ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2472
https://elibrary.ru/TIDAKC

Оригинальная статья
https://fptt.ru

# Антибиотикорезистентность *Enterobacteriaceae* в микробиомах цыплят-бройлеров

**А. С. Кривоногова, И. М. Донник, А. Г. Исаева*, Е. А. Логинов, М. В. Петропавловский, Е. Н. Беспамятных**

*Уральский государственный аграрный университет, Екатеринбург, Россия*

*Поступила в редакцию: 17.05.2023*
*Принята после рецензирования: 20.06.2023*
*Принята к публикации: 04.07.2023*

**А. Г. Исаева: isaeva.05@bk.ru, https://orcid.org/0000-0001-8395-1247*
*А. С. Кривоногова: https://orcid.org/0000-0003-1918-3030*
*И. М. Донник: https://orcid.org/0000-0001-8349-3004*
*Е. А. Логинов: https://orcid.org/0009-0007-0810-8365*
*М. В. Петропавловский: https://orcid.org/0000-0002-9892-6092*
*Е. Н. Беспамятных: https://orcid.org/0000-0003-4347-6554*

*© А. С. Кривоногова, И. М. Донник, А. Г. Исаева, Е. А. Логинов, М. В. Петропавловский, Е. Н. Беспамятных, 2023*

**Аннотация.**
Постоянное применение антибиотиков в нетерапевтических целях привело к тому, что представители родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* и *Proteus* являются резервуарами для генетических детерминант резистентности и способствуют распространению резистентности и контаминации сырья и продукции. Сегодня учеными ведется поиск альтернативных антибиотикам средств сохранения здоровья и поддержания высокой продуктивности птицы – про- и фитобиотиков, органических кислот и др. Целью работы являлось изучение влияния применения антибиотика и фитобиотика на энтеропатогенные бактерии в микробиомах цыплят-бройлеров.
Мы провели опыт *in vitro* с культивированием стандартного штамма *Escherichia coli* на питательных средах, содержавших антибиотики в подпороговых концентрациях в течение 37 суток. Оценили влияние низких доз антибиотиков на чувствительность изолятов. Исследовали микробиоценозы цыплят-бройлеров, получавших в качестве добавки к рациону антибиотик авиламицин А и фитобиотик на основе *Brassica juncea*, *Linum usitatissimum* и *Nigella sativa* L. Изучили видовой состав условно-патогенных *Enterobacteriaceae*, фенотипическую чувствительность к антибиотикам и генетические детерминанты резистентности. Провели анализ антимикробного потенциала фитобиотиков.
Культивирование *in vitro* стандартных штаммов *E. coli* в присутствии антибиотиков в дозах ниже минимальных показало, что на протяжении 37 суток резистентность к антибиотикам не развивалась. В смывах и образцах подстилки всех групп цыплят-бройлеров преобладали условно-патогенные грамотрицательные бактерии порядка *Enterobacterales*. На долю *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus mirabilis* приходилось более 30 % от всех выделенных штаммов. Введение в рацион бройлеров авиламицина А и фитобиотика повлияло на кокковую микрофлору и не сказалось на динамике родовидового состава *Enterobacteriaceae*. Изоляты *K. pneumoniae* имели высокий уровень фенотипической устойчивости к ципрофлоксацину и содержали гены blaDHA. Микробиота подстилки имеет значение в сохранении и циркуляции агентов резистентности при содержании бройлеров. Наименьший уровень устойчивости к ципрофлоксацину мы выявили в группе цыплят, которые получали только фитобиотик, наибольший – в группе с авиламицином А.
На коротких временных отрезках, сопоставимых со сроком выращивания бройлеров до убоя, изолированные *in vitro* бактерии, которые не имеют в геноме активных детерминант резистентности, сохраняют чувствительность к антибиотикам даже при постоянном контакте с ними. Применение фитобиотиков перспективно в технологии выращивания бройлеров в качестве дополнения к существующим рационам для снижения (отказа) количества применяемых кормовых антибиотиков.

**Ключевые слова.** Антибиотикорезистентность, энтеробактерии, антибиотик, фитобиотик, микробиом, бройлеры

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (РНФ), грант № 18-16-00040.

**Для цитирования:** Антибиотикорезистентность *Enterobacteriaceae* в микробиомах цыплят-бройлеров / А. С. Кривоногова [и др.] // Техника и технология пищевых производств. 2023. Т. 53. № 4. С. 710–717. https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2472

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2472
https://elibrary.ru/TIDAKC

Original article
Available online at https://fptt.ru/en

# Antibiotic Resistance of *Enterobacteriaceae* in Microbiomes Associated with Poultry Farming

**Anna S. Krivonogova, Irina M. Donnik, Albina G. Isaeva*, Egor A. Loginov, Maxim V. Petropavlovskiy, Elisey N. Bespamyatnykh**

