

На правах рукописи

АЛЬ БАЯТИ БАСИМ МОХАММАД ИБРАХИМ

АДАПТИВНЫЕ СВОЙСТВА УРОПАТОГЕННЫХ *ESCHERICHIA COLI*

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2017

Работа выполнена в ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» на кафедре микробиологии и физиологии растений.

- Научный руководитель:** **Глинская Елена Владимировна**, кандидат биологических наук, доцент ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», кафедра микробиологии и физиологии растений, доцент
- Официальные оппоненты:** **Щербаков Анатолий Анисимович**, доктор биологических наук, профессор ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», кафедра микробиологии, биотехнологии и химии, профессор кафедры **Дерябин Дмитрий Геннадьевич**, доктор медицинских наук, профессор ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий отделом лабораторной диагностики ИППП и дерматозов
- Ведущая организация:** ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет»

Защита диссертации состоится «25» октября 2017 года в 15 часов на заседании Совета по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 212.203.39 при Российском университете дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6 и на сайте dissovet.rudn.ru

Автореферат диссертации разослан « » 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент

О. Б. Гигани

Общая характеристика работы

Актуальность исследования. Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) занимают второе место по распространенности среди заболеваний мочевыделительной системы человека (Takhar, Moran, 2014). Данные заболевания диагностируются у людей обоих полов разного возраста, хотя чаще встречаются у женщин (Manning *et al.*, 2010). Ежегодно более 7 млн человек обращаются к специалистам с подозрениями на ИМП, более миллиона из них госпитализируют, а затраты на их лечение составляют примерно 3 млрд долларов (Naber *et al.*, 2009).

Инфекции мочевыводящих путей чаще всего имеют бактериальную этиологию (Al-Badr, Al-Shaikh, 2013; Brooks *et al.*, 2010). Ведущую роль в развитии ИМП играют представители семейства Enterobacteriaceae, а на долю *Escherichia coli* приходится почти 90% всех диагностированных случаев (Reza *et al.*, 2011). Бактерии *E. coli*, поражающие мочевыделительную систему, получили название уропатогенных *E. coli* (UPEC). В процессе эволюции эти бактерии приобрели целый ряд факторов, включая адгезины, токсины, сидерофоры и полисахаридные структуры клеточной стенки, которые обеспечивают их адаптацию к существованию в данном биотопе, а именно поддерживают и усиливают прикрепление к клеткам уроэпителия, повышая их устойчивость к действию лекарственных препаратов, иммунологических защитных механизмов (Гриценко и др., 1998; Yamamoto *et al.*, 2007; Farshad *et al.*, 2010; Sokurenko *et al.*, 2004; Thoureen *et al.*, 2015).

Важным параметром, описывающим активность бактерий – возбудителей ИМП, является резистентность к антимикробным препаратам (Erb *et al.*, 2007). Выработка патогенными бактериями, обитающими в мочевыводящей системе, резистентности к антимикробным препаратам – это проблема, с которой в последнее время все чаще сталкиваются во многих странах (CDER, 2015). Частично данное явление обусловлено обширным, чрезмерным, нецелевым или неправильным использованием антибиотиков (Johnson *et al.*, 2006). Согласно исследованиям европейских ученых, количество зафиксированных случаев резистентности к антибиотикам возрастает от года к году, при этом в последнее время появились сведения о существенном увеличении числа патогенных бактерии, устойчивых к действию нескольких наиболее распространенных антибиотиков, используемых для лечения ИМП (Barber *et al.*, 2013).

Еще одной стратегией бактерий, позволяющей им выживать в условиях макроорганизма, является их способность к формированию микробных биопленок, что и играет ключевую роль в патогенезе ИМП (Jabalameh *et al.*, 2012). Биопленочные формы бактерий характеризуются сниженной метаболической активностью и повышенной устойчивостью к действию антимикробных препаратов. Микробные биопленки могут формироваться как на поверхности клеток макроорганизма, так и на изделиях медицинского назначения, обуславливая тем самым длительную персистенцию возбудителя и развитие катетер–ассоциированных инфекций (Wilson *et al.*, 2011; Peter *et al.*, 2012).

Степень разработанности проблемы. Ведущая роль в развитии ИМП принадлежит условно-патогенным бактериям семейства Enterobacteriaceae (Gradwohl *et al.*, 2011; Mazzulli, 2012; Vasudevan, 2014; Edmonton, 2015; NICE, 2015).

