

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ РІВНЯ АНТИБІОТИКОЧУТЛИВОСТІ ШТАМІВ *ESCHERICHIA COLI* РІЗНИХ ПЕРІОДІВ ВИДІЛЕННЯ

Перетятко О.Г., Ягнюк Ю.А., Скляр Н.І.,
Большакова Г.М., Холодна Т.В.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології
ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних
наук України», м. Харків

На сьогодні в світі настільки гостро стоїть проблема поширення стійкості мікроорганізмів до антимікробних препаратів, що ХХІ століття по праву можна назвати «ерою антибіотикорезистентності» [1-3]. Для встановлення закономірностей формування антибіотикорезистентності мікроорганізмів деякими дослідниками [2, 4] запропонований умовний розподіл епохи антибіотиків на три періоди: період до відкриття та широкого використання антибіотиків (доантибіотичний – період до 1960 року); період масового виробництва, відкриття та використання нових антибіотичних препаратів різних груп (метаантибіотичний – період з 1960 по 2000 роки); сучасний період (після 2000 року), що характеризується значним зростанням антибіотикорезистентності мікроорганізмів та обмеженою кількістю перспективних для виробництва протимікробних препаратів.

Дослідження складних процесів, що відбуваються в популяції мікроорганізмів у різні історичні періоди під впливом антимікробних сполук надасть інструменти для прогнозування, контролю та запобігання стрімкого розповсюдження резистентності до антибіотиків. З цією метою, на наш погляд, важливо вивчати профілі антибіотикорезистентності музейних штамів мікроорганізмів, ізольованих як в доантибіотичний період, так і в періоди впровадження та широкого використання різних груп антибіотиків у медичну практику.

Метою роботи було порівняння профілей антибіотикочутливості колекційних штамів *E. coli*, ізольованих у преантибіотичний, метаантибіотичний періоди та штамів, вилучених у сучасний період.

Матеріали і методи. Об'єкти дослідження: 41 колекційний штам *E. coli* з Музею мікроорганізмів Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України», ізольованих у різних країнах світу – Болгарії, Данії, Швеції, Німеччині, Індії, Угорщині, Росії, Україні, з них 20 штамів вилучено у преантибіотичний період та 21 штам – у метаантибіотичний період. Музейні штами зберігались у колекції у ліофілізованому стані від 44 до 73 років. Вилучені у сучасний період *E. coli* були представлені 55 штамми, які було отримано з бактеріологічної

лабораторії ХКЛ на залізничному транспорті № 1 Філії «Центр охорони здоров'я» ПАТ «Укрзалізниця» згідно з договором про науково-практичне співробітництво. Для відновлення ліофілізованих зразків *E. coli* вміст ампули розчиняли 1,0 мл поживного бульйону, мікробну суспензію висівали на кров'яний агар, посіви інкубували при температурі 37 °С протягом 24 годин. Визначення чутливості мікробних культур до антибіотиків проводили диско-дифузійним методом, методом серійних розведень в бульйоні та методом серійних розведень в агарі [5]. У досліджах використовувались бульйон та агар Мюллера-Хінтона (Himedia, Індія), стандартні комерційні диски з антибіотиками (ТОВ «Фармактив», Україна; ТОВ «Аспект», Україна; Himedia, Індія), антибіотики виробництва (ПАТ «Київмедпрепарат», ПАТ «Лекхім», ПАТ «Борщагівський ХФЗ», ТОВ «Фармакс Груп», Україна, «Сандоз ГмбХ», Австрія). Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин проводили за шкалою McFarland з використанням електронного приладу Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чеська Республіка). Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням комп'ютерних програм Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6.0.

Результати досліджень та їх обговорення.

Порівняльний аналіз результатів вивчення антибіотикочутливості у *E. coli* різних періодів виділення показав суттєве зниження активності β-лактамних антибіотиків щодо сучасних клінічних штамів кишкової палички (рисунок 1).