*Ural State Agrarian University, Yekaterinburg, Russia*

*Received: 17.05.2023*
*Revised: 20.06.2023*
*Accepted: 04.07.2023*

**Albina G. Isaeva: isaeva.05@bk.ru, https://orcid.org/0000-0001-8395-1247*
*Anna S. Krivonogova: https://orcid.org/0000-0003-1918-3030*
*Irina M. Donnik: https://orcid.org/0000-0001-8349-3004*
*Egor A. Loginov: https://orcid.org/0009-0007-0810-8365*
*Maxim V. Petropavlovskiy: https://orcid.org/0000-0002-9892-6092*
*Elisey N. Bespamyatnykh: https://orcid.org/0000-0003-4347-6554*

*© A.S. Krivonogova, I.M. Donnik, A.G. Isaeva, E.A. Loginov, M.V. Petropavlovskiy, E.N. Bespamyatnykh, 2023*

**Abstract.**
Antibiotics have long been overused for non-therapeutic purposes. As a result, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, and *Proteus* in avian microbiomes have become reservoirs for genetic determinants of resistance, thus spreading resistance to antibiotics and contaminating raw materials and finished products. The food industry is looking for alternative means to preserve health and maintain high productivity of commercial poultry, e.g., probiotics, phytobiotics, organic acids, etc. The research featured the effect of antibiotics and phytobiotics on enteropathogenic bacteria in the microbiomes of broiler chicken.
*Escherichia coli* bacteria were cultivated *in vitro* in subthreshold concentrations on nutrient media with antibiotics for 37 days to study the effect of low doses of antibiotics on the sensitivity of isolates. The study involved microbiocenoses of broiler chicken that received avilamycin A and a phytobiotic based on *Brassica juncea*, *Linum usitatissimum*, and *Nigella sativa* L. A set of experiments covered the species composition of opportunistic Enterobacteriaceae, the phenotypic sensitivity to antibiotics, and the genetic determinants of resistance, as well as the antimicrobial potential of phytobiotics.
*E. coli* developed no resistance for 37 days when the antibiotic dose remained below minimal inhibitory. Opportunistic gram-negative *Enterobacterales* predominated in all litter samples. *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* accounted for more than 30% of all isolated strains. Avilamycin A and the phytobiotic affected the coccal microflora but had no effect on the genus-species composition of *Enterobacteriaceae*. Litter samples from both experimental and control groups demonstrated *K. pneumoniae* with severe phenotypic resistance to ciprofloxacin, as well as blaDHA genes. In broiler farming, maintenance and circulation of resistance agents depends on litter microbiota. In this research, the chicken that received the phytobiotic showed the lowest level of resistance to ciprofloxacin while the groups that received avilamycin A had the highest resistance results.
During a broiler's life span, bacteria with no active resistance determinants in their genome remained sensitive to antibiotics, even though the contact with the latter was constant. Phytobiotics showed good prospects for broiler farming as food additive that could reduce and eventually eliminate the intake of antibiotics.

**Keywords**. Antibiotic resistance, enterobacteria, antibiotic, phytobiotic, microbiome, broilers

**Funding.** The research was supported by the Russian Science Foundation (RSF), Project No. 18-16-00040.

**For citation:** Krivonogova AS, Donnik IM, Isaeva AG, Loginov EA, Petropavlovskiy MV, Bespamyatnykh EN. Antibiotic Resistance of *Enterobacteriaceae* in Microbiomes Associated with Poultry Farming. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(4):710–717. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-4-2472

## Введение

Использование антибиотиков в животноводстве и птицеводстве в качестве профилактических или стимулирующих продуктивность добавок и недостаточное внимание к циркулирующей на предприятиях условно-патогенной микрофлоре привели к контаминации животноводческих микробиомов агентами антимикробной резистентности [1]. Распространение устойчивости ассоциировано с механизмами горизонтального переноса генов и реализуется с

помощью контактов между микробиоценозами в смежных экологических нишах [2, 3]. Микробиомы продуктивных животных и птицы являются благоприятными для формирования и распространения антимикробной резистентности биотопами. Циркулирующие на животноводческих объектах резистентные штаммы условно-патогенных бактерий представляют эпидемиологическую угрозу. Это связано с возможной контаминацией микробиома человека через контакты с животными, особенно для персонала предприятий, или за счет миграции агентов резистентности по пищевой цепи через животное сырье: яйцо, мясо, молоко и др. [4–8].

Среди условно-патогенных бактерий, населяющих желудочно-кишечный тракт теплокровных, значение имеют представители порядка *Enterobacterales*: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* и *Proteus*. Распространение генетических детерминант резистентности в популяциях *Escherichia coli* может приводить к передаче антимикробной резистентности по технологическим цепям на животноводческих и птицеводческих предприятиях [5, 9]. Устойчивость *E. coli* к антибактериальным препаратам обусловлена как природной резистентностью микроорганизма к основным клинически значимым антибиотикам, так и реализацией генетически детерминированных молекулярных механизмов, приобретенных за счет горизонтального переноса кодирующих их носителей генетической информации [10–12]. По скорости формирования приобретенной резистентности плазмидный или транспозонный тип (быстрый) превосходит хромосомный. Хромосомный тип включает мутации, которые появляются с обычной частотой (около 10 %) и могут занять примерно 5–10 лет при постоянном использовании одного и того же антибиотика [3]. Быстрый механизм распространения антимикробной резистентности является основным в птицеводческих и животноводческих микробиомах.

