

УДК 579.842.11:[579.253.2+575.174.015.3]:57.086.13

Ю.В. Войда

ЗБЕРЕЖЕНІСТЬ СПЕКТРІВ АНТИБІОТИКОЧУТЛИВОСТІ КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ *ESCHERICHIA COLI* ПІСЛЯ ДОВГОСТРОКОВОГО ЗБЕРІГАННЯ

Харківська медична академія післядипломної освіти

Резюме. Встановлено розбіжності в антибіотико-чутливості штамів *Escherichia coli*, які виділено з різних біотопів. Показано, що зберігання при $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ протягом семи років (термін спостереження) не впливає на спектр антибіотикорезистентності бактерій. При зберіганні під шаром вазелінового масла при температурі $6\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$

методом періодичних пересівів частина штамів втрачала резистентність до β -лактамних антибіотиків, що пов'язується з втратою плазмід.

Ключові слова: *Escherichia coli*, біотоп, антибіотико-чутливість, плазмід, кріоконсервування.

Вступ. Генетична пластичність збудників інфекційних хвороб, досить висока здатність до трансформації плазмід призводить до формування штамів із новими біологічними властивостями, у першу чергу, – це їх стійкість до дії протимікробних препаратів. Антибіотикорезистентність бактерій кодується, в основному, позахромосомними факторами спадковості (Р-плазмідами) і частково – хромосомними генами.

Для вирішення проблем антибіотикорезистентності, вивчення механізмів патогенезу інфекційних захворювань та генетичних досліджень, зокрема при розробці біотехнологій з метою відбору нових штамів-продуцентів, створюють колекції плазмідних штамів бактерій. Умовою існування таких колекцій є збереження генетичного матеріалу в стані максимально близькому до початкового.

Кріоконсервування є найперспективнішим методом довгострокового зберігання мікроорганізмів [3-5, 7]. На даний час існують нечисельні публікації щодо його впливу на життєздатність плазмідних штамів бактерій та збереженість плазмід у клітинах протягом тривалого часу [8, 10].

Мета дослідження. Порівняльне вивчення спектрів антибіотико-чутливості клінічних ізолятів *Escherichia coli*, виділених із різних біотопів, після довгострокового зберігання шляхом кріоконсервування та пересівів у напіврідкому м'ясоптонному агарі.

Матеріал і методи. Для дослідження відібрано 120 штамів *E. coli*, виділених з патологічного матеріалу: 38 вилучено із сечовивідних шляхів; 44 – із статевих шляхів; по два – із дихальних шляхів і ділянок шкіри та м'яких тканин; 34 – із кишечника осіб із дисбактеріозом. Як контроль використано 25 штамів *E. coli*, виділених із кишечника здорових осіб.

Збереженість плазмід визначали двома методами – за фенотиповими маркерами бактерій на селективних середовищах і за збереженням структури та кількості плазмід, встановлених за допомогою електрофорезу.

Чутливість бактерій *E. coli* до антибактеріальних препаратів визначали диско-дифузійним методом Кеурбу-Вауег з використанням стандартних комерційних дисків (НИЦФ, Росія та ТОВ

«Аспект», Україна) на середовищі Мюллер-Хінтона (HiMedia, Індія). Продукцію β -лактамаз розширеного спектра дії (БЛРС) досліджували методом «подвійних дисків». Результати роботи інтерпретували відповідно до Наказу МОЗ України [1].

Плазмідний спектр клінічних ізолятів *E. coli* вивчали за допомогою лужного методу [6]. Молекулярну масу плазмідних ДНК визначали за калібровочною кривою, яку складали за параметрами маркерної плазмідної *Lambda-pUC mix Marker 4* («Fermentas», Canada).

Для довгострокового зберігання вилучених штамів використали наступні методи: у напіврідкому м'ясоптонному агарі (МПА) під шаром вазелінового масла при температурі $6\text{--}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (термін зберігання – сім років із пересівами кожні шість місяців) та в кріоконсервованому стані при температурі $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (термін зберігання – сім років). Початкова концентрація клітин *E. coli* складала $10^7\text{--}10^8$ КУО/мл. Як кріопротектор використовували 10 % водний розчин диметилсульфоксиду (ДМСО). До суспензії бактерій у співвідношенні 1:1 додавали розчин ДМСО з концентрацією 20 %. Після еквілібрації з кріопротектором протягом 30 хв при кімнатній температурі бактерійну суспензію вносили в кріопробірки Nunc (Данія) об'ємом 1,8 мл та заморожували в рідкому азоті.

