

Д. Л. Кирик, Е. А. Шабловская,  
Л. Н. Бурьяновский, Н. М. Кролевецкая, В. И. Кикоть

## ИЗУЧЕНИЕ ХРОСОМОНО-ПЛАЗМИДНОГО ДЕТЕРМИНИРОВАНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *SAMPYLOBACTER*

*Представлены исследования хромосомно-плазмидного детерминирования признаков антибиотикорезистентности у штаммов кампилобактерий, выделенных из различных источников. Анализ антибиотикограмм штаммов кампилобактерий показал, что 12 из них (31,6 %) обладали множественной лекарственной устойчивостью. Установлено наличие плазмид, детерминирующих антибиотикорезистентность у 7 из 38 исследованных культур (18,4 %). Обработка бромистым этидием приводила к изменению фенотипических свойств плазмидосодержащих штаммов. После элиминации плазмид молекулярной массой (мн)  $(40-70) \cdot 10^6$  утрачивалась устойчивость штаммов к тетрациклину и эритромицину, а плазмид мн  $(1,5-6) \cdot 10^6$  — к канамицину. Плазмидный характер множественной устойчивости кампилобактерий может служить дополнительным критерием эпидемической опасности штаммов.*

**Введение.** Имеются единичные сообщения, посвященные генетической организации бактерий рода *Campylobacter*. В частности показано, что штаммы кампилобактерий различных видов содержат плазмидную ДНК, функция которой заключается в детерминировании антибиотикорезистентности. Ряд работ посвящен изучению устойчивости кампилобактерий к тетрациклину, обусловленной плазмидой *pUA466* [1], и канамицину, зависящей от наличия плазмиды *pS1178* [2]. Однако в работах разных авторов имеются некоторые противоречия в характеристике плазмидной ДНК у изучаемых штаммов, касающиеся ее количества и величины, что определяется, вероятно, использованием разных методов выделения плазмид [3].

При организации комплексного эпидемиологического надзора необходимо установление природы устойчивости и спектра антибиотикорезистентности, обусловленного трансмиссивными R-факторами. В настоящее время мы не располагаем данными литературы по исследованию плазмидного профиля отечественных штаммов кампилобактерий.

В связи с этим задачей нашей работы явилось изучение хромосомно-плазмидного детерминирования признаков антибиотикорезистентности у штаммов кампилобактерий, выделенных из различных источников.

**Материалы и методы.** Исследованы 38 штаммов бактерий рода *Campylobacter* различного происхождения, полученных от больных, сельскохозяйственных животных и птиц, объектов окружающей среды, и эталонные. Их характеристика приведена в таблице.

В качестве плотной питательной среды для штаммов кампилобактерий использовали железо — эритрит кровяной агар [4]. Культивирование проводили при 42 °С в атмосфере 8—10 % CO<sub>2</sub>, создаваемой при помощи коммерческих газогенерирующих пакетов «Кампилогаз» (НИИ «Синтез», Борислав), в течение 48—72 ч.

Чувствительность кампилобактерий к антибиотикам определяли методом диффузии в агар с использованием дисков. Применяли стандартные коммерческие диски отечественного производства, содержащие 10—30 мкг гентамицина (Gm), канамицина (Km), карбенициллина

(Cb), тетрациклина (Tc) и эритромицина (Er). Штаммы разделяли на чувствительные и устойчивые к антибиотикам в соответствии с критериями, приведенными в методических указаниях [5].

Для контроля роста изучаемых бактерий использовали чашки с плотной питательной средой без добавления антибиотиков; для контроля воспроизводимости и точности процедуры определения чувствительности на чашки высевали эталонный штамм *Escherichia coli* ATCC 25922.

Плазмидную ДНК выделяли щелочным методом [6]. Для детекции низкокопийных плазмид при электрофоретическом анализе брали избыточное количество плазмидной ДНК. Электрофорез ДНК в 0,7 %-м агарозном геле осуществляли в горизонтальном слэб-аппарате в трис-боратном буфере при напряжении электрического поля 150 В в течение 5 ч. Пластинку геля после электрофореза обрабатывали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в течение 30 мин и просматривали в УФ-свете. Окрашенную пластинку геля фотографировали. В качестве маркеров молекулярной массы (мм) использовали ДНК фага  $\lambda$  размером  $\sim 36 \cdot 10^6$  и его фрагменты, полученные рестрикцией эндонуклеазой *HindIII*, размерами ( $\cdot 10^6$ ) 15,3; 6,2; 4,3; 2,9; 1,5; 1,3. Величину плазмидной ДНК определяли как сравнением скорости миграции плазмид исследуемых штаммов и стандартных плазмид, так и соотношением