Продуктивные животные и птица являются источником штаммов энтеробактерий *E. coli*, *Klebsiella* и *Salmonella*, которые продуцируют $\beta$-лактамазы расширенного спектра, обусловленные наличием мобильных генов AmpC [13, 14]. Наиболее распространенные группы $\beta$-лактамазы расширенного спектра, выявленные у энтеропатогенных бактерий, ассоциированы с наличием генов CTX-M, CMY, TEM и SHV [9, 15, 16]. Устойчивость *Enterobacteriaceae* к карбапенемам ассоциируют с наличием у бактерий детерминант OXA, VIM, KPC, NDM и IMP, кодирующих синтез карбапенемаз [17]. Наличие $\beta$-лактамаз у энтеробактерий также является фактором устойчивости к цефалоспоринам III и IV поколения. Гены, кодирующие эти ферменты, локализуются на плазмидах, поэтому легко распространяются в популяциях бактерий. Также эти гены способны к межвидовой передаче. Возможна передача ассоциаций генов, обуславливающая сочетание резистентности к бета-лактамам и другим антибиотикам. Например, фторхинолонам и аминогликозидам [18].

В качестве альтернативы профилактическим и стимулирующим антимикробным добавкам используют фитобиотики. Действующие вещества фитобиотиков – вторичные растительные метаболиты – имеют широкий спектр физиологических эффектов и не вызывают развития резистентности у бактерий. Фитобиотики можно использовать против бактерий, которые имеют устойчивость к антибиотикам, и в профилактических целях [19, 20].

Актуальными являются исследование энтеропатогенных бактерий, ассоциированных с птицеводческими микробиомами, и изучение влияния фитобиотиков на характеристики бактерий.

**Объекты и методы исследования**

Мы провели анализ характеристики антибиотикочувствительности энтеропатогенных бактерий в микробиомах, ассоциированных с цыплятами бройлерами. Оценили темпы развития резистентности представителей *Enterobacteriaceae* в условиях опыта и *in vitro*. Проанализировали влияние добавок фитобиотиков и антибиотиков в рацион бройлеров на видовой состав и фенотипическую антибиотикочувствительность *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* в биоматериале от цыплят. Изучили генетические детерминанты резистентности в микробиомах.

120 цыплят-бройлеров возрастом 1 сутки разделили на 4 группы и выращивали до возраста убоя. Большинство промышленных технологий содержания бройлеров подразумевает убой на 37 сутки, реже – на 56 сутки. В экспериментальных целях цыплят содержали на протяжении 56 суток для более детального наблюдения за динамикой микробиома.

Все группы были сформировали из клинически здоровых цыплят одного кросса (Росс 308) и вывода, распределенных рандомным образом. Цыплята находились в одинаковых технологических условиях, получали стандартный рацион, соответствующий возрасту и этапу выращивания, имели свободный доступ к воде.

Группы содержались в отдельных лабораторно-производственных помещениях для исключения обмена микрофлорой между группами; тип содержания напольный. В каждом помещении находились подстилки, которые состояли из опила (доля хвойных пород 70 %, лиственных 30 %, ГОСТ 18320-78). Смену подстилки на протяжении опыта проводили 1 раз в 10 дней. Полную дезинфекцию помещений провели перед посадкой цыплят, дезинфекцию опила и промежуточную дезинфекцию помещений не проводили.

Группы № 1 и 2 получали антимикробную добавку к рациону, содержащую антибиотик авиламицин А, который относится к ортозомицинам (Максус G-100, Eli Lilly and Company, USA). Доля антибиотика была

стандартной; она рекомендована производителем для профилактики и стимуляции продуктивности в птицеводстве (300 г на тонну корма). Группы № 2 и 3 получали фитобиотик на основе масляных эмульсий *Brassica juncea*, *Linum usitatissimum* и *Nigella sativa* L. (производства НИИСХ, Крым) в течение 21 дня 1 раз в сутки в количестве 50 мл на 1 кг корма.

Мы провели исследование микрофлоры подстилки и смывы с клоаки цыплят, определили родовидовой состав условно-патогенных микроорганизмов и проанализировали фенотипическую антибиотикочувствительность обнаруженных изолятов *Enterobacteriaceae*.

Бактерии культивировали стандартными микробиологическими методами на питательных средах, выделяли чистые линии и идентифицировали методом MALDI-TOF (Vitek MS, BioMerieux, France). Бактериальную массу наносили на спот слайда, покрывали 1 мкл матрицы (*α*-циано-3-гидроксикоричная кислота) и высушивали при комнатной температуре. Затем считывали масс-спектры рибосомальных белков и сравнивали с базой данных с использованием программного обеспечения Myla.

Фенотипическую антибиотикочувствительность определяли диско-диффузионным методом и методом минимальной подавляющей концентрации по стандартной методике (EUCAST), а также с использованием инструкций к тест-системам.

Исследование темпов развития антибиотикорезистентности *in vitro* проводили на модельных культурах *E. coli* стандартных штаммов ATCC 25922 (лиофилизированная культура микроорганизма KWIK-STIK, Microbiologics, США). Определили минимальную ингибирующую концентрацию ципрофлокцина, меропенема, цефепима и ампициллина. На протяжении 37 суток культивировали *E. coli* на питательных средах с добавлением указанных антибиотиков в меньшей концентрации, чем минимальная подавляющая. Затем повторно оценили чувствительность изолятов к антибиотикам методом последовательных разведений (с определением минимальной подавляющей концентрации).