Статистична обробка отриманих результатів проведена з використанням загальноприйнятих методів варіаційної та кореляційної статистики [2], а також за допомогою комп'ютерної програми SPSS Statistics 17.0. Рівень достовірної вірогідності складав $p \leq 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Сумарні результати вивчення антибіотикорезистентності виділених штамів *E. coli* узагальнено і представлено в таблиці. Встановлено розбіжності в антибіотико-чутливості штамів, вилучених з різних біотопів.

У ході дослідження серед 31,7 % (46/145) штамів *E. coli* зі зниженою чутливістю до одного з цефалоспоринових III виявлено 18,6 % (27/145) штамів *E. coli*, які продукують БЛРС, що зумовлює відповідний рівень резистентності до пеніцилінів і цефалоспоринових II–III покоління. Причому

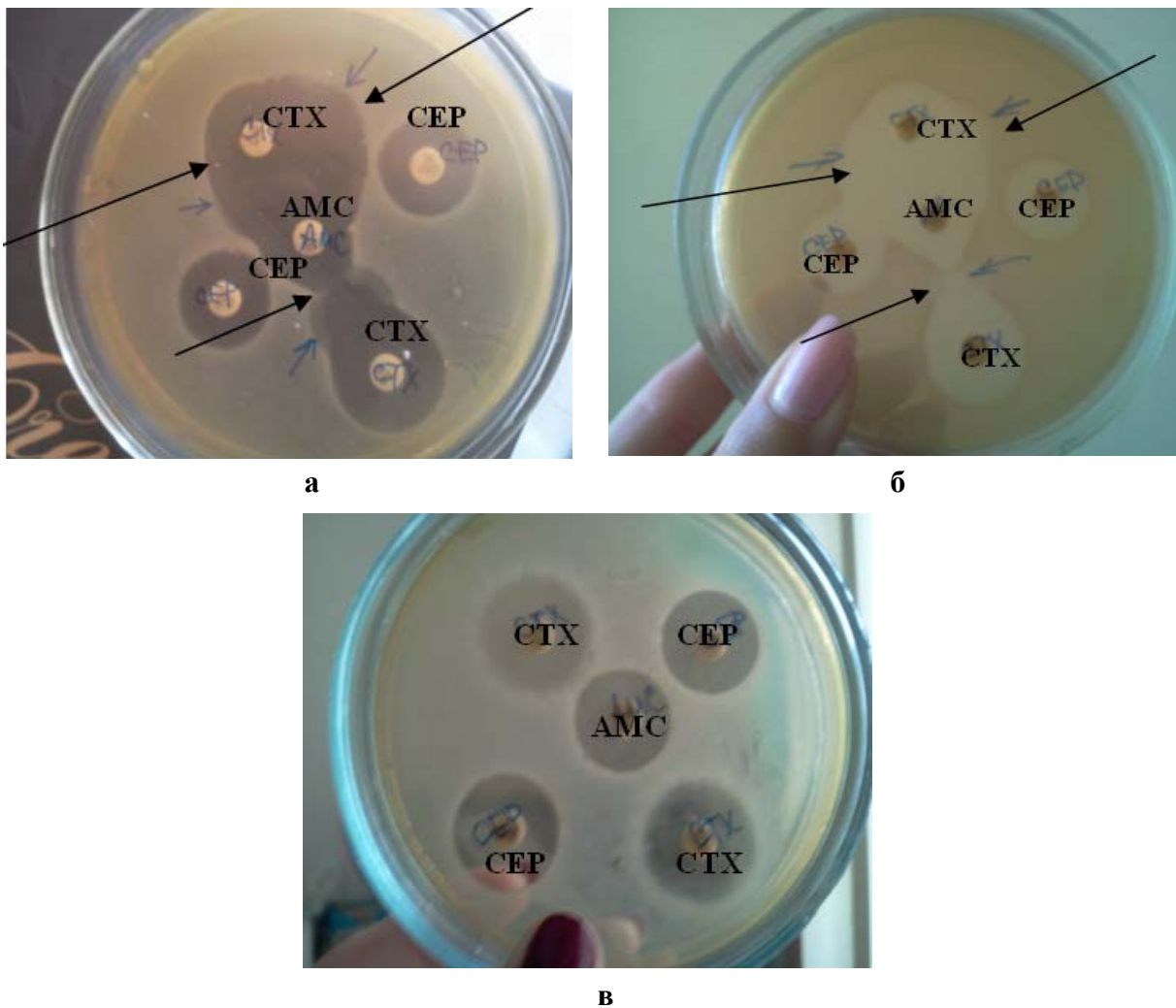


Рис. 1. Виявлення продукції БЛРС за допомогою методу «подвійних дисків» до зберігання (а), після 7-річного зберігання штамів *E. coli* шляхом криоконсервування (б) та шляхом періодичних пересівів (в): стрілками позначено розширення зони затримки росту навколо диска з цефалоспорином III покоління напроти диска, що містить клавуланову кислоту. Позначення дисків: AMC – амоксицилін/клавуланова кислота (20/10 мкг), CTX – цефотаксим (30 мкг), CEP – цефподоксим (10 мкг)

більшість БЛРС-продукуючих штамів виділено із сечі – 55,6 % (15/27).

Встановлено високу розповсюдженість поліантибіотикорезистентних штамів *E. coli*: від (49,2±9,8) % серед виділених із кишечника здорових осіб до (87,2±5,4) % – серед уропатогенних штамів. Усі штами, які виділено з дихальних шляхів і ділянок шкіри та м'яких тканин, характеризувалися множинною резистентністю до вивчених антибіотиків, що властиво госпітальним штамам.

