

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Саратовский национальный исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского»**

АЛЬ БАЯТИ БАСИМ МОХАММАД ИБРАХИМ

АДАПТИВНЫЕ СВОЙСТВА УРОПАТОГЕННЫХ *ESCHERICHIA COLI*

Специальность 03.02.03 – микробиология

**Диссертация
на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:
Глинская Елена Владимировна,
кандидат биологических наук**

Саратов – 2017

ИМП

- Второе место по распространенности среди заболеваний человека.
- Диагностируются у людей обоих полов самого разного возраста, хотя чаще они встречаются у женщин.
- Возраст, пол, сексуальная активность, период менопаузы, беременность и медицинские осложнения.
- Чаще всего имеют бактериальную этиологию.
- *Escherichia coli*.

Цель исследования

- Изучить антибиотикорезистентность, адгезивную и пленкообразующую активности уропатогенных *Escherichia coli*.

Задачи исследования

1. Изучить видовой состав возбудителей, выделенных от больных с признаками ИМП, определить преобладающие виды и провести анализ частоты встречаемости возбудителей заболеваний в зависимости от пола и возраста пациентов.
2. Определить спектр чувствительности клинических штаммов условно-патогенных бактерий к антимикробным препаратам и наличие бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) у клинических штаммов *E. coli* фенотипическим методом.
3. Выявить корреляцию установленной фенотипическими методами устойчивости к бета-лактамам и аминоглизидным антибиотикам уропатогенных *E. coli* с наличием генетических детерминант: плазмидных генов *ctx-m* и *aac(3)-II*.
4. Изучить влияние наличия гена *fimH* на адгезивные свойства и пленкообразующую способность клинических штаммов *E. coli*.
5. Исследовать структурные особенности моделей микробных биопленок *E. coli*, сформированных на поверхности изделий медицинского назначения в условиях *in vitro*, штаммами, отличающимися по наличию гена *fimH*.

Основные положения, выносимые на защиту

1. *E. coli* являются преобладающими уропатогенами с наибольшим количеством изолятов.
2. Выделенные клинические штаммы возбудителей ИМП характеризуются множественной антибиотико-резистентностью.
3. Формирование устойчивости клинических штаммов *E. coli* к β -лактамам и аминогликозидным антибиотикам связано с наличием гена *ctx-m*, кодирующего синтез БЛРС и гена *aac(3)-II*, кодирующего аминогликозид-модифицирующие ферменты.
4. Наличие гена вирулентности *fimH* обуславливает высокую адгезивную активность клинических штаммов *E. coli*, а также обеспечивает активное формирование микробных биопленок на поверхности изделий медицинского назначения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные исследования в период с 2013 по 2016 гг. выполнены:

- На кафедре микробиологии и физиологии растений Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского;
- На базе лаборатории молекулярной биологии Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского;
- На кафедре экологии Саратовского государственного технического университета имени Ю.А. Гагарина;
- На базе научной биологической лаборатории и НОЦ «Промышленная экология» Саратовского государственного технического университета имени Ю.А. Гагарина
- На кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Саратовского государственного медицинского университета имени В.И. Разумовского.

Таблица 1 – Объекты исследования

Штаммы	Количество	Дата выделения
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	-
<i>Escherichia coli</i>	111	2014
<i>Klebsiella</i> spp.	8	2015
<i>Klebsiella oxytoca</i>	12	2014
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	2015
<i>Enterobacter</i> spp.	3	2014
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	2015
<i>Enterobacter aerogenes</i>	15	2014
<i>Proteus</i> spp.	5	2015
<i>Proteus vulgaris</i>	5	2014
<i>Proteus mirabilis</i>	10	2015
<i>Pseudomonas</i> spp.	2	2014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	2015
<i>Morganella morganii</i>	3	2014
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	2015
Итого	200	2014 – 2015 гг.

Таблица 2 – Перечень использованных антимикробных препаратов

№	Антибиотик (Mast Diagnostics, Великобритания)	Код	Концентрация мкг/диск	У	ПЧ	Ч
1	Амикацин	AK	30	≤ 14	15-16	≥ 17
2	Ампициллин	AMP	10	≤ 13	14-16	≥ 17
3	Амоксиклав*	AMC	30	≤ 13	14-17	≥ 18
4	Цефотаксим	CTX	30	≤ 22	23-25	≥ 26
5	Цефокситин	FX	30	≤ 14	15-17	≥ 18
6	Цефтазидим	CAZ	30	≤ 17	18-20	≥ 21
7	Цефтриаксон	CRO	30	≤ 19	20-22	≥ 23
8	Ципрофлоксацин	CIP	5	≤ 15	16-20	≥ 21
9	Гентамицин	GM	10	≤ 12	13-14	≥ 15
10	Имипенем	IPM	≤ 19	20-22	≥ 23	≤ 19
11	Налидиксовая кислота	NA	≤ 13	14-18	≥ 19	≤ 13
12	Нитрофурантион	F	≤ 14	15-16	≥ 17	≤ 14
13	Пиперациллин	PIP	≤ 17	18-20	≥ 21	≤ 17
14	Тобрамицин	TOB	≤ 12	13-14	≥ 15	≤ 12
15	Сульфаметоксазол-триметоприм	SXT	≤ 10	11-15	≥ 16	≤ 10

У=устойчив; ПЧ=промежуточная чувствительность; Ч=чувствителен; *Амоксиклав=амоксициллин-клавулановая кислота.

Таблица 3 – Характеристика ПЦР-праймеров для выявления генов *ctx-m*, *aac(3)-II* и *fimH* уропатогенных кишечных палочек

Праймер		Последовательность праймеров (5'–3')	Размер продукта (ПН*)
CTX-M	Прямой	ЦГЦТТТГЦГАТГТГЦАГ	590
	Обратный	АЦЦГЦГАТАТЦГТТГГТ	
FimH	Прямой	ЦТГ АТГ ГГЦ ТГГ ТЦГ ГТА ААТ	446
	Обратный	ТГЦ АЦА ТТЦ ЦЦТ ГЦА ГТЦ А	
AAC(3)-II	Прямой	ЦАААЦГАТГГГТГАЦГТАТГ	212
	Обратный	ЦГТЦГААЦАГГТАГЦАЦТГА	

*ПН = Пар нуклеотидов.

