

УДК 579.842:579.25

Ю. В. Войда
С. В. БірюковаХарківська медична академія
післядипломної освіти МОЗ УкраїниДОСЛІДЖЕННЯ ПЛАЗМІДНИХ ДНК
КЛІНІЧНИХ ШТАМІВ *ESCHERICHIA COLI***Ключові слова:** ешерихії, біотоп,
плазмід, антибіотикорезистентність.**Резюме.** Встановлено, що плазмідні зустрічалися у 88,6 % штамів ешерихій, виділених з різних біотопів, при чому більшість вилучених штамів були мультіплазмідними. Штами, що досліджувалися, мали від 1 до 8 плазмід з розмірами від 1 до 24 kb. Найчастіше серед досліджуваних ешерихій зустрічалась плазмід розміром 19,3 kb.**Вступ**

Відомо, що плазмідні дуже поширені серед представників ентеробактерій. Позахромосомна ДНК виявлена у 25–75 % всіх досліджених штамів цієї родини залежно від осередка відбору зразка та родових особливостей бактерій [5]. Недостатньо вивчено усі функції, які детермінуються плазмідними, та механізм взаємовідносин різних репліконів, представлених одночасно в одній бактеріальній клітині. Тим самим підвищується значення ешерихій, які нерідко містять екстрахромосомні генетичні структури.

Наявність плазмід у патогенних та умовно-патогенних мікроорганізмів має особливо велике значення через детермінацію ними стійкості до антибіотиків чи синтезу токсинів, факторів адгезії та можливість передачі цих властивостей непатогенним мікроорганізмам.

Присутність мультіплазмідних штамів виявлено у представників різних родів, в тому числі і *Escherichia* [8]. В останні роки доказано, що плазмідний профіль може бути корисним епідеміологічним інструментом, особливо при госпітальних спалахах інфекцій різної етіології [4].

Мета дослідження

Метою дослідження було вивчення плазмідного спектру, оцінювання розповсюдженості плазмід у ешерихій, вилучених з різних біотопів, та визначення їх молекулярного розміру.

Матеріал і методи

Матеріалом для дослідження відібрано 35 клінічних штамів ешерихій, ізолюваних з різних біотопів: з сечовивідних шляхів – 10 штамів (група М), жіночих статевих шляхів – 4 штама (група В), чоловічих статевих шляхів – 4 штама (група С), ділянки шкіри – 1 штам (група К), кишечнику осіб з синдромом дисбактеріоз – 8 штамів (група Д), а також кишечнику здорових людей – 8 штамів (група Н).

Для визначення видової приналежності та наступного вивчення біологічних властивостей бактерій *E. coli* досліджувалися сеча, сперма, вагінальний вміст, фекалії, а також виділення із рани згідно чинної нормативно-методичної документації [3]. Вид мікроорганізму визначали на основі отриманого біохімічного профілю згідно з «Визначником бактерій Берджі» [7].

Чутливість ешерихій до антибактеріальних препаратів визначено диско-дифузійним методом Keurbu-Bauer з використанням стандартних комерційних дисків (НИЦФ, Росія) на середовище Мюллера-Хінтона (HiMedia, Індія). Результати дослідження інтерпретували у відповідності до Наказу Міністерства охорони здоров'я України [1].

Вивчення плазмідного спектру клінічних ізолятів ешерихій проводили з використанням лужного методу [6]. Молекулярну масу плазмідних ДНК визначали за калібровочною кривою, яка була складена з використанням параметрів маркерної плазміді Lambda-pUC mix Marker 4 («Fermentas», Canada).

Обговорення результатів дослідження

Встановлено, що плазмідні зустрічалися у 88,6 % штамів ешерихій, виділених з кишечника здорових осіб і патологічного матеріалу. Безплазмідні штами виявлено серед ешерихій, вилучених з кишечнику здорових людей (3 штами) і осіб з дисбактеріозом (1 штам). Штами, що досліджувалися, мали від 1 до 8 плазмід з розмірами від 1 до 24 kb (рис. 1, 2).

Результати дослідження плазмідного спектру ешерихій дали змогу зробити висновок, що більшість вилучених штамів характеризувалися множинністю вмісту плазмід, яка властива 64,5 % плазмідомістким ізолятам. Часто великі плазмідні клітин одного й того ж штаму супроводжували невеликі кільцеві замкнуті ДНК з дискретними розмірами від 1 до 4,2 kb. Найбільшу кількість плазмід вказаного розміру виявлено у штамів, вилучених з сечовивідних шляхів.