Виявлено, що криоконсервування протягом семи років не впливало на початкову чутливість штамів *E. coli*, виділених із різних біотопів, до антибактеріальних препаратів. На відміну від криоконсервування з періодичними пересівами культур, які зберігали в напіврідкому МПА під шаром вазелінового масла при температурі 6–8 °С, виявлено, що профіль антибіотикорезистентності БЛРС-продукуючих штамів через рік зберігання (другий пересів) змінився в 77,8 % таких ізолятів. При вивченні властивостей штамів, які синтезують БЛРС, методом «подвійних

дисків» встановлено, що з 27 штамів тільки в шести наявний був синтез БЛРС (рис. 1).

При дослідженні плазмідного профілю 12 штамів *E. coli*, виділених із сечовивідних шляхів та вагіни, виявлено, що вони мали від однієї до восьми плазмід із розмірами 1-24 kb. Для 66,7 % таких штамів характерна множинність вмісту плазмід (тобто більше 3). У більшості випадків одночасно з великими плазмідами в клітинах одного й того ж штаму містилися невеликі кільцеві замкнуті ДНК із дискретними розмірами від 1 до 4,2 kb. У всіх штамів *E. coli* виявлялася плазміда розміром 19,3 kb, причому ці штами мали високий рівень резистентності до антибіотиків (до 6-10 антибіотиків одночасно).

Результати вивчення плазмідного профілю штамів *E. coli* після криоконсервування та зберігання методом періодичних пересівів корелюють з описаними вище фенотиповими проявами антибіотикорезистентності.

Всі штами при вивченні електрофореграм ДНК після криоконсервування зберігали кількість

