

Хамидуллина Р. Г., Гимадулдинов О. А.

**РАЗЛИЧНАЯ ПРИРОДА МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ
КЛЕТОКСЕРАТИА MARCESCENS И ESCHERICHIA COLI**

Адрес статьи: www.gramota.net/materials/1/2008/5/59.html

Статья опубликована в авторской редакции и отражает точку зрения автора(ов) по рассматриваемому вопросу.

Источник

Альманах современной науки и образования

Тамбов: Грамота, 2008. № 5 (12). С. 133-135. ISSN 1993-5552.

Адрес журнала: www.gramota.net/editions/1.html

Содержание данного номера журнала: www.gramota.net/materials/1/2008/5/

© Издательство "Грамота"

Информация о возможности публикации статей в журнале размещена на Интернет сайте издательства: www.gramota.net

Вопросы, связанные с публикациями научных материалов, редакция просит направлять на адрес: almanac@gramota.net

РАЗЛИЧНАЯ ПРИРОДА МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК *SERRATIA MARCESCENS* И *ESCHERICHIA COLI*

Хамидуллина Р. Г., Гимадулдинов О. А.
Казанский государственный университет

Одной из важнейших проблем современной медицинской микробиологии является лекарственная устойчивость бактерий, обусловленная как генами бактериальной хромосомы, так и конъюгативными (трансмиссивными), так и неконъюгативными (нетрансмиссивными) плазмидами. Конъюгативные плазмиды лекарственной резистентности (R- плазмиды) представляют собой коинтеграты, составленные фактором генетического переноса (RTF) и детерминантами резистентности (r), тогда как неконъюгативные плазмиды этого типа в большинстве своем являются нетрансмиссивными детерминантами r, лишенными генетического переноса. Между тем бактерии отдельных видов могут содержать либо только фактор переноса, либо фактор переноса и детерминанты резистентности, сосуществующие в одной и той же бактериальной клетке раздельно и ведущие себя как независимые генетические структуры [Пехов А. П. 1986: 15].

Целью настоящей работы явилось выявление природы множественной лекарственной устойчивости клеток штамма *Serratia marcescens* 9986 и *Escherichia coli* 108, выделенных из разных источников.

Как известно, многие штаммы *Serratia marcescens*, выделенные из природных источников, больных людей и животных, содержат R-плазмиды, которые в основном являются трансмиссивными и имеют достаточно большие молекулярные массы. В ряде случаев были идентифицированы плазмиды, определяющие устойчивость одновременно к 14 антибиотикам [Mendoza et al, 1983: 7; Sleight J. D. 1984: 1651-1653]. Однако устойчивость к антибиотикам может быть обусловлена и хромосомными генами.

Клетки штамма *Serratia marcescens* 9986, выделенного из природных источников, оказались устойчивыми к ряду антибиотиков: к эритромицину - 100 мкг/мл, рифампицину - 75 мкг/мл, хлорамфениколу - 50 мкг/мл, ампициллину - 25 мкг/мл, тетрациклину и стрептомицину 15 мкг/мл (за уровень устойчивости принимали минимальную концентрацию антибиотика, при которой наблюдается 90 % выживаемости бактериальных клеток). Мы предположили, что перечисленная выше антибиотикоустойчивость может быть обусловлена как хромосомными, так и плазмидными генами.

Попытки выделить плазмидную ДНК не дали положительных результатов. Это может быть связано как с отсутствием плазмид в исследуемых клетках, так и с тем, что клетки *Serratia marcescens* конститутивно синтезируют эндонуклеазу, которая затрудняет выделение плазмидной ДНК.