Таблица 4 – Этапы амплификации с помощью ПЦР для определения генетических маркеров

Стадия		Шаг	Температура	Время	Число циклов
Первая		Начало денатурации	95°C	5 мин	1
Вторая	I	Денатурация	94°C	60 с	30
	II	Специфическое ренатурирование	55°C	30 с	
	III	Удлинение цепи	72°C	60 с	
Третья		Окончание удлинения	72°C	5 мин	1

Определение адгезивной способности

Метод В. И. Брилис и соавт. (1986) и С. С. Гизатулиной и соавт. (1991).

- 0,5 мл взвеси исследуемых бактерий в концентрации 10 млрд. м.к./мл.
- суспензия эритроцитов человека 0(I) Rh⁺ группы крови в концентрации 100 млн. кл/мл.
- инкубация при встряхивании на шейкере при температуре 37°C в течение 30 минут.
- мазки фиксировали смесью Никифорова, окрашивали по методу Грама и исследовали в иммерсионной системе микроскопа.

Формирование микробных биопленок

Процесс моделировали в условиях *in vitro* в лунках иммунологических планшетов (Тец В. В., 2006).

- Суспензия суточных культур бактерий в физиологическом растворе по стандарту мутности 0,5 по МакФарланду.
- В лунки планшета вносили по 200 мкл мясо-пептонного бульона и суспензии микроорганизмов с концентрацией микробных клеток 100 тыс. КОЕ/мл.
- Инкубировали в течение 24 часов при температуре 37°C.
- Планктонные формы бактерий удаляли, лунки троекратно промывали физиологическим раствором и вносили на 10 минут 1%-ый водный раствор красителя кристаллического фиолетового.
- Лунки отмывали, связавшийся с биопленками краситель растворяли в ацетон-этиловой смеси.
- Количественный учет пленкообразования штаммами исследуемых микроорганизмов оценивали на спектрофотометре для микропланшет Epoch (Биотек, США) по величине связывания ими кристаллического фиолетового (ед. ОП).
- Исследование динамики формирования микробных биопленок в условиях *in vitro* проводилась в течение 96 часов.

Электронная микроскопия

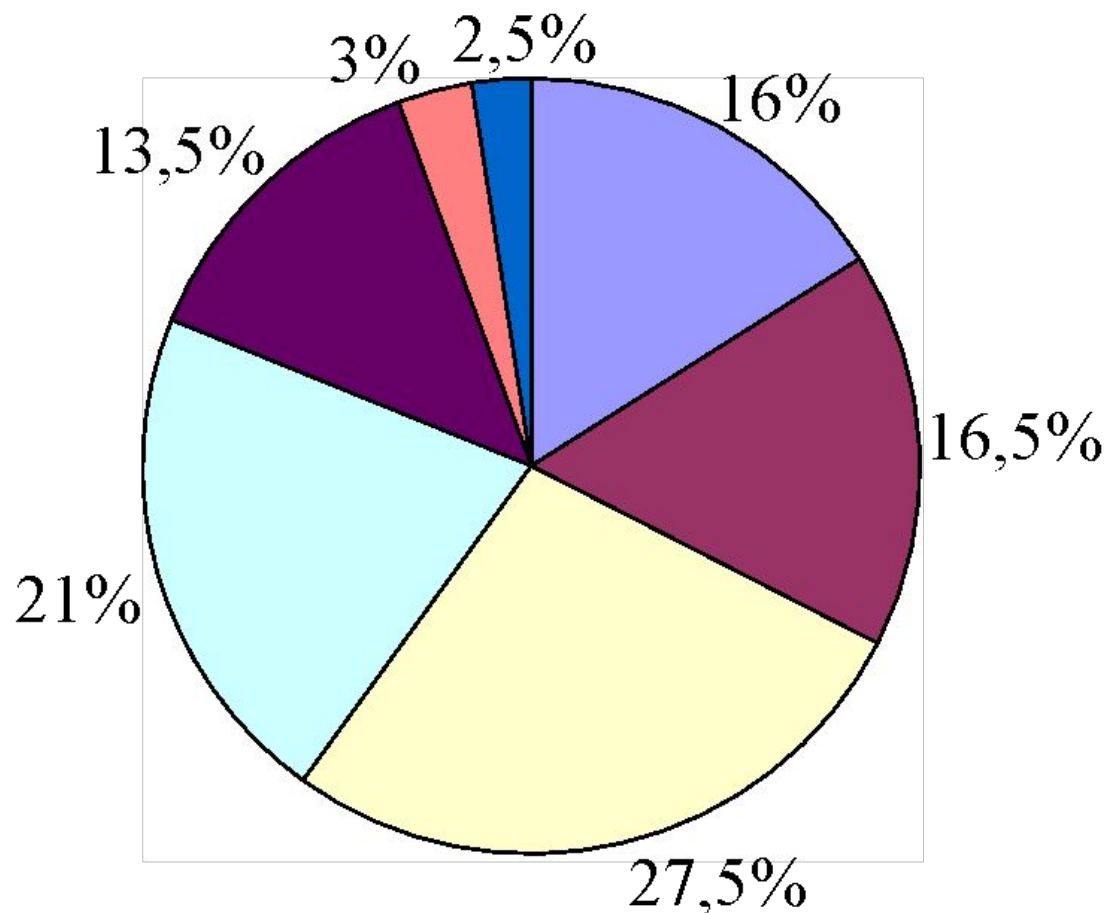
Использовали электронный микроскоп Asprex Explorer.

- Микроскопию проводили при ускоряющем напряжении 20 kV, ток эмиссии – 50 μ A. Изображение получали во вторичных электронах.