Для оценки контаминации микробиоценозов генетическими детерминантами резистентности проводили анализ культур методом Real-time PCR (анализатор QuantStudio 5, США). Для выявления ДНК *E. coli*, blaCTX-M и blaOXA10 генов резистентности грамотрицательных бактерий к цефалоспоринам использовали наборы реагентов «РЕЗИСТОМ.ESBL-*E.coli*»; для выявления ДНК *K. pneumoniae*, blaKPS и blaOXA48-like генов резистентности грамотрицательных бактерий к карбапенемам – «РЕЗИСТОМ. CRE- Klebsiella»; для выявления blaDHA гена резистентности к защищенным пенициллинам и цефалоспоринам – «РЕЗИСТОМ.DHA» («Изоген» и «Литех», РФ).

Статистическую обработку данных проводили с использованием Statistica 10.

**Результаты и их обсуждение**

Результаты исследований смывов с клоаки и образцов подстилки показали, что условно-патогенное ядро микробиоценоза представлено грамотрицательными бактериями (59,18 %). Грамположительные бактерии составили 22,45 %, грибы – 18,37 %. Преобладали грамотрицательные бактерии порядка *Enterobacterales*: на долю *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus mirabilis* приходилось около 41 % от всех выделенных штаммов. Отметили изменения видового состава, но тенденция к преобладанию грамотрицательных бактерий и превалированию среди них *Klebsiella* и *Escherichia* сохранилась (рис. 1 и 2). Разницы между группами в динамике грамотрицательной флоры не выявили. При микробиологическом исследовании биоматериала смывов и подстилки ни в одной из групп не были обнаружены патогенные бактерии рода *Salmonella*.

В рамках исследования на модельных культурах определили минимальную подавляющую концентрацию ципрофлоксацина, меропенема, цефепима и ампициллина для стандартного штамма *E. coli* (ATCC 25922). Эти изоляты культивировали на протяжении 37 суток на средах, содержащих указанные антибиотики в концентрациях меньше, чем минимальная ингибирующая. Это соответствует типовому сроку содержания бройлеров в промышленных условиях от момента вывода до убоя. Установили, что штаммы *E. coli* ATCC 25922 (дикий тип, каталаза – положительный, оксидаза – отрицательный, подвижность – положительный, бета-лактамаза – отрицательный, индол – положительный) были чувствительны к ципрофлоксацину в минимальной подавляющей концентрации 0,06–0,12 мг/л, к меропенему – 0,12 мг/л, к цефепиму – 0,5 мг/л, к ампициллину – 2–4 мг/л на протяжении всего исследования (рис 3).

При данных условиях резистентность к использованным антибиотикам не развивалась. Это связанно с тем, что использованные стандартные штаммы не имели в геноме активных детерминант резистентности, а из-за отсутствия контактов с другими микроорганизмами горизонтальный перенос генов не происходил. В естественных микробиомах постоянно происходит обмен мобильными элементами резистома за счет горизонтального переноса генов. Это способствует быстрому формированию резистентности у микроорганизмов.

Анализ антибиотикочувствительности *E. coli*, выделенных из смывов с клоаки цыплят и образцов подстилки во всех группах на разных этапах выращивания, показал, что все изоляты были чувствительны к ампициллину и ципрофлоксацину – минимальная подавляющая концентрация 2,0–4,0 и 0,06–0,12 мг/л соответственно. В тестах с меропенемом около 74 % изолятов были чувствительны к минимальной подавляющей концентрации 0,06 мг/л. 100 % изолятов чувствительны к минимальной подавляющей