Характеристика использовавшихся в работе штаммов кампилобактерий различного происхождения

Штамм	Источник выделения	Наличие плазмид у штаммов		Спектр антибиотикорезистентности
		Количество	мм·10 <sup>6</sup>	
<i>C. jejuni</i> 9	Больной	—	—	Str
» 71Д		1	50—70	Er Cb Str Tc
<i>C. coli</i> 71	»	—	—	—
» 73Д	»	1	50—70	Er Str Tc
» 73	»	—	—	—
<i>C. jejuni</i> 74	»	—	—	Cb
» 115	»	—	—	—
» 117	»	—	—	Str
» 118	»	—	—	Cb Str
» 140	»	—	—	Str
» 160	»	—	—	—
» 162	»	—	—	—
» 300	»	—	—	—
» 312	»	—	—	Str
» 313	»	—	—	—
» 360	»	1	50—70	Er Str Tc
» 457Z	Человек (эталонный)	—	—	Cb
» 462Д	Больной	1	3	Km Str
» 473	»	—	—	Str
» 478	»	—	—	—
» 490Д	»	—	—	Cb Str
<i>C. laridis</i> 729	Человек (эталонный)	—	—	Cb
<i>C. coli</i> 3Г	Курица	—	—	—
<i>C. jejuni</i> 3ТК	»	—	—	Str
<i>C. coli</i> 4ГК	»	—	—	—
» 5Г	»	—	—	—
<i>C. jejuni</i> 10П	»	2 1,5;	40—60	Er Km Str Tc
» 11ЖБ	»	—	—	Cb Str
» 11Э	»	—	—	Cb Str
» 12КП	»	—	—	—
<i>C. coli</i> 15Г	»	—	—	Str
<i>C. jejuni</i> 25К	»	—	—	Cb
» 3В	Окружающая среда	—	—	—
<i>C. coli</i> 4ГВ	»	1	6	Cb Km Str
» 9ГВ	»	—	—	—
<i>C. jejuni</i> 157	»	1	50—70	Er Cb Str Tc
<i>C. coli</i> 4ГС	Свинья	—	—	Cb Str
» 602	Свинья (эталонный)	—	—	—

скорости передвижения в геле фрагментов исследуемой плазмидной ДНК, обработанной рестриктазами, и скорости миграции ДНК фага  $\lambda$ , обработанной тем же способом. На основании измерения фрагментов бактериофага  $\lambda$  были построены калибровочные кривые и вычислены мм фрагментов исследуемых плазмид и полная масса ДНК плазмид штаммов кампилобактерий.

Для доказательства плазмидной природы антибиотикорезистентности штаммы кампилобактерий, содержащие плазмиды, обрабатывали 0,1; 0,3; 0,5 %-м раствором бромистого этидия. Из пробирок с полужидким мясо-пептонно-печочным агаром (МППА), отличающихся наибольшим количеством бромистого этидия, где наблюдался рост кампилобактерий, материал высевали на селективную твердую питательную среду для получения отдельных колоний. После 48 ч инкубации при 42 °С в микроаэрофильных условиях отбирали 100 клонов каждого обработанного бромистым этидием штамма и определяли антибиотикочувствительность. Клоны, утратившие один или несколько признаков, проверяли на потерю плазмид.

Результаты исследований подвергали статистической обработке общепринятыми методами вариационной статистики [7].

**Результаты и обсуждение.** Анализ антибиотикограмм выделенных штаммов кампилобактерий показал, что шесть из них (15,8 %) обладали множественной лекарственной устойчивостью (к трем и более антибиотикам). Учитывая, что последняя, как правило [1, 2], контролируется внехромосомными факторами, целесообразно было изучить плазмидный профиль ДНК исследуемых штаммов кампилобактерий. Это могло бы служить дополнительным критерием в определении их эпидемической опасности.

Характеристика плазмидного состава штаммов кампилобактерий, выделенных из различных источников, приведена в таблице. Как показывают полученные данные, у 7 из 38 исследованных культур (18,4 %) обнаружены плазмиды, причем шесть штаммов содержали по одной плазмиде, а штамм *S. jejuni* 10П — две плазмиды. На рис. 1 представлен профиль плазмидной ДНК штаммов *S. jejuni* 10П; 71Д; 73Д.