Так, кількість нечутливих до ампіциліну серед штамів вказаної групи зросла майже у 4 рази у порівнянні зі штамми, вилученими у преантибіотичний період та у 19,3 разів – у метаантибіотичний період, і складала $(92,7 \pm 3,5) \%$ ($p < 0,05$). Низьку активність щодо сучасних штамів проявляв також інгібіторозахищений антибіотик з групи амінопеніцилінів ампіцилін-сульбактам – $(81,8 \pm 5,2) \%$ нечутливих штамів, що у 5,5 разів перевищувало показники штамів преантибіотичного періоду ($(15,0 \pm 4,6) \%$) та у 17 разів – штамів метаантибіотичного періоду ($(4,8 \pm 2,7) \%$). Результати наших досліджень також свідчать про зростання в циркулюючій популяції ешерихій кількості штамів, резистентних до тікарциліну – $(80,0 \pm 5,4) \%$ та піперациліну – $(72,7 \pm 6,0) \%$, при цьому всі досліджені штами з груп порівняння виявились чутливими до зазначених антибіотиків з групи карбоксі – та уреїдопеніцилінів. Встановлено зростання у ешерихій, вилучених у сучасний період, резистентності до цефалоспоринів. Так, питома вага нечутливих до цефазоліну (І покоління) та цефуроксиму (ІІ покоління) серед циркулюючих штамів складала $(80,0 \pm 5,4) \%$ та $(67,2 \pm 6,3) \%$ відповідно, у той час, як серед штамів, вилучених у метаантибіотичний період лише $(4,8 \pm 2,7) \%$ ($p < 0,05$).

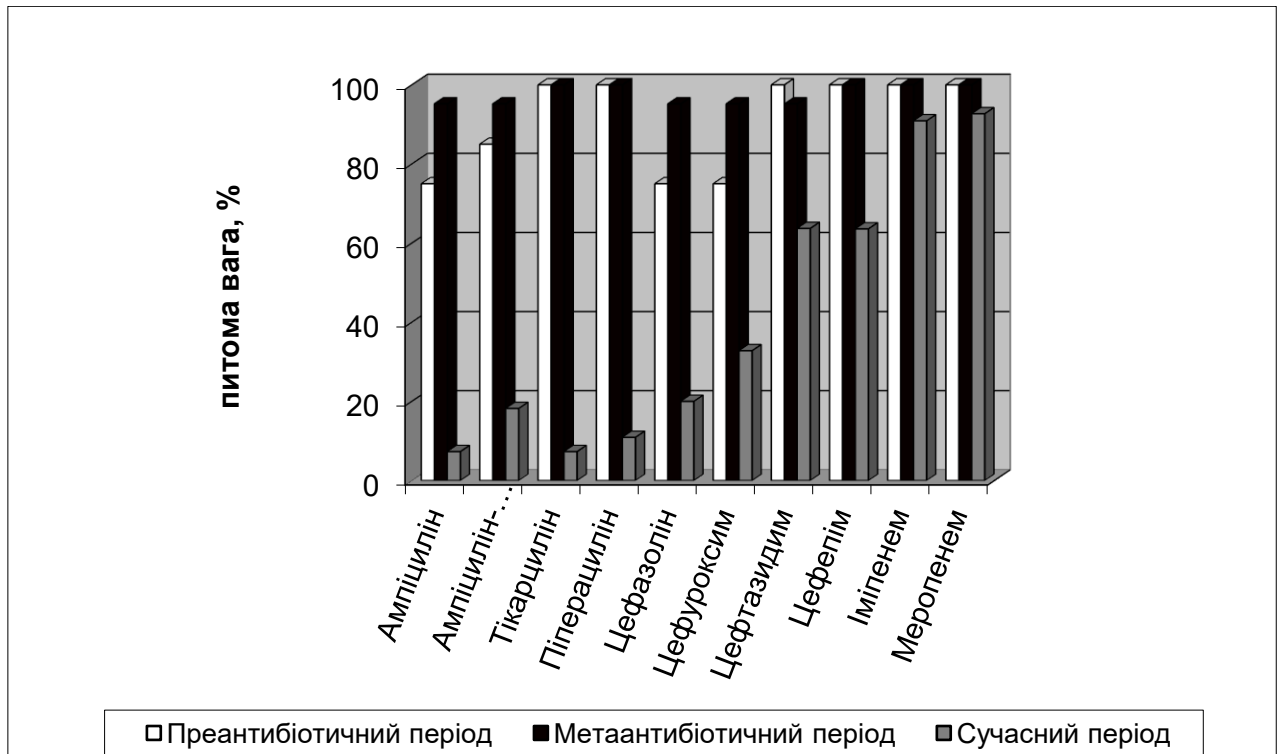


Рис. 1. Чутливість до β -лактамних антибіотиків у штамів *E. coli*, вилучених у різні історичні періоди