Таблица 5 – Видовой состав микроорганизмов, выделенных от больных с признаками инфекций мочевыводящих путей

Возбудители	Количество штаммов	
	абс.	%
<i>Escherichia coli</i>	111	55,5
<i>Klebsiella</i> spp.	8	4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	12	6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	4
<i>Enterobacter</i> spp.	3	1,5
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	2,5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	15	7,5
<i>Proteus</i> spp.	5	2,5
<i>Proteus mirabilis</i>	10	5
<i>Proteus vulgaris</i>	5	2,5
<i>Pseudomonas</i> spp.	2	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10	5
<i>Morganella morganii</i>	3	1,5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	1,5
Итого	200	100

Рисунок 1 – Выявление возбудителей ИМП в разных возрастных группах



■ 6 - 16 лет ■ 17 - 26 лет ■ 27 - 36 лет ■ 37 - 46 лет
■ 47 - 56 лет ■ 57 - 66 лет ■ 67 - 76 лет

Рисунок 2 – Частота встречаемости инфекций мочевыводящих путей у мужчин и женщин

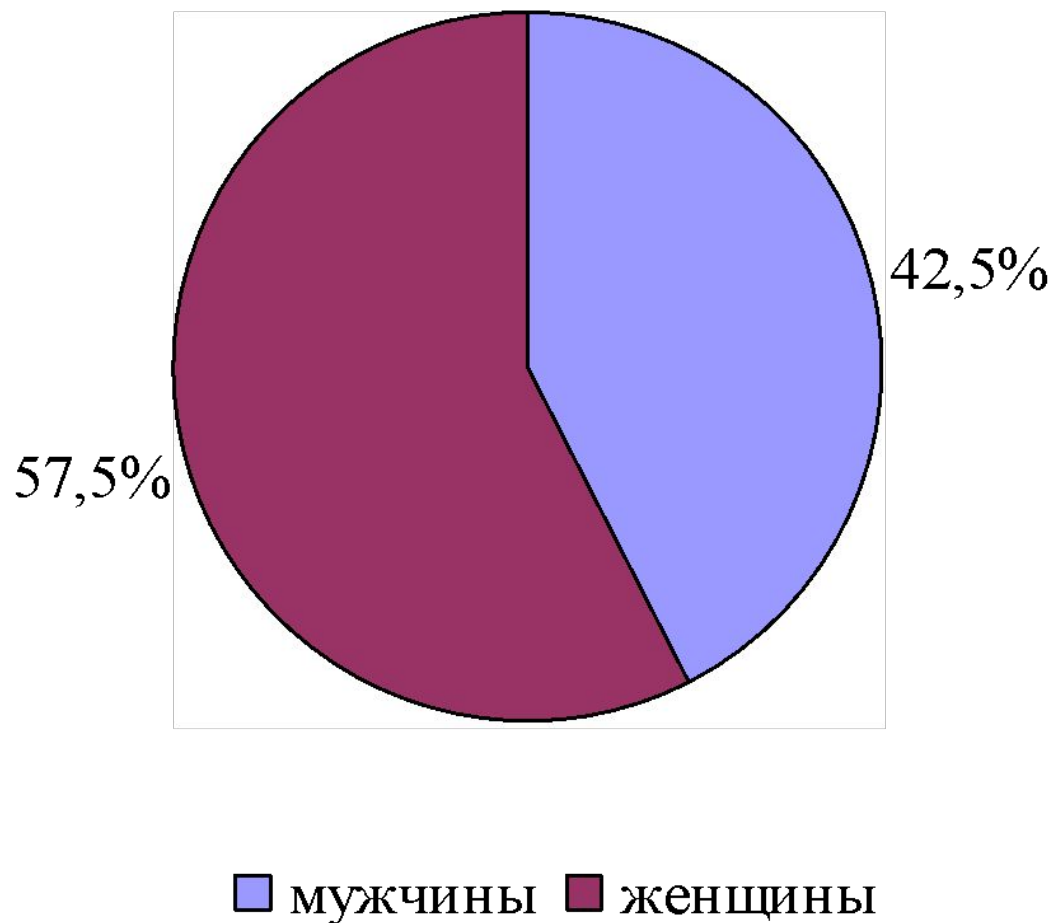


Рисунок 3 – Чувствительность условно-патогенных бактерий, выделенных при ИМП, к антимикробным препаратам