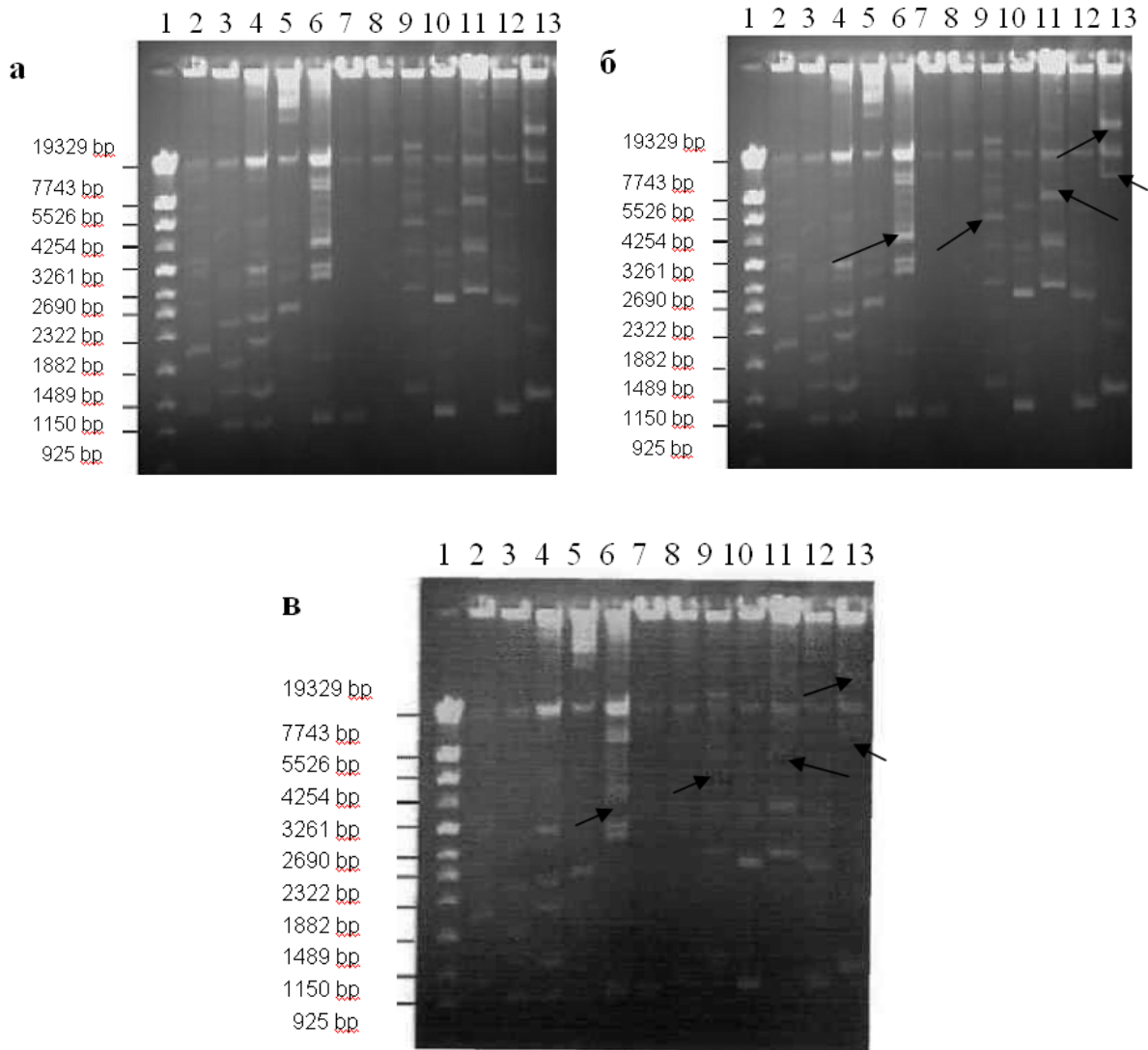


Рис. 2. Електрофореграма плазмід штамів *E. coli*, які виділені з сечовивідних і статевих шляхів, до зберігання (а), після 7-річного зберігання шляхом криоконсервування (б) та шляхом періодичних пересівів (в): стрілками позначено наявність (б) та втрата (в) плазмід після зберігання. Позначення: № 1 – Lambda pUC mix Marker; № 2 – M2a, № 3 – M197, № 4 – M2, № 5 – M1/109, № 6 – M1/284, № 7 – M1/242, № 8 – M1/113, № 9 – M475, № 10 – M443, № 11 – MA1; № 12 – B313, № 13 – B132

та спектр плазмідних ДНК. Після зберігання методом періодичних пересівів встановлено, що ряд штамів втратили деякі плазміди: бактерії штаму M1/284 – плазмиду з розміром 4,2 kb; M475 – плазмиду з розміром 5,5 kb; MA1 – плазмиду з розміром 7,7 kb; B132 – плазмиду з розміром 16 та 23 kb (рис. 2).

Таким чином, клінічні ізоляти *E. coli*, виділені з різних біотопів людини, мають різний спектр чутливості до антибіотиків. Найбільша частка резистентних штамів виявлялась в ізолятив *E. coli* в сечі, особливо при ускладненій інфекції сечовивідної системи. Більш чутливими до антибактеріальних препаратів були штами, виділені з кишечника здорових людей.

Відомо, що плазміди, які детермінують синтез β -лактамази, мають розміри 5,4 та 7,6 kb [9, 11]. Виявлені в нашому дослідженні плазміди також належать до цього класу. Після зберігання

протягом семи років при температурі -196°C усі штами *E. coli* мали незмінні фенотипові спектри антибіотикорезистентності та плазмідний профіль. Це свідчить про те, що криоконсервування клітин *E. coli* в 10 % розчині ДМСО забезпечує збереження генетичної стабільності бактерій та не призводить до структурних змін плазмід або їх втрат.