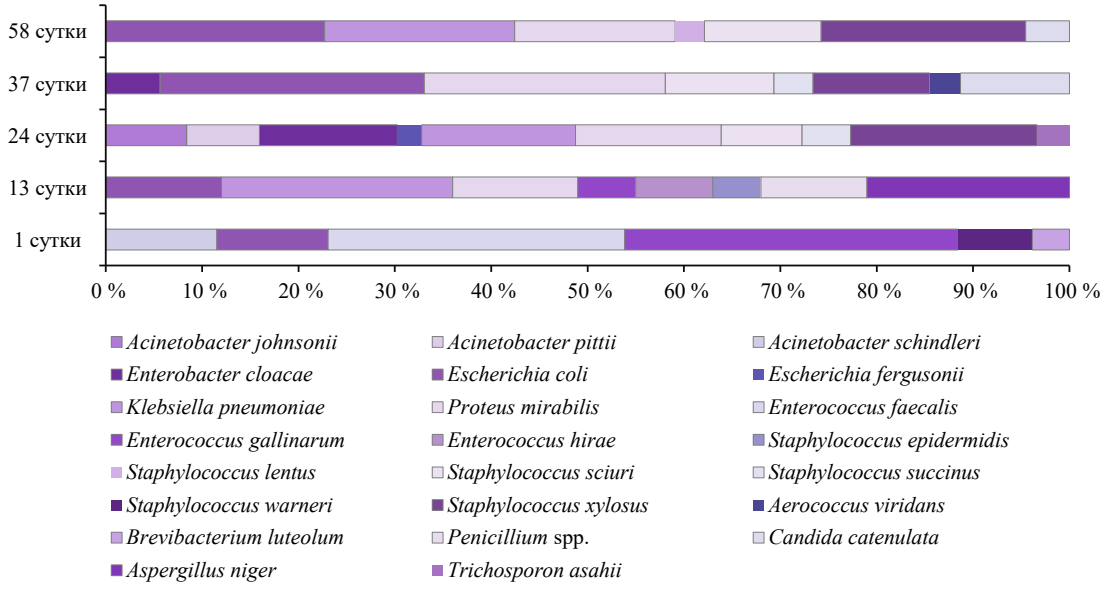


Рисунок 1. Изменения микробного пейзажа в смывах с клоаки цыплят в группах № 1–4

Figure 1. Microflora in chicken cloaca swabs, groups No. 1–4

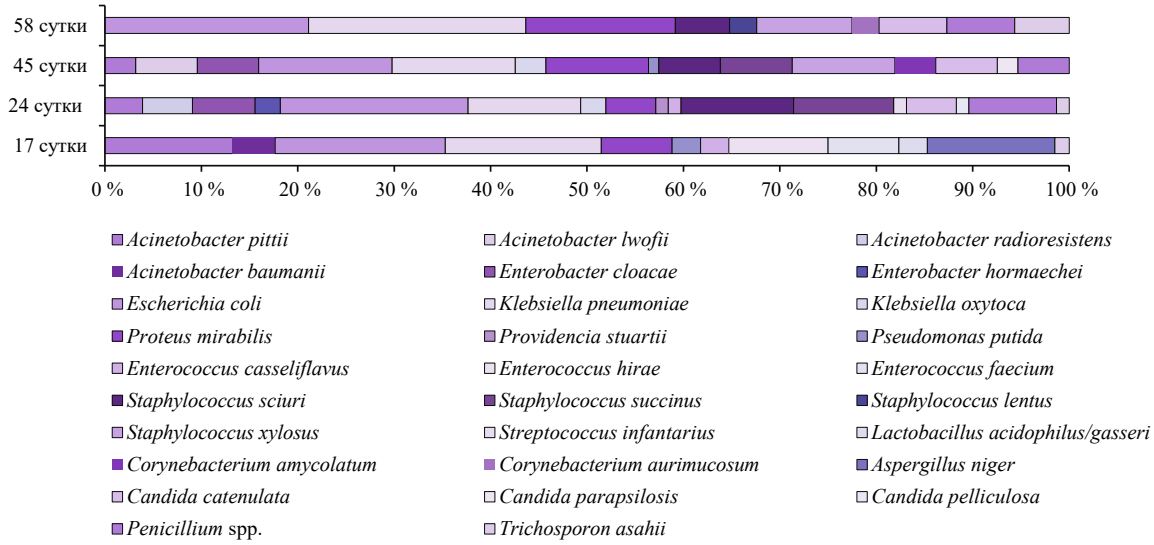


Рисунок 2. Изменения микробного пейзажа в образцах подстилки цыплят в группах № 1–4

Figure 2. Microflora in chicken litter samples, groups 1–4

концентрации 0,12 мг/л. К цефепиму с минимальной подавляющей концентрацией 0,125 мг/л была чувствительна половина изолятов *E. coli*. 100 % были восприимчивы к минимальной подавляющей концентрации 0,5 мг/л. Все указанные значения минимальной подавляющей концентрации относятся к значению «чувствительные» (S) в соответствии с экспертными правилами EUCAST на текущий год (рис. 4).

Из всех протестированных штаммов *K. pneumoniae* из разных групп 84 % были резистентны к ципрофлоксацину (с минимальной подавляющей концентрацией от 1,0 до 2,0 мг/л), 16 % были чувствительны к антибиотику (с минимальной подавляющей концентрацией 0,25 мг/л). Наибольшее количество чувствительных изолятов выявили в группе № 3, наибольшее количество резистентных при максимальной исследованной минимальной подавляющей концентрации – в группе № 2. Все выделенные штаммы *K. pneumoniae* были устойчивы к ампициллину (с минимальной подавляющей концентрацией от 16,0 до 64,0 мг/л). Это согласуется с имеющимися в литературе данными о природной устойчивости

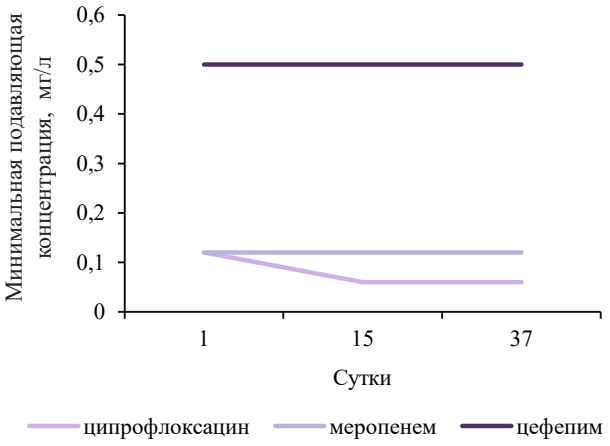


Рисунок 3. Антибиотикочувствительность *Escherichia coli* (ATCC 25922) при культивировании на средах с добавлением антибиотиков в концентрациях ниже минимальной подавляющей