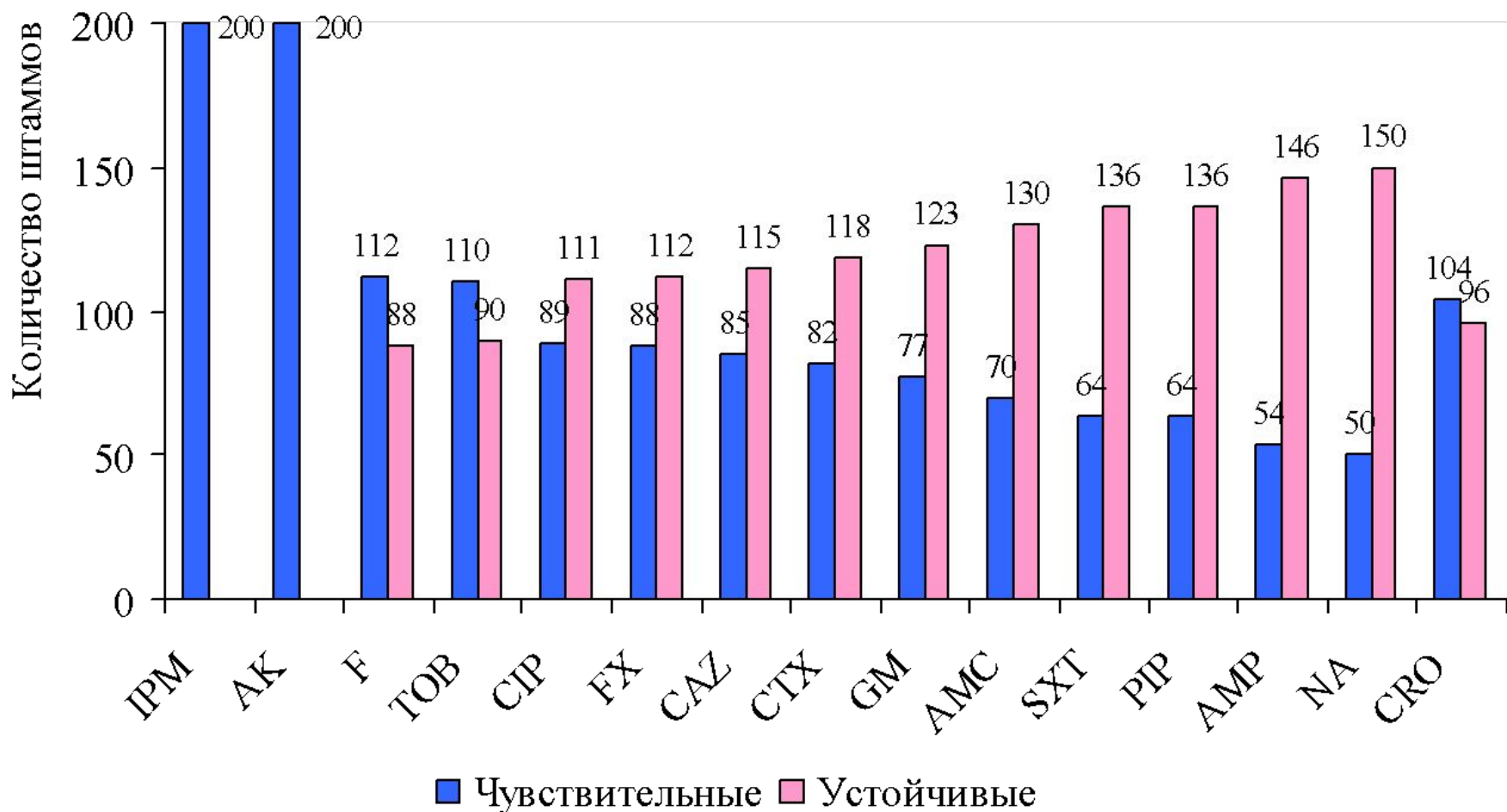


Таблица 6 - Показатели чувствительности выделенных условно-патогенных бактерий к антимикробным препаратам

№	Выделенные штаммы	Чувствительные		Устойчивые	
		абс.	%	абс.	%
1	<i>E. coli</i>	5*	33,3	10	66,7
2	<i>Klebsiella spp.</i>	4	26,7	11	73,3
3	<i>Enterobacter spp.</i>	8	53,3	7	46,7
4	<i>Proteus spp.</i>	4	26,7	11	73,3
5	<i>Morganella morganii</i>	8	53,3	7	46,7
6	<i>Pseudomonas spp.</i>	3	20,0	12	80,0
7	<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	13,3	13	86,7

* Количество антибиотиков, к которым чувствительны или устойчивы выделенные штаммы.

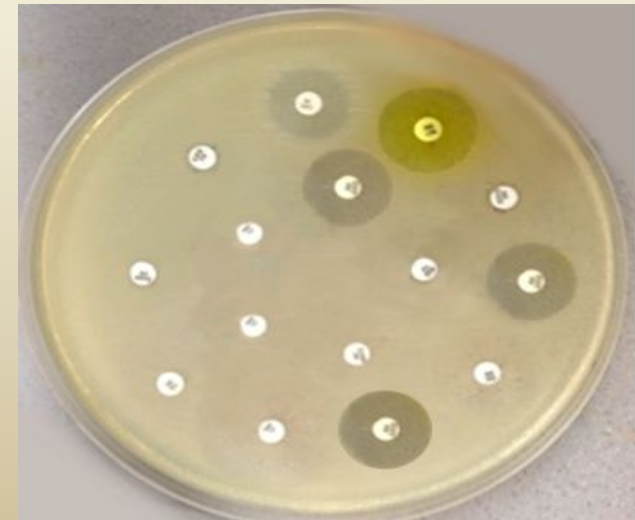


Таблица 7 – Частота индикации *E. coli*, продуцирующих БЛРС

Количество штаммов <i>E. coli</i> , абс. / %	Количество БЛРС продуцирующих штаммов <i>E. coli</i> , абс. / %	
	Первоначальный скрининг	Фенотипический подтверждающий тест
111 / 100	65 / 58,5	57 / 51,4