Проте, майже чверть штамів *E. coli* преантибіотичного періоду були нечутливими до цефалоспоринів I та II поколінь. Слід зазначити, що цефалоспорини III та IV поколінь виявляли високу ефективність щодо музейних штамів кишкової палички, лише один штам, виділений у 1963 році (метаантибіотичний період) був резистентним до цефтазидиму (III покоління). Серед сучасних штамів питома вага нечутливих до цефалоспоринів III - IV поколінь варіювала від 36,3 % до 49,1 %.

Найактивнішими серед бета-лактамних антибіотиків щодо досліджених нами штамів ешерихій різних періодів виділення були карбапенеми. Так, чутливими до іміпенему та меропенему виявились всі музейні штам та 90 % – циркулюючих. Високу активність щодо музейних *E. coli* проявляли аміноглікозиди (рисунок 2).

Всі досліджені штам, вилучені як у преантибіотичний, так і у метаантибіотичний періоди, були чутливими до гентаміцину та амікацину, у той час як серед циркулюючих штамів ешерихій питома вага нечутливих до гентаміцину складала $(43,7 \pm 6,7)$ %, до амікацину – $(3,6 \pm 2,5)$ %. Також у циркулюючій популяції ешерихій встановлено зростання резистентності до антибіотиків тетрациклінового ряду (рисунок 2). Так, кількість штамів нечутливих до тетрацикліну, серед вилучених у сучасний період, складала $(83,6 \pm 5,0)$ %, що у 4,2 рази перевищувало аналогічний показник штамів з груп порівняння ($p < 0,05$). Достовірної різниці між кількістю нечутливих до тетрацикліну серед штамів пре- та метаантибіотичного періодів не виявлено ($p > 0,05$). До доксицикліну всі

досліджені музейні штам були чутливими, у той час, як серед циркулюючих штамів, кількість нечутливих складала 65,5 %.

Результати наших досліджень показали високу протиешерихіозну активність хлорамфеніколу як щодо штамів, вилучених у преантибіотичний $(90,0 \pm 3,9)$ % і метаантибіотичний $(90,5 \pm 3,7)$ %, так і до циркулюючих штамів $(81,8 \pm 5,2)$ %, достовірної різниці між показниками не виявлено ($p > 0,05$).

На відміну від *E. coli*, вилучених у пре- та метаантибіотичний періоди, які виявляли 100 % чутливість до фторхінолонів та ко-тримоксазолу, серед циркулюючих штамів питома вага резистентних до фторхінолонів складала 40,0 % – 45,4 %, до ко-тримоксазолу – $(60,0 \pm 6,6)$ %.

За результатами вивчення антибіотикочутливості *E. coli*, вилучених в різні історичні періоди визначено спектри фенотипів стійкості. Встановлено, що серед ешерихій, вилучених наприкінці 50-х – напочатку 60-х років минулого століття, вже циркулювали штам, нечутливі до ампіциліну, ампіциліну-сульбактаму та цефалоспоринів. Слід підкреслити, що зазначені антибіотики у ті часи ще широко не використовувались (ампіцилін вперше введено у клінічну практику у 1961 році, цефалоспорини – у 70-ті роки, ампіцилін-сульбактам – лише у 1987 році). Це підтверджує той факт, що антибіотикорезистентність у бактерій виникла задовго до відкриття та початку використання антибіотиків у медичній практиці. На наш погляд, в основі резистентності до бета-лактамів у вказаних штамів можуть бути 2 механізми.