Figure 3. Antibiotic sensitivity of *Escherichia coli* (ATCC 25922) cultured on media with antibiotics at concentrations below minimal inhibitory

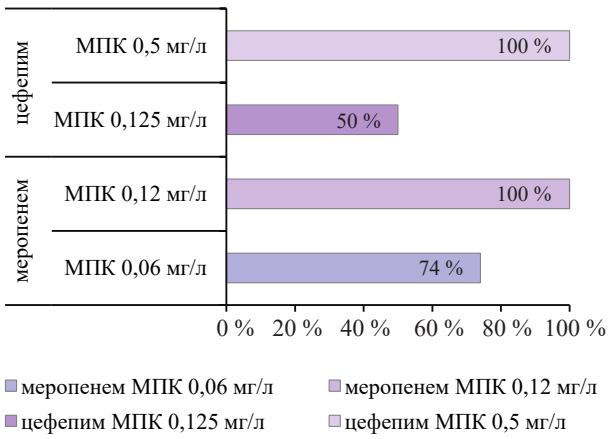


Рисунок 4. Распределение чувствительности изолятов *Escherichia coli* к меропенему и цефепиму в зависимости от минимальной подавляющей концентрации (МПК)

Figure 4. Susceptibility of *Escherichia coli* isolates to meropenem and cefepime, depending on the minimal inhibitory concentration (МПК)

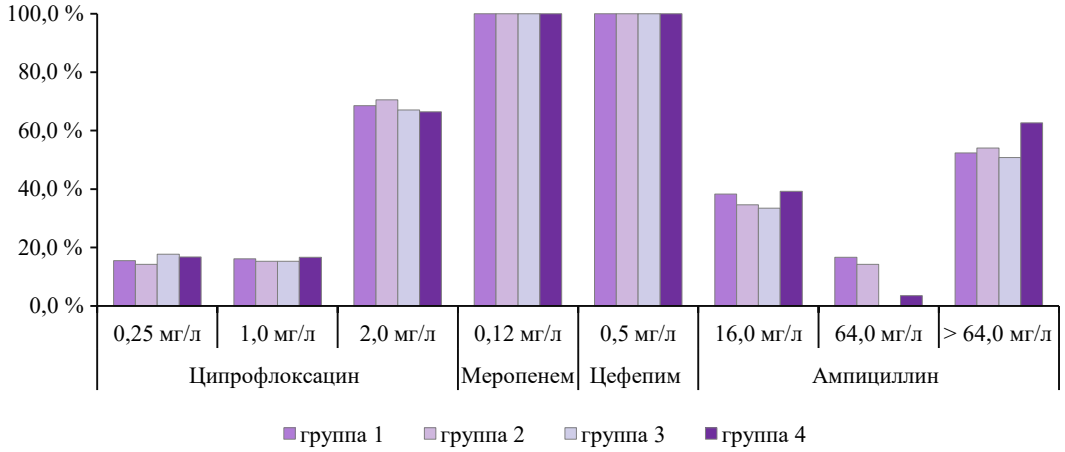


Рисунок 5. Распределение чувствительности изолятов *Klebsiella pneumoniae* к меропенему, цефепиму, ампициллину и ципрофлоксацину в зависимости от минимальной подавляющей концентрации

Figure 5. Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* isolates to meropenem, cefepime, ampicillin, and ciprofloxacin, depending on the minimal inhibitory concentration

клебсиелл к полусинтетическим пенициллинам и подтверждается данными EUCAST о природной устойчивости этих бактерий к данному антибиотику (рис. 5). В группе № 3 были выявлены изоляты, чувствительные к минимальной подавляющей концентрации 16 мг/л (33,5 %) и более 64 мг/л (50,8 %), для которых рабочая минимальная подавляющая концентрация найдена не была. В группах № 1, 2 и 4 обнаружили изоляты, чувствительные к минимальной подавляющей концентрации ампициллина в 64 мг/л – 16,7, 14,3 и 3,5 % соответственно. Доля клебсиелл, для которых минимальная подавляющая концентрация не была найдена (более 64 мг/л), составляла в группе № 1 – 52,4 %, в группе № 2 – 54,1 %, в контрольной группе № 4 – 62,7 %.

К меропенему и цефепиму все выделенные изоляты были чувствительны с минимальной подавляющей концентрацией 0,12 и 0,5 мг/л соответственно. Резистентные к ампициллину и ципрофлоксацину изоляты обнаружили во всех опытных и контрольной группах с одинаковой частотой. Полученные результаты могут свидетельствовать о контаминации исследуемых микробиоценозов агентами резистентности к антибиотикам класса фторхинолонов.