В работах (Mladin *et al.*, 2009; Ramirez, Tolmasky, 2010; Tada *et al.*, 2013; Saad *et al.*, 2015; Praharaj *et al.*, 2016) приведены данные о наличии в геноме условно-патогенных бактерий генов, кодирующих устойчивость к антимикробным препаратам.

Значение факторов адгезии грамотрицательных бактерий для реализации начальных этапов взаимодействия с макроорганизмом, обеспечивающих развитие инфекционного процесса, представлено в работах (Далин, Фиш, 1985; Маянский, 2006; Mladin *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2011; Tarchouna *et al.*, 2013; Abass *et al.*, 2014; Hojati *et al.*, 2015).

В работах (Schroll *et al.*, 2007; Wilson *et al.*, 2011; Jabalameli *et al.*, 2012; Peter *et al.*, 2012; Scott *et al.*, 2015) обоснована важная роль микробных биопленок в развитии инфекционных заболеваний, связанных с оказанием медицинской помощи при использовании изделий медицинского назначения.

Цель исследования – изучить адаптивные свойства уропатогенных *Escherichia coli*, выделенных от пациентов Багдадского учебного госпиталя.

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 *E. coli* к антимикробным препаратам и наличие у них бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) 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*.

Научная новизна. Впервые показано, что наличие гена *fimH* обеспечивает более эффективный процесс формирования микробных биопленок клиническими штаммами *E. coli* в условиях *in vitro* на инертных поверхностях лунок иммунологического планшета и фрагментах полиуретанового уретрального катетера.

Установлено, что продукция БЛРС уропатогенными штаммами *E. coli*, выделенными от пациентов с признаками ИМП Багдадского учебного госпиталя, связана с наличием плазмидного гена *ctx-m*, что и обуславливает их полирезистентность к бета-лактамам антибиотикам.

Выявлено, что сочетанная устойчивость клинических штаммов *E. coli* к аминогликозидам II и III поколения связана с наличием плазмидного гена *aac(3)-II*, кодирующего фермент ацетилтрансферазу, субстратом для которого являются тобрамицин и гентамицин.

Теоретическая и практическая значимость работы. Обобщены и систематизированы данные о биологических особенностях уропатогенных *E. coli* – возбудителях ИМП бактериальной этиологии, механизмах их устойчивости к антимикробным препаратам, роли микробных биопленок в развитии ИМП. Полученные результаты являются основанием для выбора наиболее эффективных антибиотиков при лечении ИМП, вызванных полирезистентными штаммами уропатогенных *E. coli*, продуцирующих БЛРС и ацетилтрансферазу. Данные о повышенной способности уропатогенных *E. coli*, имеющих плазмидный ген *fimH*, к формированию биопленок на изделиях медицинского назначения являются основанием для разработки и проведения мероприятий по предотвращению катетер-ассоциированных инфекций при оказании высокотехнологичной медицинской помощи.

Методология диссертационного исследования. Диссертационная работа носит экспериментальный характер. Выбор методов настоящей работы соответствовал поставленным целям и задачам. При проведении исследования и изложении материала автором были применены такие общенаучные методы, как анализ литературных данных и обобщение, эмпирические методы исследования (измерение, эксперимент, метод сравнения, оценка и описание). Применение указанных методов и детальный статистический анализ полученных значений позволили обеспечить объективность и достоверность результатов и выводов.

Внедрение в практику. Материалы диссертации используются в учебном процессе кафедры микробиологии, биотехнологии и химии ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова», кафедры микробиологии и физиологии растений ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Клинические штаммы уропатогенных *E. coli*, выделенные от пациентов с признаками ИМП, находящихся на амбулаторном лечении в Багдадском учебном госпитале, характеризуются множественной лекарственной устойчивостью к антимикробным препаратам, применяемым для этиотропной терапии.

2. Устойчивость клинических штаммов уропатогенных *E. coli* к бета-лактамам и аминогликозидным антибиотикам связана с наличием у них гена *ctx-m*, кодирующего БЛРС, и гена *aac(3)-II*, кодирующего фермент ацетилтрансферазу.

3. Активное формирование микробных биопленок на поверхности изделий медицинского назначения клиническими штаммами уропатогенных *E. coli* связано с их высокой адгезивной способностью, обусловленной наличием гена *fimH*.