Как известно, обработка клеток агентами, такими как акридиновый оранжевый, этидиум-бромид, митомицин С и другие приводит к элиминации (изгнанию) плазмид из обработанных клеток. Эффективным элиминирующим агентом также является и додецилсульфат натрия. Поэтому с целью выявления плазмид мы провели эксперименты по индуцированной элиминации. В качестве элиминирующего агента использовали этидиум-бромид в концентрации 200 мкг/мл, акридиновый оранжевый в концентрации 100 мкг/мл и додецилсульфат натрия в концентрации 5% и 10%. Выжившие после обработки элиминирующими агентами бактериальные клетки анализировали на "потерю" антибиотикоустойчивости. Оказалось, что практически все выжившие клетки сохранили маркеры резистентности к антибиотикам, при этом минимальные ингибирующие концентрации к антибиотикам остались на прежнем уровне. Эти результаты не дали однозначного ответа на вопрос о том, чем может быть обусловлена устойчивость: только хромосомными генами или хромосомными и плазмидными генами одновременно.

В дальнейшем мы провели эксперименты по конъюгационному переносу. Так как штамм *Serratia marcescens* 9986 обладает множественной устойчивостью к антибиотикам, нам не удалось подобрать подходящий реципиентный штамм из рода *Serratia* для осуществления селекции. Учитывая литературные данные о том, что возможен успешный обмен плазмидами между *Serratia* и *Escherichia coli* [Dubal-Iflahd Y. et al, 1980: 981], мы провели скрещивания между штаммами *Serratia marcescens* 9986 и *Escherichia coli* C600 Rif (50 мкг/мл), используя методику двух- и восемнадцатичасовой конъюгации. Селекцию трансконъюгантов вели отдельно по каждому маркеру антибиотикоустойчивости. Однако ни в одном из скрещиваний выявить трансконъюганты не удалось. Следовательно, если даже исследуемые клетки и содержат плазмиды, они не являются конъюгативными. Для проверки этого предположения мы провели «трехродительские» скрещивания с целью мобилизации неконъюгативных плазмид конъюгативными, используя в качестве мобилизующей плазмиду RP4. Как известно, эта плаزمид является конъюгативной, обладает мобилизующими свойствами и широким кругом хозяев. Однако ни в одном случае (и при использовании различных модификаций этих скрещиваний) мы не смогли выявить мобилизацию плазмид.

На основании полученных результатов мы можем сделать вывод о том, что исследуемый штамм *Serratia marcescens* 9986, по-видимому, не содержит R-плазмид, а множественная устойчивость к антибиотикам: эритромицину, рифампицину, хлорамфениколу, ампициллину, тетрациклину и стрептомицину, обусловлена хромосомными генами.

Исследуя природу лекарственной устойчивости штамма *Escherichia coli* 108, выделенного от больных животных, мы обнаружили, что клетки этого штамма устойчивы к следующим антибиотикам: к стрептомицину – 100 мкг/мл, ампициллину – 800 мкг/мл и сульфаниламиду (норсульфазолу) – 2000 мкг/мл.

Результаты выделения плазмидной ДНК с последующим электрофорезом указывали на присутствие в клетках исследуемого штамма одной или нескольких плазмид. Для установления только плазмидной или одновременно хромосомной и плазмидной природы устойчивости к лекарственным препаратам, мы провели эксперименты по элиминации, используя те же агенты, что и в опытах с *Serratia marcescens* 9986.

Оказалось, что обработка клеток штамма *Escherichia coli* 108 додецилсульфатом натрия в концентрациях 5% и 10%, одинаково приводила к почти полной потере (98%) маркера устойчивости к ампициллину (Ap), тогда как маркеры устойчивости к стрептомицину (Sm) и сульфаниламиду (Su) сохранялись. Аналогичные результаты были получены и при обработке клеток акридиновым оранжевым, с той лишь разницей, что частота элиминации маркера ампициллинустойчивости в этом случае была несколько ниже (76%). Частота элиминации маркеров устойчивости к стрептомицину и норсульфазолу равнялась 0,5%. При обработке клеток этидиум бромидом в концентрации 200 мкг/мл наблюдалась противоположная картина: потеря маркера устойчивости к стрептомицину и норсульфазолу составила 58% и 57% соответственно, а потеря маркера устойчивости к ампициллину - лишь 1%. Эти данные послужили первым доказательством того, что множественная устойчивость к лекарственным препаратам в клетках штамма *Escherichia coli* 108, обусловлена только плазмидными генами. Кроме того, разные частоты элиминации по отдельным маркерам позволили предположить, что в исследуемых бактериях, возможно, присутствует более одной плазмиды, поскольку использованные нами элиминирующие агенты по-разному действуют на конъюгативные и неконъюгативные плазмиды. Известно, что додецилсульфат натрия и акридиновый оранжевый эффективно «излечивают» бактерии от конъюгативных плазмид типа факторов переноса, но не эффективны в отношении неконъюгативных детерминантов лекарственной устойчивости. Этидим бромид, наоборот, хорошо элиминирует неконъюгативные детерминанты устойчивости к антибиотикам, а на конъюгативные плазмиды больших размеров влияния не оказывает.