БЛРС

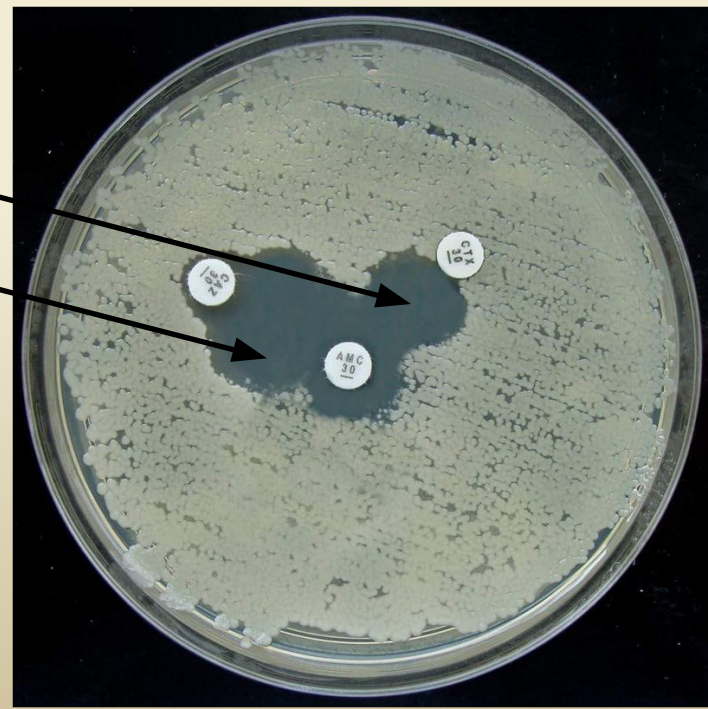


Рисунок 4 - Результаты определения гена устойчивости *ctx-m* у штаммов *E. coli*

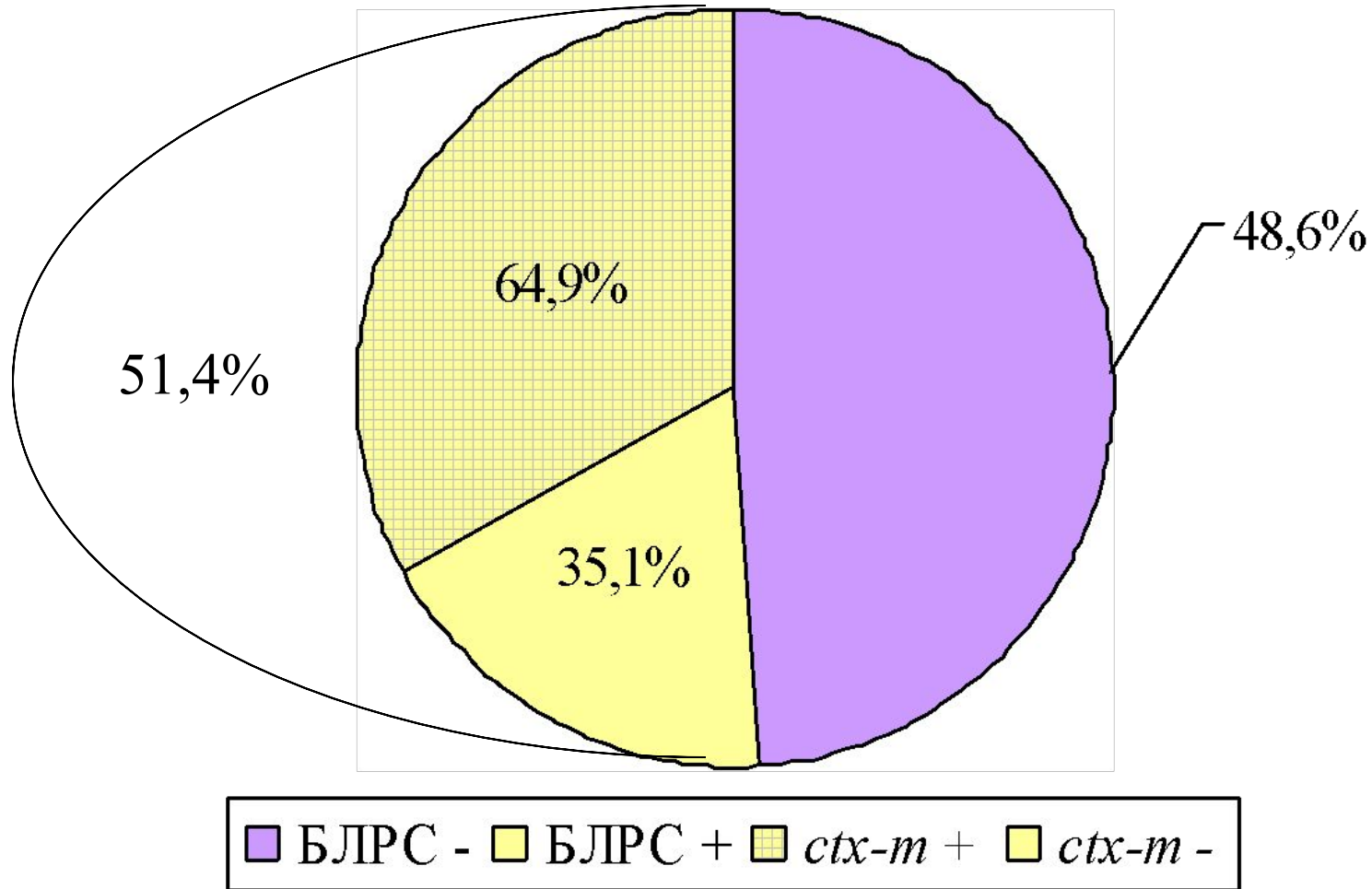


Рисунок 5 - Результаты ПЦР-анализа образцов ДНК штаммов *E. coli* на наличие гена *ctx-m*