Найдено сходство мм плазмид у разных штаммов. Так, штаммы *S. jejuni* 157; 10П; 71Д; 360Д и *S. coli* 73Д содержали плазмидную ДНК с мм (40—60) · 10<sup>6</sup>. Следует отметить, что у трех изученных штаммов (*S. jejuni* 10П; 462Д и *S. coli* 4ГВ) выявлена плаزمида малой мм (1,5—6) · 10<sup>6</sup>. На рис. 2 приведен плазмидный профиль ДНК изолятов штаммов *S. coli* и *S. jejuni*. Как видно из дорожки 2, штамм *S. coli* 4ГВ включает плазмиду мм 6 · 10<sup>6</sup>. Полосы ДНК, мигрирующие в области 2,7 · 10<sup>6</sup> и 20 · 10<sup>6</sup> представляют собой, скорее всего, суперскрученную и конкатамерную (или релаксированную) форму этой плазмиды. Штамм *S. jejuni* 462Д (дорожка 4) содержит плазмиду мм 2,7 · 10<sup>6</sup>; полоса ДНК в области 1,5 · 10<sup>6</sup> соответствует, по-видимому, суперскрученной форме этой же плазмиды.

Нами не выявлено корреляции между наличием плазмид в штаммах бактерий рода *Campylobacter* и их происхождением — плазмиды обнаружены как в штаммах, выделенных из клинического материала (*S. jejuni* 71Д; 360; 462Д; и *S. coli* 73Д), сельскохозяйственной птицы (*S. jejuni* 10П), так и из объектов окружающей среды (*S. coli* 4ГВ; *S. jejuni* 157). Плазмиды также выявляли у разных видов кампилобактерий — *S. jejuni* и *S. coli*.

Обработка бромистым этидием вызывала изменение фенотипических свойств плазмидосодержащих штаммов. Так, у штаммов *S. jejuni* 10П; 71Д; 157, 360Д и *S. coli* 73Д после элиминации плазмид мм (40—70) · 10<sup>6</sup> утрачивалась устойчивость к тетрациклину и эритромицину. Удаление плазмид мм (1,5—6) · 10<sup>6</sup> у штаммов *S. jejuni* 10П, 462Д и *S. coli* 4ГВ приводило к потере резистентности к канамицину. Устойчивость к этим антибиотикам обусловлена, вероятно, широким применением их в клинической практике и использованием этих препаратов в птицеводстве в качестве стимуляторов роста.

Таким образом, установлен плазмидный характер множественной лекарственной устойчивости кампилобактерий, что может послужить дополнительным критерием эпидемической опасности штаммов. Проведение дальнейших исследований в данном направлении предоставит возможность использования генетических маркеров плазмид в качестве эпидемиологической «метки» возбудителя, что могло бы оказать существенную помощь в выявлении основных источников инфекции и

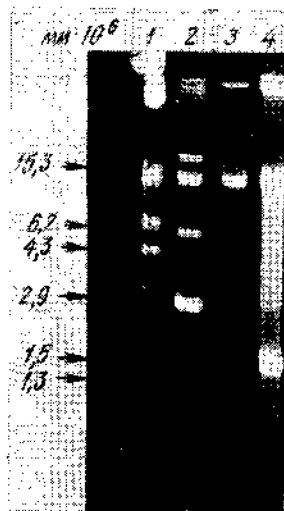
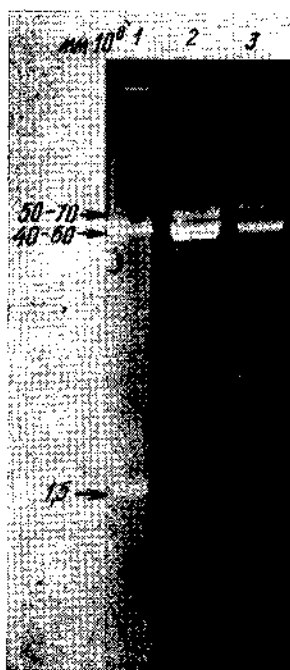


Рис. 1. Профиль плазмидной ДНК штаммов *C. jejuni*: 1 — 10П с плазмидами размерами  $1.5 \cdot 10^6$  и  $(40-60) \cdot 10^6$ ; 2 — 71Д с плазмидой  $(50-70) \cdot 10^6$ ; 3 — 73Д с плазмидой  $(50-70) \cdot 10^6$

Рис. 2. Профиль плазмидной ДНК штаммов: 2 — *C. coli* 4ГВ с плазмидой  $6 \cdot 10^6$ ; 3 — *C. coli* 15Г без плазмиды; 4 — *C. jejuni* 462Д с плазмидой  $3 \cdot 10^6$ ; 1 — реперная ДНК рестрикционных фрагментов фага  $\lambda$ /HindIII

факторов ее распространения при кампилобактериозе. Также представляет интерес выявление возможной корреляции между антибиотикоустойчивостью, ее природой и вирулентностью штаммов кампилобактерий разного происхождения.