У процесі зберігання в напіврідкому МПА під шаром вазелінового масла при температурі $6-8^{\circ}\text{C}$ частина штамів *E. coli* втрачала плазміди, у тому числі ті, які детермінують синтез БЛРС. Вірогідно, що відсутність фенотипово виявленої β -лактамазної здатності в штамів M475 і MA1, виділених із сечовивідних шляхів, зумовлена втратою саме плазмід. У зв'язку з цим такий метод зберігання не відповідає повною мірою вимогам до методів консервування бактерій у банках та при створенні колекцій мікроорганізмів.

Таблиця 1

Антибіотикорезистентність клінічних ізолятів *E. coli*, вилучених із різних біотопів

Антибіотик	Розподіл штамів за чутливістю, %					
	стійкі (R)		помірно стійкі (I)		чутливі (S)	
	абс.	M±m, %	абс.	M±m, %	абс.	M±m, %
β-лактами (n=145)						
ампіцилін	129	89,0±2,5	6	4,1±1,6	10	6,9±2,1
амоксицилін	135	93,1±2,1	4	2,8±1,3	6	4,1±1,6
амоксиклав	110	75,8±3,5	14	9,7±2,4	21	14,5±2,9
цефазолін	70	48,3±4,1	38	26,2±3,6	37	25,5±3,6
цефалотин	112	77,2±3,4	21	14,5±2,9	12	8,3±2,2
цефалексин	53	36,5±3,9	31	21,4±3,4	61	42,1±4,1
цефуроксим	105	72,4±3,7	17	11,7±2,6	23	15,9±3,0
цефотаксим	46	31,7±3,8	35	24,1±3,5	64	44,2±4,1
цефтріаксон	33	22,7±3,4	19	13,1±2,8	93	64,2±3,9
цефтазидим	35	24,2±3,5	16	11,0±2,5	94	64,8±3,9
іміпенем	3	2,0±1,1	2	1,4±0,9	140	96,6±1,5
Аміноглікозиди (n=145)						
гентаміцин	32	22,1±3,4	51	35,2±3,9	62	42,7±4,1
нетилміцин	21	14,5±2,9	30	20,7±3,3	94	64,8±3,9
амікацин	11	7,6±2,2	18	12,4±2,7	116	80,0±3,3
Фторхінолони (n=145)						
ципрофлоксацин	17	11,7±2,6	11	7,6±2,2	117	80,7±3,2
норфлоксацин	32	22,1±3,4	36	24,8±3,5	77	53,1±4,1
офлоксацин	23	15,9±3,0	15	10,3±2,5	107	73,8±3,6
пєфлоксацин	16	11,0±2,5	12	8,3±2,2	117	80,7±3,2
гатифлоксацин	6	4,1±1,6	5	3,5±1,5	134	92,4±2,2
Тетрацикліни (n=145)						
тетрациклін	89	61,4±4,0	28	19,3±3,2	28	19,3±3,2
Протимікробні засоби (n=82)						
нітросолін	11	13,4±3,7	17	20,7±4,4	54	65,9±5,2
фуразолідон	13	15,8±4,0	30	36,6±5,3	39	47,6±5,5
фурагін	8	9,8±3,2	22	26,8±4,8	52	63,4±5,3

Висновки

1. Встановлена висока розповсюдженість детермінант резистентності до антибіотиків серед ізолятів *E. coli* – представників нормальної мікрофлори, що робить їх потенційним джерелом поширення антибіотикорезистентності серед свого виду та споріднених видів бактерій різних таксономічних груп.

2. Показано, що більшість вивчених штамів *E. coli* має декілька плазмід, при цьому в полірезистентних (до 6-10 антибіотиків одночасно) досліджуваних штамів виявлялася плазмідна розміром 19,3 kb.

3. Експериментально доведено, що зберігання виділених штамів у 10 % водному розчині диметилсульфоксиду при сталій температурі – 196° С протягом семи років (термін спостереження) забезпечило збереження спектрів чутливості до

антибактеріальних препаратів та плазмідний профіль (кількість та розмір плазмід).