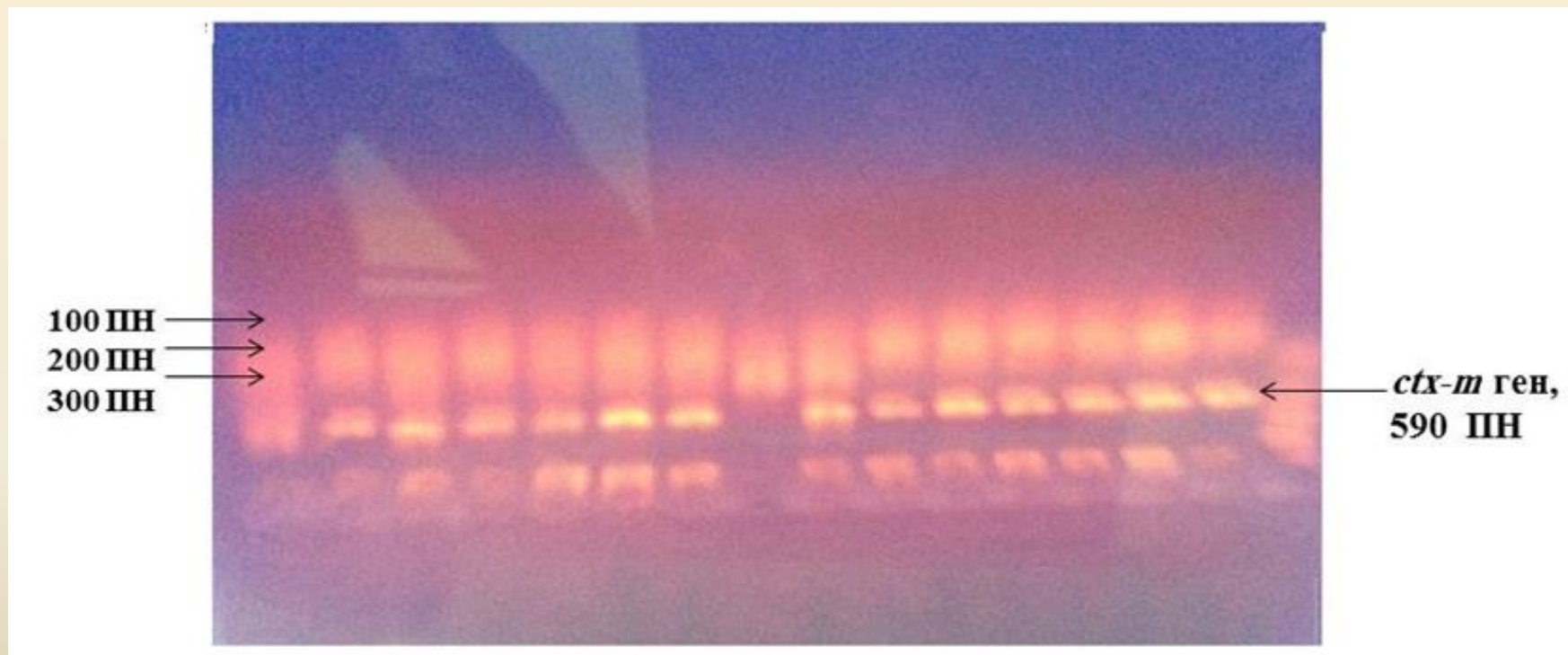


Рисунок 6 - Результаты определения гена устойчивости *aac(3)-II* у штаммов *E. coli*

1. Штаммы *E. coli*, чувствительные к ТОВ и GM.
2. Штаммы *E. coli*, устойчивые к ТОВ и GM.
3. Штаммы *E. coli*, имеющие ген *aac(3)-II*

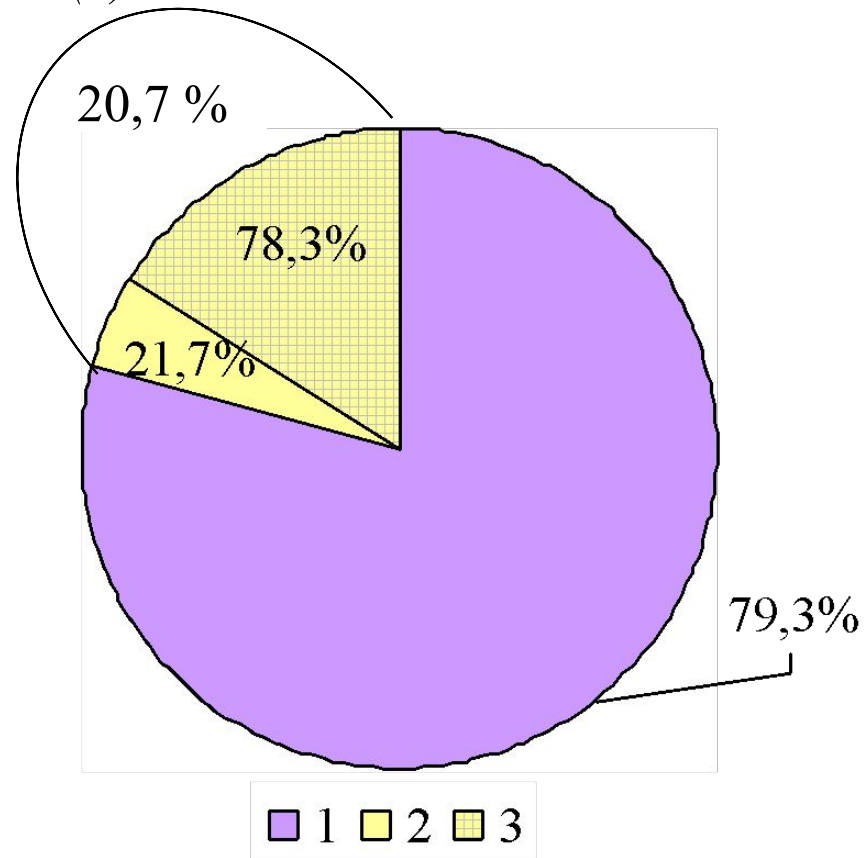


Рисунок 7 - Результаты ПЦР-анализа образцов ДНК штаммов *E. coli* на наличие гена *aac(3)-II*