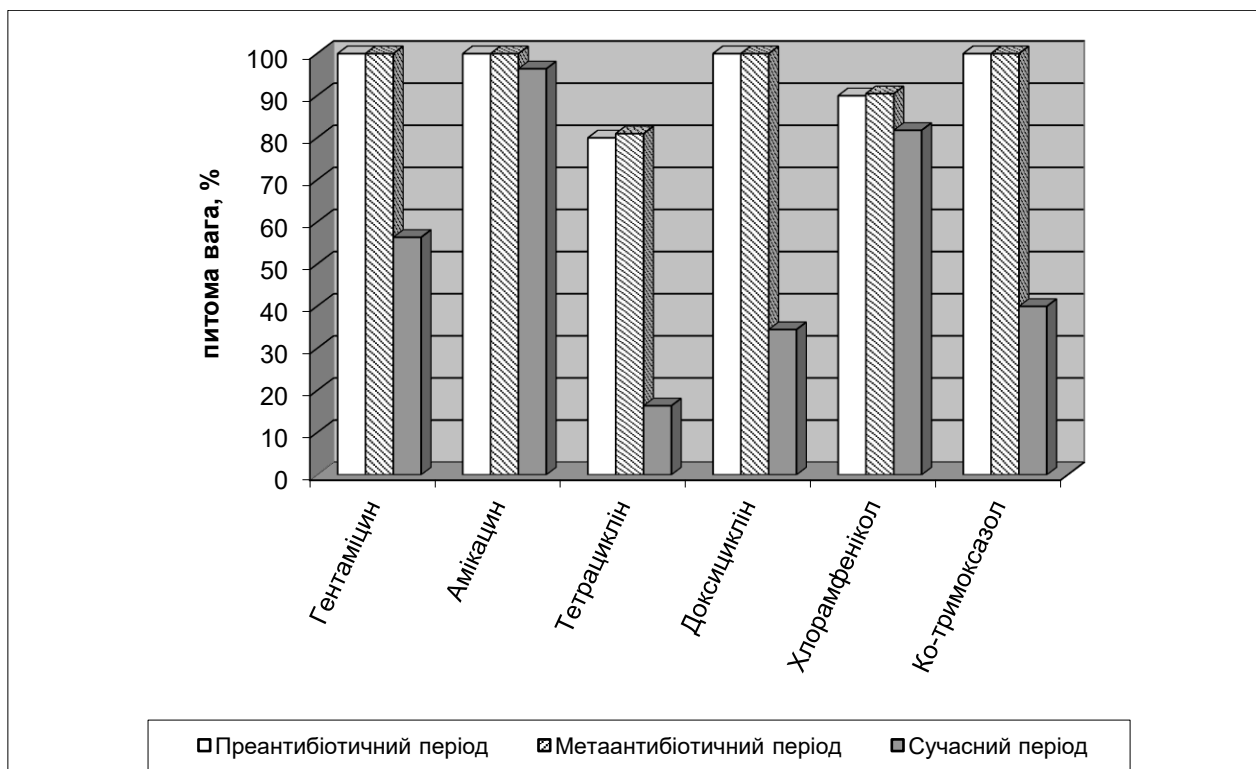


Рис. 2. Чутливість до аміноглікозидів, тетрациклінів, хлорамфеніколу, ко-тримоксазолу у штамів *E. coli*, вилучених у різні історичні періоди.

По перше, наприкінці 50 - х років пеніцилін дуже широко використовувався в медицині, що сприяло поширенню серед мікроорганізмів пеніцилінази – фермента, який здатний інгібувати дію пеніциліна та інших бета-лактамних антибіотиків. Другий механізм може бути пов'язаний з тим фактом, що бета-лактамази можуть еволюціонувати із пеніцилінзв'язуючих білків через селективний пресинг бета-лактамних антибіотиків, які продукуються деякими мікроорганізмами ґрунтових екосистем [6, 7]. У досліджених нами ешерихій, вилучених у преантибіотичний період, не виявлено резистентності до цефтазидиму, що свідчить про відсутність у зазначених штамів бета-лактамаз розширеного спектру дії (ESBL). У той час, як серед ешерихій, вилучених у метаантибіотичний період, нами виявлено штам *E. coli* 1963 року виділення, зі стійкістю до цефтазидиму, що вважається маркером наявності ESBL. За декілька десятиліть з моменту відкриття ESBL ці ферменти отримали глобальне розповсюдження, так у окремих країнах Європейського Союзу стійкість клінічних ізолятів *E. coli* до цефалоспоринів III покоління, що пов'язана з ESBL, коливалась від 5 % до 40 % [8], що співпадає з результатами наших досліджень. Так, за нашими даними, до цефалоспоринів III покоління були резистентними від 32,7 % до 41,8 % циркулюючої популяції ешерихій. За результатами проведених досліджень було встановлено, що у переважної більшості (70,0%) антибіотикорезистентних штамів, вилучених у пре- та метаантибіотичний періоди, виявлялась стійкість до 1–3 груп антибіотиків, у той час, як у 52,2 % сучасних штамів – до антибіотиків 4–7 хімічних груп.