4. Встановлено, що при зберіганні в напіврідкому м'ясопептонному агарі під шаром вазелінового масла при температурі 6-8 °С шляхом періодичних пересівів упродовж всього строку спостереження (сім років) у деяких штамів змінювався спектр чутливості до β-лактамних антибіотиків, що пов'язано із втратою плазмід.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження в даному науковому напрямку дозволять впровадити в практику створення колекцій мікроорганізмів технології гарантованого довгострокового зберігання плазмідних штамів бактерій та забезпечити молекулярно-генетичні дослідження механізмів антибіотикорезистентності та їх подолання в патогенних та умовно-патогенних представників різних таксонів.

Література

1. Про затвердження методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: Наказ МОЗ України № 167 від 05.04.2007. – К.: МОЗ України, 2007. – 63 с.
2. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. – Л.: МедГиз, 1962. – 180 с.
3. Герасимович А.Д. Выживаемость бактериофагов фитопатогенных бактерий при криоконсервации и лиофилизации / А.Д. Герасимович, Г.И. Новик // Пробл. криобиол. – 2012. – Т. 22, № 3. – С. 315.
4. Дорофеева Т.В. Сохранность иммобилизованных в гелях клеток *Escherichia coli* M-17 при низких температурах / Т.В. Дорофеева, Е.В. Кудокоцева // Пробл. криобиол. – 2014. – Т. 24, № 2. – С. 187.
5. Цуцаева А.А. Холодовой стресс и биологические системы / под ред. А.А. Цуцаевой. – К.: Наук. думка, 1991. – 176 с.
6. Birnboim H.C. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA / H.C. Birnboim, J. Doly // Nucleic Acids Res. – 1979. – Vol. 7, № 6. – P. 1513-1523.
7. Cryogenic Preservation of Bacteria // References ATCC Connection. – 2006. – Vol. 26, № 1. – 8 p.
8. Marston C.K. Effects of long-term storage on plasmid stability in *Bacillus anthracis* / C.K. Marston, A.R. Hoffmaster, K.E. Wilson // Appl Environ Microbiol. – 2005. – Vol. 71, № 12. – P. 7778-7780.
9. Messai Y. Prevalence of β -lactams resistance among *Escherichia coli* clinical isolates from a hospital in Algiers / Y. Messai, T. Benhassine, M. Naim // Rev. Esp. Quimioterap. – 2006. – Vol. 19, № 2. – P. 144-151.
10. Murakami M. Evaluation of DNA Plasmid Storage Conditions / M. Murakami // The Open Biotechnology J. – 2013. – № 7. – P. 10-14.
11. Zou Li-Kou Molecular characterization of β -lactam-resistant *Escherichia coli* isolated from Fu River World / Li-Kou Zou, Li-Wen Li, Xin Pan // J. of Microbiology and Biotechnology. – 2012. – Vol. 28, № 5. – P. 1891-1899.

СОХРАННОСТЬ СПЕКТРОВ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *ESCHERICHIA COLI* ПОСЛЕ ДОЛГОСРОЧНОГО ХРАНЕНИЯ

Ю.В. Войда

Резюме. Установлены различия в антибиотикочувствительности изолятов *Escherichia coli*, выделенных из разных биотопов. Показано, что хранение при -196°C в течение семи лет (срок наблюдения) не влияет на спектр антибиотикорезистентности бактерий. При хранения под слоем вазелинового масла при температуре $6-8^{\circ}\text{C}$ методом периодических пересевов часть штаммов теряла резистентность к β -лактамам антибиотикам, что связано с потерей плазмид.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, биотоп, антибиотикочувствительность, плазмиды, криоконсервирование.

SAFETY OF ANTIBIOTICS SPECTRUM OF *ESCHERICHIA COLI* CLINICAL STRAINS AFTER LONG-TERM STORAGE

Y.V. Voyda

Abstract. Distinctions in spectrums of sensitiveness to antibacterial preparations of strains of *Escherichia coli* isolated from different biotopes are set. It is shown that storage at -196°C during 7 years (term of supervision) does not change the spectrum of antibiotic resistance of bacteria. Part of strains lost resistance to β -lactams at storage under the layer of vaseline butter at a temperature $6-8^{\circ}\text{C}$ by the method of periodic subculturings, that is related to the loss of plasmids.

Key words: *Escherichia coli*, biotope, antibiotic susceptibility, plasmids, cryoconcentration.

Medical Academy of Postgraduate Education (Kharkiv)

Рецензент – проф. С.С. Дейнека

Buk. Med. Herald. – 2015. – Vol. 19, № 4 (76). – P. 36-40

Надійшла до редакції 09.10.2015 року