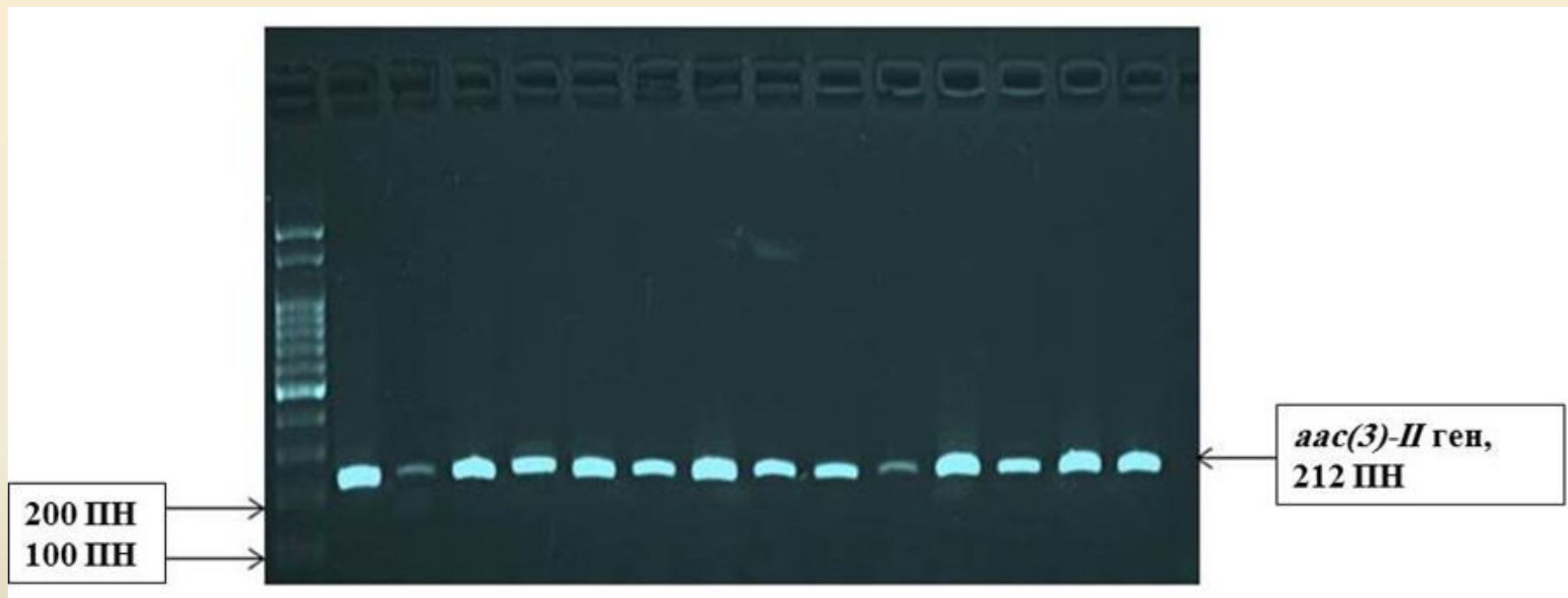


Рисунок 8 - Результаты определения гена *fimH* у штаммов *E. coli*

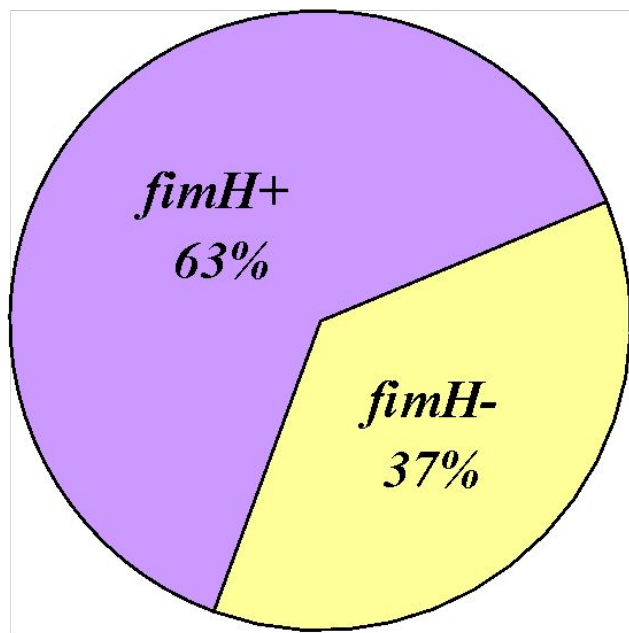


Рисунок 9 -Результаты ПЦР-анализа образцов ДНК штаммов *E. coli* на наличие гена *fimH*

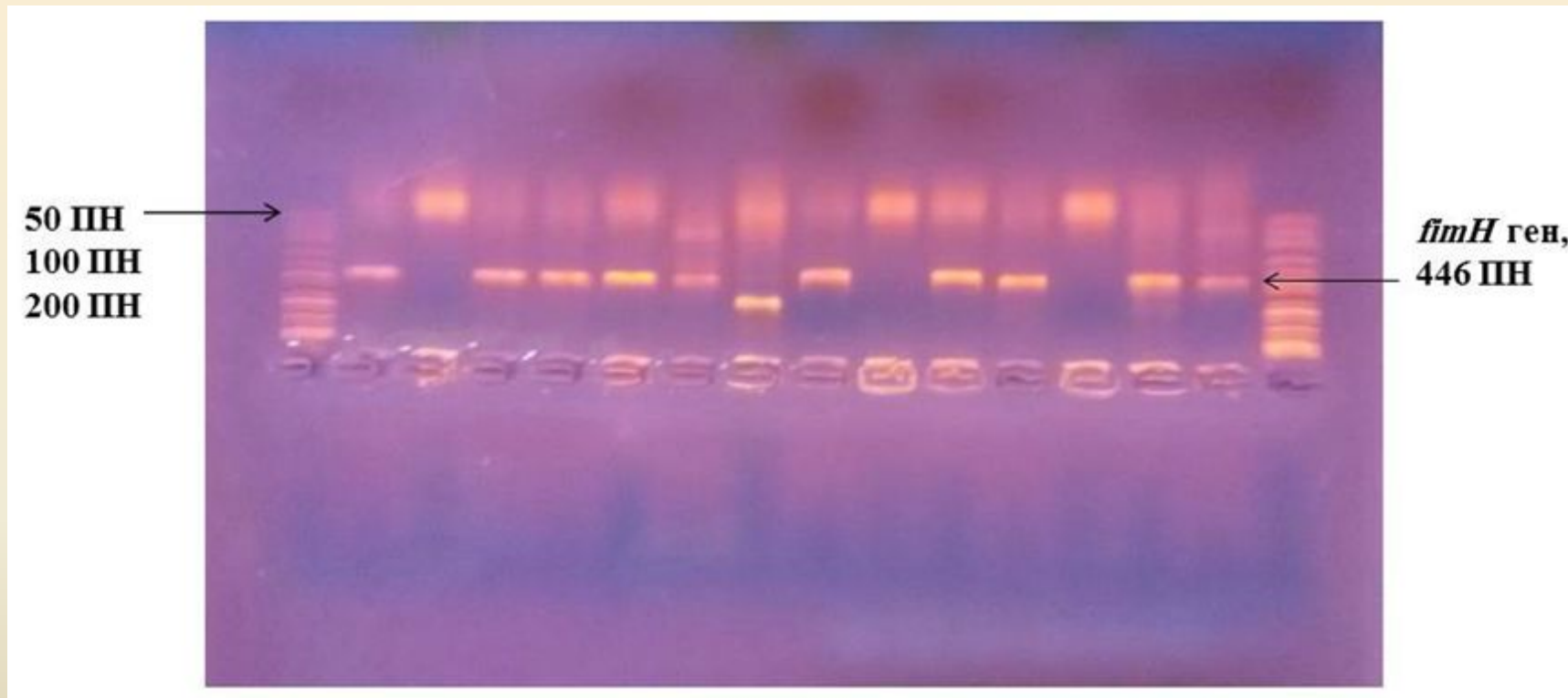


Таблица 8 – Значения индекса адгезии микроорганизмов стандартного и клинических штаммов исследуемых бактерий