Степень достоверности и апробация работы. Высокая степень достоверности результатов проведенных исследований подтверждается использованием как общепринятых, так и современных микробиологических и генетических методов исследований и статистической обработки информации. Исследования проведены с использованием аттестованных методик и поверенного оборудования.

Результаты диссертационного исследования представлены на следующих научных конференциях: II Международная научно-практическая конференция «Основные проблемы естественных и математических наук» (Волгоград, 2015 г.), VII Международная научная конференция молодых ученых «Представляем научные достижения миру. Естественные науки» (Саратов, 2016 г.), VIII Региональная научная конференция «Исследования молодых ученых в биологии и экологии» (Саратов, 2016 г.), Международная научно-практическая конференция «Материалы и методы инновационных исследований и разработок» (Пенза, 2016 г.), Всероссийская научно-практическая конференция по медицинской микробиологии и клинической микологии «XIX Кашкинские чтения» (Санкт-Петербург, 2016).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов, материалов и методов, трех глав экспериментальных исследований, заключения и выводов, а также списка использованной литературы, который включает 350 источников, в том числе 337 иностранных авторов.

Объекты и методы исследования

Объектом исследования явились эталонные и клинические штаммы грамотрицательных бактерий (табл. 1).

Таблица 1 – Объекты исследования

Штаммы	Количество	Год выделения
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1	-
<i>Escherichia coli</i>	111	2014
<i>Klebsiella oxytoca</i>	20	2014
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	2015
<i>Enterobacter cloacae</i>	8	2015
<i>Enterobacter aerogenes</i>	15	2014
<i>Proteus vulgaris</i>	10	2014
<i>Proteus mirabilis</i>	10	2015
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	2015
<i>Morganella morganii</i>	3	2014
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	2015
Итого	200	2014 – 2015 гг.

Клинические штаммы условно-патогенных микроорганизмов были выделены из образцов мочи 325 пациентов с признаками ИМП, находящихся на амбулаторном лечении в Багдадском учебном госпитале.

Идентификация выделенных штаммов бактерий осуществлялась с использованием мультитестсистемы API 20E (BioMérieux SA, Франция) для определения биохимических свойств бактерий семейства Enterobacteriaceae.

Определение спектра чувствительности исследуемых штаммов условно-патогенных бактерий к антимикробным препаратам проводили с использованием диско-диффузного метода (МУК 4.2.1890-04).

Перечень дисков, содержащих антибиотики и химиотерапевтические препараты, представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Перечень использованных антимикробных препаратов

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

Для определения БЛРС применяли метод «двойных дисков» (МУК 4.2.1890-04), который предполагает использование доступных коммерческих дисков с цефалоспоридами III поколения и с амоксиклавом.

В исследованиях по обнаружению генов *ctx-m*, *aac(3)-II* и *fimH* использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) (Garrec *et al.*, 2011; Yazdi *et al.*, 2012; Named *et al.*, 2013; Jafari *et al.*, 2013; Abass *et al.*, 2014; Hojati *et al.*, 2015; Saad *et al.*, 2015; Ho *et al.*, 2016).

Олигонуклеотидные праймеры, используемые для обнаружения присутствия генов *ctx-m*, *aac(3)-II* и *fimH*, были предоставлены компанией Integrated DNA Technologies (Бельгия) и Bioneer Company (Корея).

Реакцию осуществляли в соответствии с работой (Nasehi *et al.*, 2010) в термоциклере для ПЦР. Реакция включала в себя следующие шаги, приведенные в таблице 3.

Адгезивную способность эталонного и клинических штаммов *E. coli* определяли с использованием методов В.И. Брилис и соавт. (1986) и С.С. Гизатулиной и соавт. (1991).

Таблица 3 – Этапы амплификации ПЦР для определения генетических маркеров уропатогенных кишечных палочек

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

Процесс формирования микробных биопленок моделировали в условиях *in vitro* в лунках иммунологических планшетов согласно стандартной методике (Тец В.В., 2006).

Электронно-микроскопическое исследование микробных биопленок на поверхности фрагментов полиуретанового уретрального катетера проводили с использованием растрового электронного микроскопа Asprex Explorer.

Статистическая обработка результатов осуществлялась с применением пакета прикладных программ Statistica 6.0 (for Windows; «Stat Soft Inc.», США), Statgraph (Version 2.6; Coulter), Microsoft Excel 2003 (for Windows XP).