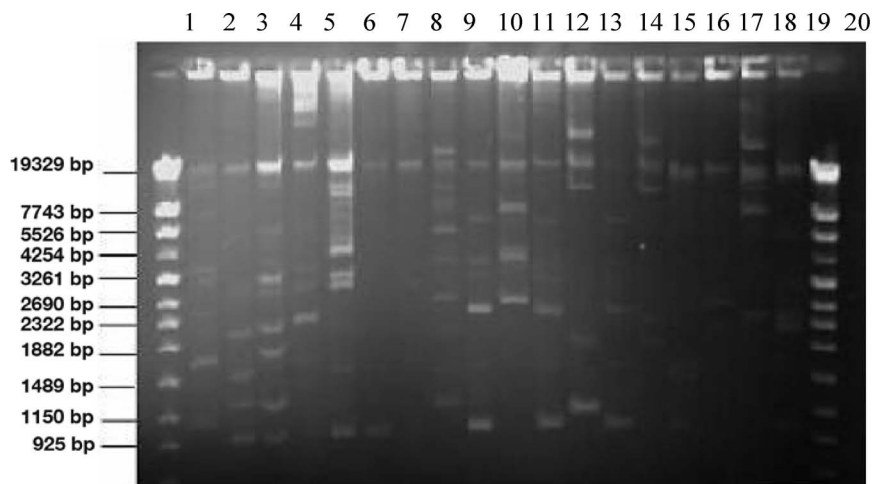


Рис. 1. Електрофореграма плазмід ешерихій, які вилучено з сечовивідних і статевих шляхів: № 1 и 20 - Lambda pUC mix Marker; № 2 - M2a, №3 - M197, №4 - M2, №5 - M1/109, №6 - M1/284, №7 - M1/242, №8 - M1/113, №9 - M475, №10 - M443, №11 - MA1; № 12 - B313, №13 - B132, №14 - B1/234, №15 - B1/109; № 16 - C1/282, №17 - C251, №18 - C4a, №19 - C352

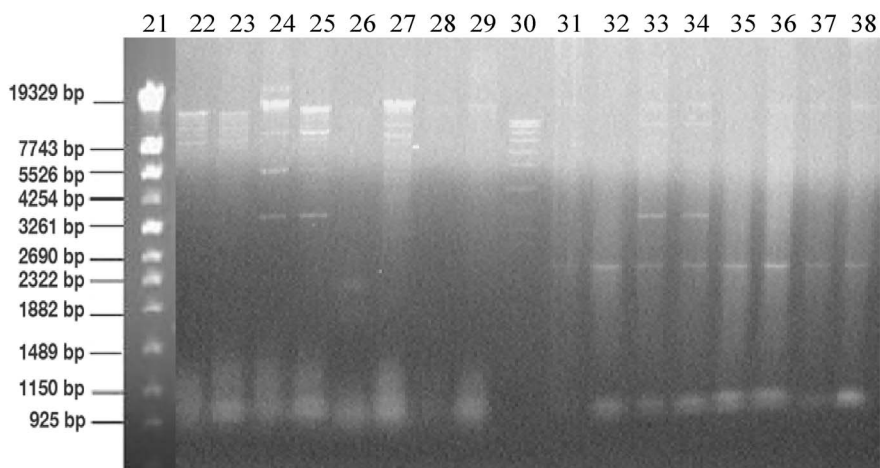


Рис. 2. Електрофореграма плазмід ешерихій, які вилучено з кишечника осіб з синдромом дисбактеріоз та здорових людей і з ділянки шкіри: № 21 - Lambda pUC mix Marker; № 22 - H336, №23 - H89, №24 - H424, №25 - H457, №26 - H486, №27 - H483; № 28 - H897, №29 - H454, № 30 - K2/06; №31 - Д39, №32 - Д45, №33 - Д3, №34 - Д1, №35 - Д473, №36 - Д8, №37 - Д186, №38 - Д133