Провели анализ изолятов энтеропатогенных бактерий, выделенных из образцов подстилки всех 4 групп на наличие генетических детерминант резистентности. Анализировали изоляты *K. pneumoniae* и *E. coli* методом real-time PCR. В пробах из группы № 2, в которых цыплята в качестве компонента рациона получали антибиотик авиламицин А и фитобиотик на основе масел *Brassica juncea*, *Linum usitatissimum* и *Nigella sativa* L., обнаружили наибольшее количество изолятов, которые имели гены резистентности. В этой группе были выделены изоляты *E. coli*, имевшие ген blaDHA, ассоциированный с бета-лактамазами расширенного спектра, а также *K. pneumoniae*, имевшие гены blaKPS и blaOXA48-like, кодирующие резистентность к защищенным пенициллинам, цефалоспоринам I, III и IV поколения и карбапенемам. В группе № 1 выявили изоляты *K. pneumoniae* с blaDHA-геном резистентности. В изолятах *K. pneumoniae* из подстилки групп № 3 и 4 гены резистентности не обнаружили.

**Выводы**

Проведенные исследования микробиома цыплят-бройлеров показали, что преобладающими условно-патогенными микроорганизмами были грамотрицательные бактерии порядка *Enterobacterales*. На долю *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus* приходилось более трети от всех выделенных штаммов.

При исследовании фенотипической чувствительности выделенных культур *E. coli* не обнаружили резистентности к клинически значимым антибиотикам класса $\beta$-лактамов: меропенему (представителю группы карбапенемов) и цефепиму (представителю группы цефалоспоринов IV поколения). Таким образом, приобретения в ходе эксперимента генов, кодирующих карбапенемазы и ESBL, не было (либо эти гены молчащие и не были проявлены фенотипически). Все штаммы *K. pneumoniae* показали резистентность к ампициллину, что подтверждается данными EUCAST по природной устойчивости к этому антибиотику, связанной с присутствием в хромосомах *K. pneumoniae* пенициллиназы SHV-1.

У изолятов *K. pneumoniae*, обнаруженных во всех опытных и контрольной группах, был выявлен высокий уровень устойчивости к ципрофлоксацину (фторхинолоны), резистентность к которому определяет резистентность ко всему классу хинолонов из-за наличия перекрестной устойчивости. У грамотрицательных палочек резистентность к фторхинолонам носит плазмидно-опосредованный характер и связана с приобретением мобильных генов qnrA и qnrB, которые были впервые описаны у *K. pneumoniae*. При анализе генотипа изолятов *K. pneumoniae* были обнаружены гены blaDHA, кодирующие бета-лактамазы расширенного спектра. Данные факты свидетельствуют о наличии в микробиоме высокого потенциала резистентности к бета-лактамам АМП. Отсутствие в смывах с клоаки цыплят резистентных к фторхинолонам клебсиелл и их наличие в подстилке опытных и контрольной групп указывают на значимость микробиоты подстилки в сохранении и циркуляции агентов резистентности при содержании цыплят-бройлеров.

Использование добавок антибиотика и фитобиотика в рационе цыплят не оказало существенного влияния на динамику родовидового состава *Enterobacteriaceae* в отличие от грамположительных кокков. Были выявлены различия между группами в количестве резистентных и чувствительных изолятов *K. pneumoniae*. В группе № 3, где цыплята получали только фитобиотическую добавку, был установлен наиболее высокий уровень чувствительности изолятов *K. pneumoniae* к ципрофлоксацину. Наименьшее количество чувствительных изолятов выявили в группе № 2, получавшей антибиотик авиламицин А. При анализе генетических детерминант устойчивости наибольшее их количество обнаружили в группе № 2 – изоляты *E. coli*, несущие ген blaDHA, и изоляты *K. pneumoniae*, имевшие гены blaKPS и blaOXA48-like. В изолятах *K. pneumoniae* из подстилки групп № 3 и 4 гены резистентности обнаружены не были.

Исследование *in vitro* возможности формирования резистентности у стандартных штаммов *E. coli* при поступлении подпороговых количеств антибиотиков на протяжении срока, соответствующего технологическому периоду выращивания бройлеров (37 суток), показало, что при данных условиях резистентность к использованным антибиотикам не развивалась. На таких коротких временных отрезках ключевое значение для распространения антимикробной резистентности имеют контакты между микроорганизмами, необходимые для передачи мобильных агентов резистентности. При отсутствии доступа к резистому бактерии, не имеющие в геноме активных детерминант резистентности, сохраняют чувствительность к антибиотикам даже при постоянном контакте с ними.

**Критерии авторства**

Авторы в равной степени участвовали в написании рукописи и несут ответственность за плагиат.

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Contribution**

The authors were equally involved in writing the manuscript and are responsible of plagiarism

**Conflict of interest**

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

**References/Список литературы**

1. Chaplygina OS, Prosekov AYu, Vesnina AD. Determining the residual amount of amphenicol antibiotics in milk and dairy products. Food Processing: Techniques and Technology. 2022;52(1):79–88. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2022-1-79-88

2. Li X, Aly SS, Su Z, Pereira RV, Williams DR, Rossitto P, et *al.* Phenotypic antimicrobial resistance profiles of *E. coli* and *Enterococcus* from dairy cattle in different management units on a central California dairy. Clinical Microbiology. 2018;7. https://doi.org/10.4172/2327-5073.1000311

3. Spera AM, Esposito S, Pagliano P. Emerging antibiotic resistance: Carbapenemase-producing enterobacteria. Bad new bugs, still no new drugs. Infezioni in Medicina. 2019;27(4):357–364.