Результаты исследования

Видовой состав микроорганизмов, выделяемых при инфекциях мочевыводящих путей

Инфекции мочевыводящих путей с высокой частотой встречаются повсеместно, в связи с этим представляло интерес оценить видовой состав возбудителей у пациентов Багдадского учебного госпиталя. Было установлено, что при исследовании образцов мочи, полученных от 325 пациентов с признаками ИМП, возбудители ИМП были выделены из 200 проб. В большинстве случаев возбудителями ИМП являлись представители семейства Enterobacteriaceae: в 55,5% образцов были обнаружены бактерии *E. coli* ($\chi^2 = 675,3$; $p < 0,05$). *Klebsiella* spp. выделялась из 14% образцов, *Enterobacter* spp. – из 11,5%, *Proteus* spp. – из 10% (табл. 4).

Клинический материал был получен от пациентов разных возрастов. Было установлено, что наибольшая частота случаев ИМП регистрировалась у людей возрастной группы 27–36 лет, на втором месте были пациенты в возрасте 37–46 лет, на третьем месте – лица в возрасте 17–26 лет. Наименьшая частота ИМП наблюдалось у пожилых пациентов в возрасте от 57 до 76 лет (рис. 1).

Определение частоты встречаемости ИМП среди пациентов позволило установить, что в большинстве случаев заболевания регистрировались у женщин (57,5% случаев) (см. рис. 1).

Таблица 4 – Видовой состав микроорганизмов, выделенных от больных с признаками инфекций мочевыводящих путей

Возбудители	Количество штаммов	
	абс.	%
<i>Escherichia coli</i>	111	55,5
<i>Klebsiella oxytoca</i>	20	10
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	4
<i>Enterobacter aerogenes</i>	15	7,5
<i>Enterobacter cloacae</i>	8	4
<i>Proteus mirabilis</i>	10	5
<i>Proteus vulgaris</i>	10	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	6
<i>Morganella morganii</i>	3	1,5
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	1,5
Итого	200	100

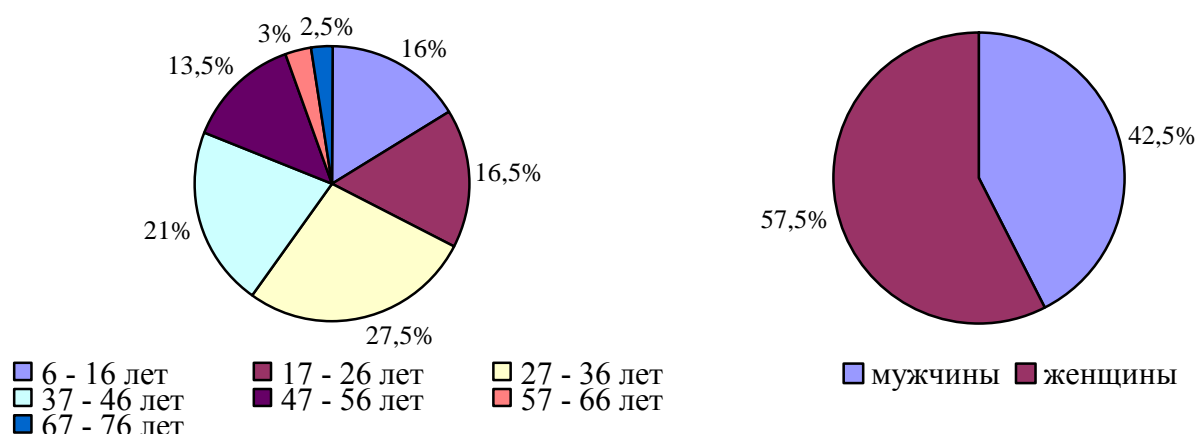


Рисунок 1 – Частота встречаемости инфекций мочевыводящих путей: А – в разных возрастных группах, Б – у мужчин и женщин

Таким образом, анализ полученных данных показал, что частота встречаемости ИМП зависела от пола и возраста пациентов, а этиологическим фактором в большинстве случаев являлись представители семейства *Enterobacteriaceae*, ведущими среди которых были уропатогенные *E. coli*.

