

**ОЦЕНКА ТРАНСМИССИВНОСТИ БЛРС-КОДИРУЮЩИХ ПЛАЗМИД У МОЧЕВЫХ
ИЗОЛЯТОВ E. COLI, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ АМБУЛАТОРНЫХ ПАЦИЕНТОВ**Е.И. Катаева

Научный руководитель: профессор, д.м.н. А.Л. Бурмистрова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Челябинский государственный университет»,

Россия, г. Челябинск, ул. Братьев Кашириных, 129, 454001

E-mail: kataeva3105@mail.ru**EVALUATION OF THE ESBL-CODING PLASMIDS TRANSMISSIBILITY IN E. COLI ISOLATED
FROM AMBULATORY PATIENT'S URINA**E.I. Kataeva

Scientific Supervisor: Prof., Dr. A.L. Burmistrova

Chelyabinsk State University, Russia, Chelyabinsk, Brothers Kashirinykh str., 129, 454001

E-mail: kataeva3105@mail.ru

Abstract. Representatives of the Enterobacteriaceae family are the main causative agents of urinary tract infections. Escherichia coli can exhibit resistance to β -lactam antibiotics by synthesizing ESBL (extended spectrum β -lactamases). CTX-M β -lactamases are the dominant group of ESBL. In this paper, we investigated the ability of E. coli urinary isolates to transmit resistance genes within the plasmid. An analysis of the effectiveness of conjugation has shown that E. coli strains producing ESBL are capable of transferring resistance genes to a recipient bacterium at a high frequency.

Введение. Инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) по распространенности занимают второе место в мире, уступая лишь патологиям органов дыхательного тракта. Основными возбудителями внебольничных ИМВП являются представители Enterobacteriaceae, в первую очередь Escherichia coli, которая выделяется из клинического материала больных в более чем 80% случаев [1]. Препаратами выбора при эмпирической терапии таких инфекций являются антимикробные средства, в том числе бета-лактамы антибиотики.

Между тем следует помнить, что E. coli – это микроорганизм, который первично или вторично способен синтезировать ряд бета-лактамаз, разрушающих определенные препараты этой группы. Среди известных бета-лактамаз приобретенного происхождения особую значимость имеет группа БЛРС (бета-лактамазы расширенного спектра), ферменты которой различаются субстратным профилем и кодируются рядом генов, локализующихся на плазмидах [2].

В настоящее время, в России и ряде других стран Европы, Азии и Южной Америки, СТХ-М бета-лактамазы являются доминирующей группой БЛРС [3]. Частота встречаемости E. coli с таким механизмом устойчивости особенно высока среди госпитальных возбудителей, что связано с повышенным потреблением современных бета-лактамы антибиотиков в стационарах. Среди амбулаторных пациентов процент СТХ-М-продуцирующих E. coli не велик. Однако, по данным иностранных авторов, ряд последних лет характеризуется стремительным их увеличением [3, 4]. Это,

вероятно, связано с конъюгативными свойствами плазмид, на которых локализируются гены резистентности. В источниках отечественной научной литературы такие данные представлены единично.

В связи с вышеуказанным, целью нашей работы являлась оценка трансмиссивности БЛРС-кодирующих плазмид *E. coli*, выделенных из мочи амбулаторных пациентов.

Материалы и методы. Исследования проводили в учебной лаборатории микробиологии и иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет» на базе бактериологической лаборатории МБУЗ ГКБ № 6 г. Челябинска в период январь – декабрь 2017 года.

Для эксперимента производили отбор этиологически значимых штаммов *E. coli*, выделенных из мочи амбулаторных пациентов с ИМВП. Всего исследовано 254 штамма. Идентификацию выполняли с помощью тест-системы «ENTEROtest 24» («LaChema, Чехия).

Антибиотикочувствительность выделенных штаммов определяли диско-диффузионным методом в соответствии с клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (2015г.). Фенотипическое обнаружение БЛРС осуществляли согласно МУК 4.2.1890-04.

Выявление генов СТХ-М у БЛРС-положительных штаммов выполняли методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора «Резистентность к цефалоспорином – 1 (гены СТХ-М)» («Литех», Россия).