Висновок. При порівняльному аналізі профілей антибіотикочутливості *E. coli*, вилучених у різні історичні періоди, встановлено зростання питомої ваги резистентних штамів серед циркулюючих ешерихій та розширення спектру груп антибіотиків, до яких виявлено стійкість.

Comparative analysis of the antibiotic sensitivity level of Escherichia coli strains of different isolation periods
Peretyatko O. G., Yagnyuk Yu. A., Sklyar N. I., Bolshakova G. M., Kholodna T. V.

Introduction. The problem of the spreading of the microorganisms resistance to antimicrobial drugs is so acute nowadays, that the XXI century can rightly be called the "era of antibiotic resistance". In our opinion, to study the mechanisms of antibiotic resistance in the population of microorganisms, it is important to analyze the antibiotic sensitivity of microorganisms isolated during different periods of antibiotics use in clinical practice. The aim of the study was to compare antibiotic sensitivity profiles of *E. coli* strains isolated in the preantibiotic, metaantibiotic and modern periods.

Material & methods. Objects of the study: 41 *E. coli* museum strains from the collection of the Museum of microorganisms stored in a lyophilized state for 44-73 years, and 55 circulating *E. coli* strains. Determination of the sensitivity of microbial cultures to antibiotics was performed using disco-diffusion method, serial broth dilution method and serial agar dilution method. Statistical data processing was performed using computer programs Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6.0.

Results & discussion. A comparative analysis of the results of the study of antibiotic sensitivity of *E. coli* of different isolation periods demonstrated significant

decrease in activity of the antibiotics of aminopenicillin group (ampicillin, ampicillin-sulbactam), generation I-III cephalosporins, tetracycline, chloramphenicol against modern clinical *E. coli* strains. In contrast to the museum strains, the circulating population of *E. coli* showed resistance to carboxy- and ureidopenicillins, generation IV cephalosporins, carbapenems, aminoglycosides, doxycycline, fluoroquinolones, and cotrimoxazole. The vast majority (70,0%) of the antibiotic-resistant museum strains showed resistance to 1–3 antibiotics groups, while 52,2% of the modern strains showed resistance to antibiotics of the 4–7 chemical groups. **Conclusion.** Comparative analysis of the antibiotic sensitivity profiles of *E. coli* isolated during different historical periods showed an increase in the proportion of resistant strains among circulating *E. coli* and an expansion of the range of antibiotics groups for which resistance was identified. **Key words:** *E. coli* strains isolated during different historical periods, antibiotics, antibiotic sensitivity.

References

1. Shirobokov VP., Voitsekhovskiy VG., Yakimenko AI. Antibiotics in medicine: yesterday, today and tomorrow. Modern problems of antibiotic therapy and formation of antibiotic resistance: materials of the international scientific and practical conference, January 29, 2018. Chernivtsi. P. 102–103.
2. Dyachenko PA. Antibiotics. The end of an era? Bulletin Sum SU, Seriya "Medicine". 2012. № 2. P. 5–19.
3. Salmanov AG. Resistance to antibiotics and biocides. International Journal of Antibiotics and Probiotics. 2017. Vol. 1 (2). P. 92–125.
4. Davies J., Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010. Vol. 74, No 3. P. 417–433.
5. On the approval of methodological guidelines: Determination of microorganisms' sensitivity to antibacterial drugs: Order No. 167 [Effective from 05.04.2007]. – K.: Ministry of Health of Ukraine, 2007. – 51 p. (Normative document of the Ministry of Health of Ukraine Order.)
6. Sidorenko SV., Tishkov VI. Molecular basis of antibiotic resistance. Advances in biological chemistry. 2004. Vol. 44. P. 263–306.
7. Abraham EP. Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature. 1940. Vol 373. P. 837.
8. Bukina YV., Kamyshny AM., Polishchuk NN. Determination of the spectrum of antibiotic resistance have phenotypic resistant strains of parietal intestinal microbiota in rats by RT-PCR. Annals of Mechnikov Institute. 2016. N 2. C. 21–27.