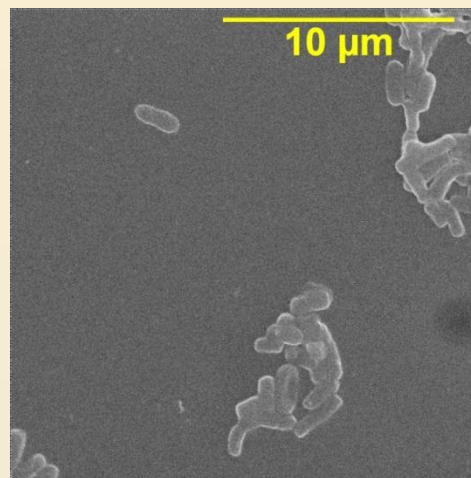
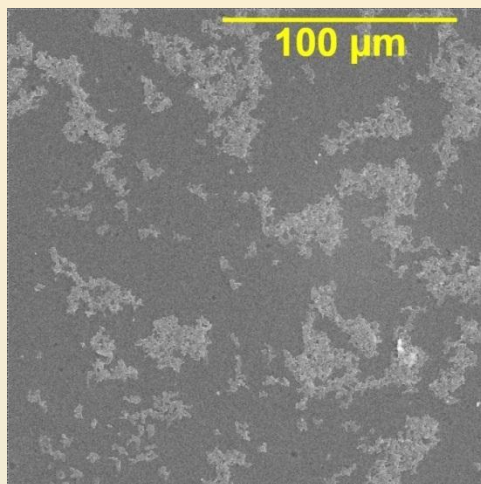
Штаммы микроорганизмов	Значения ИАМ
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,1±0,34
<i>E. coli</i> № 3 <i>fimH</i> -	2,8±0,17
<i>E. coli</i> № 92 <i>fimH</i> +	7,22±0,54

Таблица 9 – Динамика величин связывания кристаллического фиолетового микробными биопленками, образованными стандартным и клиническим штаммами *E. coli*

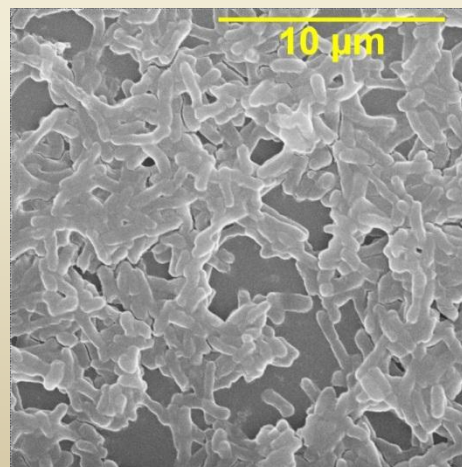
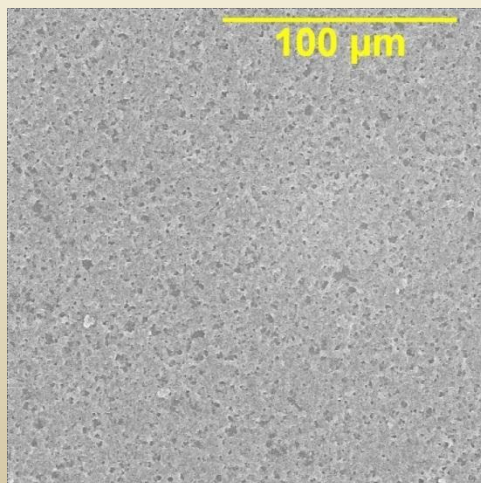
Штаммы микроорганизмов	Динамика величин связывания кристаллического фиолетового микробными биопленками, ед. ОП				
	Контроль	Сутки			
		1-е	2-е	3-и	4-е
<i>E. coli</i> АТСС 25922	0,038±0,001	0,334±0,014	0,467±0,018	0,982±0,044	0,763±0,034
<i>E. coli</i> № 3 (<i>fimH</i> -)	0,038±0,001	0,387±0,032	0,454±0,014	0,822±0,026	0,614±0,018
<i>E. coli</i> № 92 (<i>fimH</i> +))	0,038±0,001	0,448±0,016	0,612±0,008	1,018±0,028	0,844±0,012

Рисунок 10 – Электронная микрофотография микробной биопленки клинических штаммов *E. coli*: А – *E. coli* № 3 (*fimH*-), Б – *E. coli* № 92 (*fimH*+)

А



Б



ВЫВОДЫ

1. Из выделенных 200 штаммов бактерий-возбудителей ИМП 92,5% являлись представителями семейства Enterobacteriaceae, из которых 55,5% были уропатогенные *E. coli*, 14% *Klebsiella* spp., 11,5% *Enterobacter* spp., 10% *Proteus* spp. 1,5% *M. morganii*. Уропатогенные бактерии выделялись с большей частотой у возрастной группы 27-36 лет (27,5%), а ИМП регистрировались чаще у женщин (57,5%).

2. Большинство (59,3%) выделенных штаммов уропатогенных бактерий характеризовались высоким уровнем устойчивости к антибиотикам и антимикробным химиотерапевтическим препаратам, однако все были чувствительны к ИРМ и АК. Методом «двойных дисков» доказано наличие БЛРС у 51,4% клинических штаммов уропатогенных *E. coli*.

3. Оценка генетических детерминант устойчивости бактерий с использованием ПЦР позволила установить наличие гена *ctx-m* у 64,9% штаммов *E. coli*, для которых предварительно было установлено наличие БЛРС фенотипическим методом, и гена *aac(3)-II*, кодирующего ацетилтрансферазу, у 78,2% исследуемых штаммов уропатогенных *E. coli*, для которых была установлена устойчивость к ТОВ и GM.

ВЫВОДЫ

4. Доказано наличие гена *fimH*, детерминирующего синтез пилей-1 типа, у 70% штаммов уропатогенных *E. coli*. Впервые установлена взаимосвязь наличия данного гена с увеличением адгезивной активности уропатогенных *E. coli*, которые по показателям индекса адгезии микроорганизмов характеризовались как высокоадгезивные (от 4,28 до 7,22).

5. Наличие гена *fimH* обеспечивает уропатогенным *E. coli* более интенсивный процесс формирования микробных биопленок на инертных поверхностях лунок иммунологических планшетов и образцах полиуретановых уретральных катетеров по сравнению со стандартным штаммом *E. coli* ATCC 25922 и клиническими штаммами, не имеющими данного гена.

Спасибо за внимание