Характеристика спектра чувствительности возбудителей инфекций мочевыводящих путей к антимикробным препаратам

Оценку резистентности исследуемых микроорганизмов проводили к антимикробным препаратам различных групп: бета-лактамам, аминогликозидам, хинолонам, фторхинолонам, нитрофуранам, сульфаниламидам в комплексе с диаминопиримидинами.

Было установлено, что все выделенные штаммы условно-патогенных бактерий были чувствительны к имипенему и амикацину,

более 50% штаммов проявили чувствительность к нитрофурантоину и тобрамицину ($\chi^2 = 285,03$, $p < 0,05$). Остальные антибиотики и химиотерапевтические препараты характеризовались низкой активностью в отношении выделенных штаммов, а к гентамицину, амоксиклаву, сульфаметоксазол-триметоприму, пиперациллину, ампициллину и налидиксовой кислоте большинство выделенных возбудителей ИМП были устойчивы (табл. 5).

Таблица 5 – Спектр чувствительности исследуемых штаммов условно-патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам

Антибиотик	Количество штаммов																			
	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>		<i>K. oxytoca</i>		<i>E. aerogenes</i>		<i>E. cloacae</i>		<i>P. vulgaris</i>		<i>P. mirabilis</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>M. morganii</i>		<i>A. baumannii</i>	
	Ч	У	Ч	У	Ч	У	Ч	У	Ч	У	Ч	У	Ч	У	Ч	У	Ч	У	Ч	У
IPM	111	0	8	0	20	0	15	0	8	0	10	0	10	0	12	0	3	0	3	0
AK	111	0	8	0	20	0	15	0	8	0	10	0	10	0	12	0	3	0	3	0
F	80	31	3	5	14	6	10	5	5	3	2	8	3	7	7	5	2	1	1	2
CIP	49	62	2	6	5	15	8	7	3	5	4	6	4	6	4	8	2	1	1	2
TOB	71	40	6	2	9	11	9	6	5	3	6	4	6	4	4	8	2	1	1	2
CAZ	50	61	2	6	8	12	6	9	5	3	3	7	4	6	4	8	2	1	1	2
GM	44	67	1	7	6	14	5	10	3	5	3	7	2	8	2	10	1	2	1	2
CTX	45	66	3	5	8	12	6	9	3	5	4	6	4	6	3	9	2	1	1	2
PIP	35	76	2	6	4	16	7	8	2	6	3	7	4	6	5	7	1	2	1	2
FX	55	56	3	5	6	14	8	7	3	5	4	6	4	6	3	9	2	1	1	2
NA	36	75	2	6	3	17	3	12	2	6	2	8	3	7	2	10	1	2	0	3
SXT	41	70	2	6	2	18	5	10	2	6	3	7	3	7	2	10	1	2	1	2
AMC	61	50	5	3	11	9	7	8	3	5	4	6	4	6	4	8	1	2	1	2
AMP	32	79	3	5	3	17	4	11	2	6	2	8	3	7	1	11	1	2	1	2
CRO	61	50	6	2	13	7	9	6	5	3	6	4	6	4	5	7	2	1	2	1
Всего	111		28				23				20				12		3		3	

Выделенные штаммы *Klebsiella* spp. были устойчивы к 11 исследуемым антимикробным препаратам, *Enterobacter* spp. – к 7, *Proteus* spp. – к 11, *Pseudomonas* spp. – к 12, *Morganella morganii* – к 7 и *Acinetobacter baumannii* – к 13 антибиотикам.

Большинство выделенных штаммов *E. coli* были чувствительны к нитрофурантоину и тобрамицину, однако остальные антимикробные препараты были малоэффективны в отношении данного возбудителя.

Среди выделенных штаммов *Klebsiella* spp. 60,7% были чувствительны к нитрофурантоину, а в отношении остальных исследованных антимикробных препаратов большинство выделенных штаммов были устойчивы.

В отношении *Enterobacter* spp. выявлена эффективность нитрофурантоина для 65,2%, цiproфлоксацина и тобрамицина – для 52,2% штаммов.

50% выделенных штаммов *Proteus* spp. были чувствительны к цiproфлоксацину и тобрамицину, однако в большинстве своем проявили устойчивость к нитрофурантоину.

В отношении штаммов *Pseudomonas* spp. наибольшая активность была отмечена для цiproфлоксацина, к которому были чувствительны 66,7% выделенных микроорганизмов.