В дальнейших экспериментах мы определяли принадлежность генов устойчивости к ампициллину, стрептомицину и норсульфазолу к одной или нескольким плазмидам. С этой целью мы проводили скрещивания исследуемого штамма с бесплазмидными штаммами с помощью двух- и восемнадцатичасовой конъюгации. В качестве реципиента использовали клетки штамма *Escherichia coli* C600Rif. Скрещивания проводили по стандартной методике. Конъюгационные смеси высевали на селективные среды, содержащие соответствующие антибиотики. В качестве контрселективного фактора в среду добавляли рифампицин в концентрации 50 мкг/мл.

Выросшие на селективных средах трансконъюганты проверяли на наличие неселективных маркеров. Результаты этих экспериментов представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Передача маркеров резистентности в реципиентные клетки

Конъюгация	Частота передачи селективных маркеров			Наследование неселективных маркеров (из 50 клонов)					
	Ap	Sm	Su	Ap		Sm		Su	
				Sm	Su	Ap	Su	Ap	Sm
2-х часовая	$2,5 \cdot 10^{-3}$	0	0	0	0	-	-	-	-
18-ти часовая	$7,8 \cdot 10^{-2}$	$2,7 \cdot 10^{-6}$	$2,8 \cdot 10^{-6}$	0	0	0	50	0	50

Как видно из данных, представленных в таблице, частота передачи маркера Ap достаточно высокая в обоих скрещиваниях, а трансконъюганты по маркерам Sm и Su появились лишь при восемнадцатичасовой конъюгации, причем с одинаковой частотой.

Это свидетельствует о том, что маркер Ap принадлежит конъюгативной плазмиде, а маркеры Sm и Su – неконъюгативной. Передача их в реципиентные клетки происходит благодаря мобилизации на перенос с помощью конъюгативной плазмиды.

Анализ трансконъюгантов по неселективным маркерам показал, что Ap- трансконъюганты не наследовали ни один из других маркеров. Трансконъюганты Sm наследовали только маркер Su и, наоборот, и ни один из них не наследовал маркер Ap, что указывает на сцепленный характер маркеров Sm и Su.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в клетках *Escherichia coli* 108 содержатся две плазмиды. Одна из них является конъюгативной, несет ген устойчивости к ампициллину и обладает мобилизационной способностью. Другая плазида является неконъюгативной, имеет маркеры устойчивости к стрептомицину и норсульфазолу и может переноситься в другие клетки благодаря конъюгативной плазмиде.

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод о различной природе лекарственной устойчивости клеток штаммов *Serratia marcescens* 9986 и *Escherichia coli* 108. Множественная устойчивость клеток штамма *Serratia marcescens* 9986 обусловлена хромосомными генами, тогда как клеток штамма *Escherichia coli* 108 – плазмидным комплексом, компоненты которого функционально различны.

- Пехов А. П. Плазмиды бактерий. - М.: Медицина, 1986. - 224 с.
- Dubal-Iflahd Y., Raiband P., Tancrede C., Rousseau M. R-Plasmid Transfer for Serratia Liquefaciens to Escherichia Coli in Vitro and in Vivo in The Digestive Tract of Gnotobiotic Mice Associated with Human Fecal Flora // Infection and Immunity. - 1986. - V. 28. - P. 981-990.
- Mendoza M. C., Mendez F. L., Llaneza J., Mayo B., Hardsson C. R-Plasmid Diversity in Clinical Isolates of Serratia Marcescens // Microbios Letters. - 1983. - V.22. - P. 7-17.
- Sleigh J. D. Antibiotic Resistance in Serratia Marcescens // Brit. Med. J. - 1984. - V.5. - P. 1651-1653.

ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ УПРАВЛЕНИЯ ФИЗИЧЕСКИМ СОСТОЯНИЕМ ЧЕЛОВЕКА

Хомяков Г. К.

Иркутский государственный университет путей сообщения

Рассмотрен вопрос организации первичного звена здравоохранения, управления состоянием здоровья человека, страдающего хроническим заболеванием легочной системы и определены этапы реабилитации при этой патологии.

Ключевые слова: хронический бронхит, реабилитация, управление качеством физического состояния.

Забайкалье отличается по климато-географическим особенностям к региону с резко континентальным климатом: продолжительность зимы составляет в среднем 161 день, весны – 41 день, лета – 117 дней, осени – 46 дней в году. Минимальная температура воздуха составляет зимой $-23\pm 0,6^{\circ}$, весной – $2,2\pm 0,5^{\circ}$, летом – $10,4\pm 0,4^{\circ}$, осенью – $1,5\pm 0,6^{\circ}$ при максимальной скорости ветра соответственно зимой $-13\pm 0,35$ м/сек, весной – $18,7\pm 0,7$ м/сек, летом – $17\pm 0,4$ м/сек, осенью – $14,8\pm 0,6$ м/сек.

Учитывая особенности технологического процесса лесопроизводства, при котором уровень механизации труда не превышал 39,3%, работу на открытом воздухе, санитарно-гигиенические условия труда: запыленность, загазованность, обуславливают высокий процент распространенности хронического бронхита (среди мужчин 8,9% и женщин 8,7%).

В этих условиях приоритетным направлением профилактики заболеваний бронхолегочной системы являются 2 основные группы мероприятий:

1. совершенствование социальных условий труда и быта работающих;
2. реабилитация всех работающих с учетом основных принципов раннего предупреждения, выявления этапности и приемственности лечебно-оздоровительных мероприятий.

Вышеперечисленные влияния наиболее часто формируют хронический бронхит (ХБ) и его разновидности: хронический необструктивный бронхит (ХНБ) и хронический обструктивный бронхит (ХОБ).

Под влиянием экзогенных и эндогенных особенностей из 2123 работающих на лесопромышленном комбинате Бурятии выявлено 4 группы «диспансерного наблюдения»:

- 1-я группа – практически здоровые – 1047 работающих (49,3%);
- 2-я группа – лица с угрозой формирования ХБ – 585 работающих (27,6%);
- 3-я группа – лица с предбронхитом – 299 человек (14,1%);
- 4-я группа – больные ХБ – 192 человека (9%).

Экономический ущерб по недоработанной продукции в результате болезни ХБ составил более 37 млн. руб. в год. Это обусловило необходимость создания алгоритмической схемы организации реабилитационного процесса работающих.

Управление процессом организации медицинского этапа реабилитации осуществляется по алгоритмической схеме, изображенной на рис. 1, где:

- A1 – диагностика и лечение в поликлинике;
- A2 – лечение в стационаре;
- A3 – лечение в реабилитационном отделении;
- A4 – лечение в профилактории;
- A5 – лечение в здравпункте;
- A6 – выход на рабочее место.

Рассмотрим четыре варианта реабилитации больных:

V1 – вариант: – реабилитационное отделение – профилакторий – здравпункт. По этому варианту проводится реабилитация больных, перенесших острые или обостренные формы заболеваний.

V2 – вариант: – производство – для профилактики здоровых, работающих в условиях производства с факторами риска.

V3 – вариант: – профилакторий – предусматривает реабилитацию лиц с предбронхитом, ХБ, нуждающихся в противорецидивном лечении или в период обострения.

$\alpha = 2$ – практически здоров, но работает в условиях производства с факторами риска (вариант