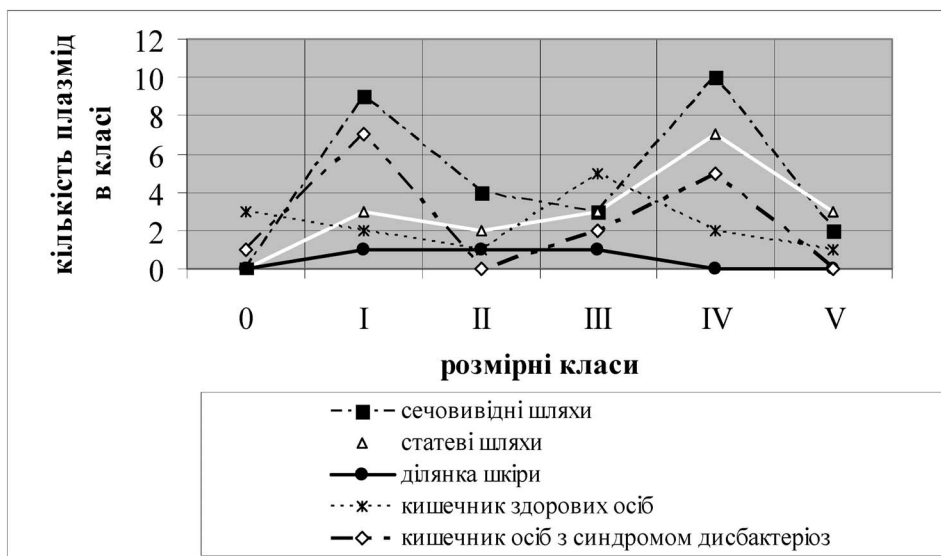


Рис. 3. Розподіл позахромосомних ДНК ешерихій, вилучених з різних біотопів, за розмірними класами

Таблиця

Класи плазмідних елементів (kb), виділених з клітин ешерихій, ізолюваних з різних біотопів

Біотоп виділення ешерихій	Плазмідні класи					
	0	I	II	III	IV	V
	0	1-<4,2	4,2-<7,7	7,7-<19,3	19,3	>19,3
сечовивідні шляхи (n=10)	0	9	4	3	10	2
статеві шляхи (n=8)	0	3	2	3	7	3
ділянка шкіри (n=1)	0	1	1	1	0	0
кишечник здорових осіб (n=8)	3	2	1	5	2	1
кишечник осіб з синдромом дисбактеріоз (n=8)	1	7	0	2	5	0

Крім дрібних плазмід, штами ешерихій несуть порівняно великі позахромосомні фактори (від 7,7 до 24 kb). З 35 штамів 29 (82,8 %) володіли плазмідями, які були за розмірами від 7,743 до 23,883 kb. Найчастіше серед досліджуваних ешерихій зустрічалась плазмідя розміром 19,3 kb, причому ці штами мали високий рівень резистентності до антибіотиків (до 6-10 антибіотиків одночасно).

Слід відмітити, що штами, вилучені з сечі (M443) та відділяемого піхви (B313) від однієї хворої, мали подібні профілі. Це підтверджує положення про можливу подальшу транслокацію ешерихій з генітального тракту в сечовивідні шляхи та інші органи і тканини. Цікаво, що в нашому дослідженні штами, ізолювані зі сперми, володіли тільки великими плазмідями, причому 3 з 4-х – тільки плазмідой розміром 19,3 kb.

Досліджено один штам кишкової палички, вилучений з ділянки шкіри, який характеризувався множинністю вмісту плазмід і мав стійкість до всіх взятих в дослід антибіотиків, що, ймовірно, свідчить про його госпітальне походження, але не містив плазмідю розміром 19,3 kb. Крім того, плазмідя розміром 10 kb зустрічалась тільки у ешерихії з цього біотопу. Для статистичної обробки дуже маленька вибірка, тому ми не стверджуємо, що плазмідя розміром 10 kb характерна для всіх штамів, які виділені з цього біотопу.

Слід підкреслити, що серед представників нормофлори 5 з 8-ми штамів були плазмідомістки, з них 2 ізолята характеризувалися стійкістю до 6-и антибіотиків одночасно та мали плазмідю розміром 19,3 kb.

Виявлені плазміді були умовно розділені на 5 розмірних класів (табл.). В тому числі визначався нульовий клас ешерихій, клітини яких не містять позахромосомних елементів. Виявлено, що кількість плазмід в різних класах суттєво відрізняється. Так, всі штами з групи M мали плазмідю розміром 19,3 kb і 9/10 – дрібні плазміді від 1 до 4,2 kb.

Ешерихії, вилучені зі статевих органів, як і попередня група, не мали безплазмідних штамів і 7/8 містили плазмідю розміром 19,3 kb. У штаму, який вилучено з ділянки шкіри, зустрічалися плазміді

розміром від 1 до 13 kb. Що стосується ешерихій, вилучених з кишечника, то серед групи Д (штами з кишечника осіб з дисбактеріозом) виявили 1 безплазмідний штам, а серед групи Н (штами з кишечника здорових осіб) – 3 таких штама. Крім того, серед ізолятів групи Н найрідше виявлялись штами з дрібними плазмідями (тільки в 25 % випадків). Всі плазмідомістки штами групи Д мали плазмідю розміром 2,5 kb, також для цієї групи характерна відсутність плазмід розміром від 4,2 до <7,7 kb і великих – понад 19,3 kb (рис. 3).

