, Schmitz FJ. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *J Clin Microbiol.* 2005; 43 (3): 1294–300. DOI: 10.1128/JCM.43.3.1294–1300.2005. PMID: 15750098; PMCID: PMC1081259.
 16. Ikryannikova LN, Senina ME, Lisicina ES, Ogorodova LM, Fedosenko SV, Karnaushkina MA, i dr. Vidovaya identifikaciya i analiz genicheskix markerov lekarstvennoj ustojchivosti streptokokkov s pomoshh'yu kolichestvennoj mul'tipleksnoj polimeraznoj cepnoj reakcii u pacientov s xronicheskoj obstruktivnoj bolezniyu legkix. *Pul'monologiya.* 2014; (6): 40–48. Dostupno po ssylke: <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2014-0-6-40-48>. Russian.
 17. Fedosenko SV, Ogorodova LM, Ilina EN, Senina ME, Lisicina ES, Karnaushkina MA, i dr. Genicheskije determinanty ustojchivosti orofaringeal'nyx streptokokkov k antibakterial'nym sredstvam u pacientov s xronicheskoj obstruktivnoj bolezniyu legkix i bol'nyx bronxial'noj astmoj. *Terapevticheskij arxiv.* 2015; 87 (8): 51–57. DOI: 10.17116/terarkh201587851-57. Russian.
 18. Gosalbes MJ, Vallès Y, Jiménez-Hernández N, Balle C, Riva P, Miravet-Verde S, et al. High frequencies of antibiotic resistance genes in infants' meconium and early fecal samples. *J Dev Orig Health Dis.* 2016; 7: 35–44. DOI: 10.1017/S2040174415001506.
 19. Ehpshitejn-Litvak RV, Vilshanskaya FL. Bakteriologicheskaya diagnostika disbakterioza kishhechnika. *Metodicheskie rekomendacii.* M., 1977; 20 s. Russian.
 20. Protokol vedeniya bol'nyx. Disbakterioz kishhechnika: OST 91500.11.0004-2003. Prikaz Minzdrava Rossii # 231 ot 09.06.03. (Otraslevoj standart). Russian.
 21. U.S. Food and Drug Administration. Information pertaining to additional safety protections regarding use of fecal microbiota for transplantation — screening and testing of stool donors for multi-drug resistant organisms. 2019. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/information-pertaining-additional-safety-protections-regarding-use-fecal-microbiota-transplantation>.
 22. Klassert TE, Zubiria-Barrera C, Kankel S, Stock M, Neubert R, Lorenzo-Diaz F, et al. Early Bacterial Colonization and Antibiotic Resistance Gene Acquisition in Newborns. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020; 10: 332. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00332. PMID: 32754449; PMCID: PMC7366792.
 23. Zhang K, Jin M, Yang D, Shen Z, Liu W, Yin J, et al. Antibiotic resistance genes in gut of breast-fed neonates born by caesarean section originate from breast milk and hospital ward air. *BMC Microbiol.* 2022; 36. DOI: [org/10.1186/s12866-022-02447-8](https://doi.org/10.1186/s12866-022-02447-8).
 24. Huang MS, Cheng CC, Tseng SY, Lin YL, Lo HM, Chen PW. Most commensally bacterial strains in human milk of healthy mothers display multiple antibiotic resistance. *Microbiology Open.* 2019; 8 (1): e00618 doi.org/10.1002/mbo3.618.
 25. Carvalho MJ, Sands K, Thomson, Portal KE, Mathias J, Milton R, et al. Antibiotic resistance genes in the gut microbiota of mothers and linked neonates with or without sepsis from low- and middle-income countries. *Nat Microbiol.* 2022; 7: 1337–47. Available from: doi.org/10.1038/s41564-022-01184-y.