В заключение можно сделать следующие выводы.

1. Семь из 38 штаммов бактерий рода *Campylobacter* (18,4%), выделенных из различных источников, содержат 1—2 плазмиды.

2. Наличие плазмид молекулярной массы порядка  $(1,5-6) \cdot 10^6$  определяло устойчивость штаммов к канамицину, а  $(40-70) \cdot 10^6$  — к тетрациклину и эритромицину.

3. Обнаруженные штаммы и плазмиды с различными свойствами могут служить объектами генетического анализа.

4. Изучение некоторых генетических характеристик плазмид свидетельствует в пользу гетерогенности культур, выделенных из различных источников, что может быть использовано при установлении экологических связей между микроорганизмами и для эпидемиологических целей.

ВИВЧЕННЯ ХРОМОСОМНО-ПЛАЗМІДНОГО  
ДЕТЕРМІНУВАННЯ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ  
У ШТАМІВ БАКТЕРІЙ РОДУ *CAMPYLOBACTER*

Резюме

Представлено дослідження хромосомно-плазмідного детермінування ознак антибіотикорезистентності у штамів кампілобактерій, виділених з різних джерел. Аналіз антибіотикограм штамів кампілобактерій показав, що 12 з них (31,6 %) була притаманна множинна стійкість до антибіотиків. Встановлено наявність плазмід, детермінуючих антибіотикорезистентність у 7 з 38 вивчених культур (18,4 %). Обробка бромистим етидієм викликала зміну фенотипових властивостей плазмідомісних штамів. Після елімінації плазмід молекулярною масою (мм)  $\sim (40-70) \cdot 10^6$  втрачалась резистентність штамів до тетрацикліну і еритроміцину, а плазмід мм  $\sim (1,5-6) \cdot 10^6$  — до канаміцину. Плазмідний характер множинної резистентності кампілобактерій може бути додатковим критерієм епідемічної небезпеки штамів.

D. L. Kirik, E. E. Shablovskaya, L. N. Buryanovsky, N. M. Krolevetskaya, V. I. Kikot

STUDY OF CHROMOSOME-PLASMIDIC DETERMINATION  
OF ANTIBIOTIC-RESISTANCE IN STRAINS OF *CAMPYLOBACTER* GENUS

Summary

Investigations on studying of chromosome-plasmidic determination characteristics of antibiotic-resistance in strains of *Campylobacter* isolated from different sources are presented. An analysis of antibiograms isolated *Campylobacter* strains has showed that 12 from them (31,6 %) possessed a great number of medical resistance. A plasmid presence of determined antibiotic-resistance in 7 from 38 examined cultures (18,4 %) was set up.

The treatment with ethidium bromide was being conducted to change of phenotypical properties of plasmid-containing strains. After elimination of plasmids (MW is approximately 40—70 MD) the strains resistance to tetracycline and erythromycin have been lost but a mowing of plasmids MM approximately 1,5—6 MD—kanamycine. Plasmid character of a great number of *Campylobacter* resistance can be editorial criteria of epidemic strain's danger.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Taylor D. E., Garner R. S., Allan B. J. Characterization of tetracycline resistance plasmids from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* // *Antimicrob. Agents Chemother.*—1983.—24.—P. 930—935.
2. Taylor D. E., Gan W., Noy L.-K. et al. Genetic characterization of kanamycin resistance in *Campylobacter coli* // *Annu. Inst. Pasteur. Microbiol.*—1988.—139.—P. 665—676.
3. Tenover F. C., Gilbert T., O'Hara P. Nucleotide sequence of a novel kanamycin resistance gene, *aphA-7*, from *Campylobacter jejuni* and comparison with other kanamycin phosphotransferase genes // *Plasmid.*—1989.—22.—P. 52—58.
4. Султанов Г. В., Черкасский Б. Л., Навашина С. М. и др. Новая среда для диагностики кампилобактериозов // Особо опасные инфекции на Кавказе: Тез. докл. шестой краевой науч. конф.—Ставрополь, 1987.—С. 276—278.
5. Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков.—М., 1983.—16 с.
6. Маннатис Ф., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—334 с.
7. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях.—М.: Медицина, 1962.—180 с.

НИИ эпидемиологии и инфекц. болезней Киев

Получено 19.07.94