Таким чином, при дослідженні вилучених з різних біотопів штамів ешерихій виявлено плазміді, гетерогенні за розміром – від 1 до 24 kb. Вважають, що дрібні плазміді кодують множинну лікарську стійкість, в той час як великі детермінують значну частину властивостей, що визначають вірулентність та патогенність мікроорганізмів [2].

Висновки

1. Встановлено, що плазміді зустрічалися у 88,6 % штамів ешерихій, виділених з кишечника здорових осіб і патологічного матеріалу, при чому більшість вилучених штамів (64,5 % плазмідомістких ізолятів) характеризувалися множинністю вмісту плазмід. Найчастіше серед досліджуваних ешерихій зустрічалась плазмідя розміром 19,3 kb.

2. Раціонально використовувати виділення та ідентифікацію плазмідних ДНК в якості додаткового епідеміологічного маркера патогенів для вдосконалення мікробіологічного моніторингу ешерихіозних інфекцій.

3. Дослідження плазмідних ДНК, виділених з клінічних штамів, дозволить з більшою достовірністю визначати полірезистентні штами, що викликають внутрішньолікарняні інфекції, а також виявляти шляхи розповсюдження госпітальної інфекції в конкретному стаціонарі.

Перспективи подальших досліджень

У перспективі доцільно провести аналіз плазмідного профілю клінічних штамів ешерихій, вилучених з ділянок шкіри, з більшою вибіркою.

Література. 1.Наказ МОЗ України № 167 від 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів». – К: МОЗ України, 2007. – 63 с. 2. Дьяченко А. Г. Фенотипические особенности циркулирующих штаммов шигелл [Текст] / А. Г. Дьяченко, Н. А. Галушко, Л. В. Оксем // Вісник Сумського держ. ун-ту. Серія Медицина. – 2004. – № 11 (70). – С. 102–110. 3. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ № 535. – [чинний від 22.04.1985 р.]. – М.: МОЗ СССР, 1985. – 65 с. 4. Плазмидный анализ как один из способов генотипирования бактерий / Г. Ф. Леванова, В. Н. Мазепа, С. Ю. Кашников [и др.] // Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний: Материалы науч. конф., посвящ. 75-летию НИИЭМ. – Н. Новгород, 2004. – С. 241–244. 5. An epidemic of plasmid? Dissemination of extended-spectrum cephalosporinases among *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae* / L. H. Su, C. Chu, A. Cloeckaert, C. H. Chiu // FEMS Immunol Med Microbiol. – 2008. – Vol. 52, № 2. – P. 155–166. 6. Birnboim, H. C. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA [Text] / H. C. Birnboim, J. Doly // Nucleic Acids Res. – 1979. – V. 7. – P. 1513–1523. 7. Genus I. *Escherichia* in Volume 2, Part B The Gammaproteobacteria. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*; (George M. Garrity, Editor-in-Chief, *Bergey's Manual Trust*). Springer, 2005. – P. 607–624. 8. Small cryptic plasmids of multiplasmid clinical *Escherichia coli* / J. Burian, L. Guller, M. Macor, W. W. Kay // Plasmid. – 1997. – Vol. 37, № 1. – P. 2–14.

ИЗУЧЕНИЕ ПЛАЗМИДНЫХ ДНК КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*

Ю. В. Войда, С. В. Бiryukova

Резюме. Установлено, что плазмиды встречались у 88,6 % штаммов эшерихий, выделенных из различных биотопов, при этом большинство штаммов были мультиплазмидными. Исследуемые штаммы содержали от 1 до 8 плазмид размерами от 1 до 24 kb. Чаще всего среди исследуемых эшерихий встречалась плазида размером 19,3 kb.

Ключевые слова: эшерихии, биотоп, плазида, антибиотикорезистентность.

INVESTIGATION OF PLASMID DNA OF CLINICAL STRAINES OF *ESCHERICHIA COLI*

Ye. V. Voyda, S. V. Biryukova

Abstract. It has been stated that plasmids were met at 88,6 % strains of *E. coli* isolated from different biotopes, most strains were multiplasmid. The investigated strains contained from 1 to 8 plasmids measured from 1 to 24 kb. Plasmid by size of 19,3 kb was met among investigated escherichia more often.

Key words: escherichia, biotope, plasmid, antibiotic resistance.

Kharkiv Medical Academy of Post Graduate Education of MOH of Ukraine

Clin. and experim. pathol.- 2013.- Vol.12, №1 (43).-P.51-54.

Надійшла до редакції 07.02.2013

Рецензент – проф. О. В. Кравченко

© Ю. В. Войда, С. В. Бiryukova, 2013