Оценку трансмиссивности БЛРС-кодирующих плазмид от клеток-донора к клеткам-реципиента выполняли по методическим рекомендациям для постановки конъюгации [5]. В исследовании использовали суточные культуры следующих штаммов: цефотаксим-резистентные клинические штаммы *E. coli* (донор), штамм *E. coli* 2320 СТХ-М-42 (контрольный донорный штамм) и штамм *E. coli* АВ 1456 Rif^R (реципиент). Конъюгацию проводили в жидкой среде (бульон Мюллера-Хинтон), используя начальное соотношение суточных культур донора и реципиента 1:2. Для дифференциации колоний трансконъюгантов, донора и реципиента, культуры высевали на чашки с агаром Мюллера-Хинтон с добавлением антибиотиков: рифампицин, цефотаксим и рифампицин+цефотаксим. Эффективность конъюгации рассчитывали как отношение количества колоний трансконъюгантов на чашках с рифампицином и цефотаксимом к количеству колоний реципиента на чашках с рифампицином. Параллельно проводили высева на селективные среды донорных культур для оценки частоты спонтанных мутаций устойчивости к рифампицину и культуры реципиента для оценки частоты спонтанных мутаций устойчивости к цефотаксиму, и в качестве отрицательного контроля конъюгации.

Для подтверждения наличия генов СТХ-М у полученных в ходе конъюгации трансконъюгантов проводили идентификацию генетических детерминант методом ПЦР в режиме реального времени с использованием набора «Резистентность к цефалоспорином – 1 (гены СТХ-М)» («Литех», Россия).

Статистическую обработку данных выполняли методом оценки значимости средних величин.

Результаты. В ходе фенотипической оценки были выделены 35 (14%) штаммов *E. coli*, продуцирующих БЛРС. ПЦР-анализ подтвердил наличие генов СТХ-М β –лактамаз у 17 изолятов. Исследование возможности передачи генов СТХ-М при конъюгации показало, что 14 из 17 штаммов *E. coli* способны передавать плазмиду, кодирующую исследуемый ген. ПЦР-анализ полученных трансконъюгантов подтвердил наличие гена у 10 штаммов. Отсутствие гена у остальных трансконъюгантов, возможно, объясняется наличием спонтанных мутаций у реципиента. По данным

эксперимента рассчитали эффективность конъюгационного процесса, значения которого представлены в таблице 1.

Таблица 1

Эффективность конъюгации исследованных штаммов E. coli

№ п/п	Номер штамма	Эффективность конъюгации, $p < 0,05$	№ п/п	Номер штамма	Эффективность конъюгации, $p < 0,05$
1	338	0,250±0,005	8	381	0,024±0,001
2	903	0,033±0,002	9	655	0,032±0,001
3	642	0,024±0,001	10	681	0,026±0,001
4	841	0,030±0,001	11	842	0,042±0,002
5	809	0,166±0,007	12	214	0,038±0,005
6	488	0,030±0,001	13	432	0,333±0,008
7	737	0,026±0,001	14	153	0,027±0,001

Заключение. Проведенные нами исследования показали, что штаммы E. coli – продуценты БЛРС, содержащие гены CTX-M, встречаются при внебольничных инфекциях мочевыводящих путей. Данные штаммы способны к горизонтальной передаче этих генов резистентности. Распространение приобретенной устойчивости к бета-лактамам антибиотикам среди этиологически значимых штаммов E.coli посредством передачи плазмид, вероятно, является одной из нарастающих проблем, требующих тщательного изучения и поиска возможных путей ее преодоления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Палагин, И.С. Современное состояние антибиотикорезистентности возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты исследования «ДАРМИС» (2010-2011) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14. – № 4. – С. 280–302.
2. Эйдельштейн, М.В. β-лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – № 3. – С. 223–242.
3. Canton, R., Coque T.M. (2006). The CTX-M b-lactamase pandemic [Electronic version]. Current Opinion in Microbiology, no. 9, pp. 466 – 475.
4. Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski M. (2007). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe [Electronic version]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, no. 59 (2), pp. 165 – 174.
5. Степанова, М. Постановка конъюгации // Бета-лактамазы: значение и методы выявления: материалы научно-практического семинара. – Смоленск, 2005. – С. 24 – 25.