4. Gregova G, Kmet V. Antibiotic resistance and virulence of *Escherichia coli* strains isolated from animal rendering plant. Scientific Repots. 2020;10. https://doi.org/10.1038/s41598-020-72851-5

5. Lalak A, Wasyl D, Zając M, Skarżyńska M, Hoszowski A, Samcik I, *et al.* Mechanisms of cephalosporin resistance in indicator *Escherichia coli* isolated from food animals. Veterinary Microbiology. 2016;194:69–73. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.01.023

6. Ranjbar R, Moradi H, Harzandi N, Kheiri R, Khamesipour F. Integron-associated antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources in two provinces of Iran. Modern Technologies in Medicine. 2019;11(4):64–72. https://doi.org/10.17691/stm2019.11.4.07

7. Buberg ML, Mo SS, Sekse C, Sunde M, Wasteson Y, Witsø IL. Population structure and uropathogenic potential of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* from retail chicken meat. BMC Microbiology. 2021;21. https://doi.org/10.1186/s12866-021-02160-y

8. Chaplygina OS, Kozlova OV, Zharko MYu, Petrov AN. Assessing the biological safety of dairy products with residual antibiotics. Food Processing: Techniques and Technology. 2023;53(1):192–201. (In Russ.). https://doi.org/10.21603/2074-9414-2023-1-2427

9. Bezborodova NA, Sokolova OV, Shkuratova IA, Ryaposova MV, Lysova YaYu, Isakova MN, *et al.* Sensitivity and resistance of the microbiota of reproductive organs and mammary gland of cows to anti-microbial agents in cases of inflammation. International Journal of Biology and Biomedical Engineering. 2020;14:49–54. https://doi.org/10.46300/91011.2020.14.8

10. Reshadi P, Heydari F, Ghanbarpour R, Bagheri M, Jajarmi M, Amiri M, *et al.* Molecular characterization and antimicrobial resistance of potentially human-pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from riding horses. BMC Veterinary Research. 2021;17. https://doi.org/10.1186/s12917-021-02832-x

11. Poirel L, Madec J-Y, Lupo A, Schink A-K, Kieffer N, Nordmann P, *et al.* Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. Microbiology Spectrum. 2018;6(4). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017

12. Al'-Hammash NM, Ignatenko AV. Analysis of antibiotics resistance of *E. coli* microorganisms. Proceedings of BSTU. № 4. Chemistry, Organic Substances Technology and Biotechnology. 2012;151(4):173–175. (In Russ.). [Аль-Хаммаш Н. М., Игнатенко А. В. Анализ антибиотикорезистентности микроорганизмов *E. coli* // Труды БГТУ. № 4. Химия, технология органических веществ и биотехнология. 2012. Т. 151. № 4. С. 173–175.]. https://www.elibrary.ru/SNMKSX

13. Velasova M, Smith RP, Lemma F, Horton RA, Duggett NA, Evans J, *et al.* Detection of extended-spectrum β-lactam, AmpC and carbapenem resistance in Enterobacteriaceae in beef cattle in Great Britain in 2015. Journal of Applied and Microbiology. 2019;126(4):1081–1095. https://doi.org/10.1111/jam.14211

14. Paitan Y. Current trends in antimicrobial resistance of *Escherichia coli*. In: Frankel G, Ron EZ, editors. Escherichia coli, a versatile pathogen. Cham: Springer; 2018. pp. 181–211. https://doi.org/10.1007/82_2018_110

15. Kaushik P, Anjay, Kumari S, Dayal S, Kumar S. Antimicrobial resistance and molecular characterisation of *E. coli* from poultry in Eastern India. Veterinaria Italiana. 2018;54(3):197–204.

16. Madec J-Y, Haenni M, Nordmann P, Poirel L. Extended-spectrum β-lactamase/AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals: A threat for humans? Clinical Microbiology and Infection. 2017;23(11):826–833. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.01.013

17. Köck R, Daniels-Haardt I, Becker K, Mellmann A, Friedrich AW, Mevius D, *et al.* Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in wildlife, food-producing, and companion animals: A systematic review. Clinical Microbiology and Infection. 2018;24(12):1241–1250. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.004

18. Rozwandowicz M, Brouwer MSM, Fischer J, Wagenaar JA, Gonzalez-Zorn B, Guerra B, *et al.* Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2018;73(5):1121–1137. https://doi.org/10.1093/jac/dkx488

19. Özbudak S. Phytobiotics and their roles in broiler nutrition. Journal of Poultry Research. 2019;16(1):23–29. https://doi.org/10.34233/jpr.465575

20. Sethiya NK. Review on natural growth promoters available for improving gut health of poultry: An alternative to antibiotic growth promoters. Asian Journal of Poultry Science. 2016;10(1):1–29. https://doi.org/10.3923/ajpsaj.2016.1.29