Два из трех выделенных штаммов *M. morganii* были чувствительны к цiproфлоксацину, тобрамицину и представителям цефалоспоринов–цефтазидиму, цефотаксиму и цефокситину. Выделенные штаммы *A. baumannii* проявили высокую устойчивость к большинству из исследованных антимикробных препаратов.

Таким образом, проведенный анализ спектра чувствительности выделенных условно-патогенных бактерий позволил установить, что большинство из них характеризуются множественной резистентностью к антибиотикам и антимикробным химиотерапевтическим препаратам.

Высокий уровень устойчивости представителей семейства Enterobacteriaceae к цефалоспорином III поколения и к комбинированному препарату амоксиклаву позволил предположить наличие у данных микроорганизмов БЛРС.

Определение наличия бета-лактамаз расширенного спектра у уропатогенных *E. coli* по фенотипическим признакам

Предварительная оценка позволила установить, что при ИМП в большинстве случаев от больных выделялись бактерии *E. coli*, в связи с этим БЛРС были определены для штаммов этих микроорганизмов. Первоначальный скрининг устойчивости к цефалоспорином показал, что 65 штаммов *E. coli* (58,5%) проявили устойчивость к цефтазидиму, который считается маркером БЛРС.

Использование метода «двойных дисков» показало, что из 111 идентифицированных клинических штаммов *E. coli* способностью продуцировать БЛРС обладал 51,4% изолятов (табл. 6).

Полученные результаты свидетельствуют о невозможности использования бета-лактамных антибиотиков группы пенициллинов и цефалоспоринов для лечения заболеваний, вызванных штаммами-продуцентами БЛРС.

Таблица 6 – Частота индикации штаммов *E. coli*, продуцирующих БЛРС

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

Поскольку большинство выделенных от больных штаммов *E. coli* проявили устойчивость к антибиотикам ряда цефалоспоринов, которые часто применяются для лечения ИМП, представляло интерес определить спектр наиболее эффективных препаратов в отношении продуцентов БЛРС. Было установлено, что выделенные клинические штаммы *E. coli*, продуцирующие БЛРС, характеризуются различной степенью чувствительности к тестируемым антимикробным препаратам. Наибольшая чувствительность этих штаммов была отмечена для антибиотиков ряда карбапенемов (имипенем), аминогликозидов (амикацин и тобрамицин) и представителя ряда химиотерапевтических препаратов группы нитрофуранов – нитрофурантоина ($\chi^2 = 208,9$; $p < 0,05$) (табл. 7).

Таблица 7 – Спектр чувствительности к антимикробным препаратам *E. coli*, продуцирующих БЛРС

Группа антибиотиков	Антибиотик	Количество штаммов			
		Чувствительных		Устойчивых	
		абс.	%	абс.	%
Карбапенем	IPM	57	100	0	0
Нитрофуран	F	44	77	13	23
Сульфониламид	SXT	16	28	41	72
Хинолоны и фторхинолоны	CIP	17	30	40	70
	NA	12	21	45	79
Аминогликозиды	AK	57	100	0	0
	TOB	45	79	12	21
	GM	21	37	36	63
Пенициллины	AMC	33	58	24	42
	PIP	19	33	38	67
	AMP	14	25	43	75
Цефалоспорины	FX	15	26	42	74
	CAZ	0	0	57	100
	CTX	0	0	57	100
	CRO	7	12	50	88

Таким образом, было установлено, что большинство штаммов *E. coli*, выделенных от больных с признаками ИМП, согласно результатам фенотипического теста, характеризовались способностью к продукции БЛРС.

Следовательно, для лечения заболеваний, вызванных штаммами-продуцентами БЛРС, необходимо учитывать антибиотикограмму, а препаратами выбора могут быть антибиотики ряда карбапенемов и аминогликозидов, а также нитрофурановые препараты.

Определение генов устойчивости к антибиотикам с использованием полимеразной цепной реакции

Определение гена антибиотикорезистентности *ctx-m* проводили для клинических штаммов уропатогенных *E. coli*, частота выделения которых от больных с ИМП была самой высокой и для которых предварительно фенотипическим методом были определены БЛРС. В качестве отрицательного контроля БЛРС использовали эталонный штамм *E. coli* ATCC 25922. Результаты генотипической детекции гена устойчивости к антибиотикам *ctx-m* приведены на рисунке 2.

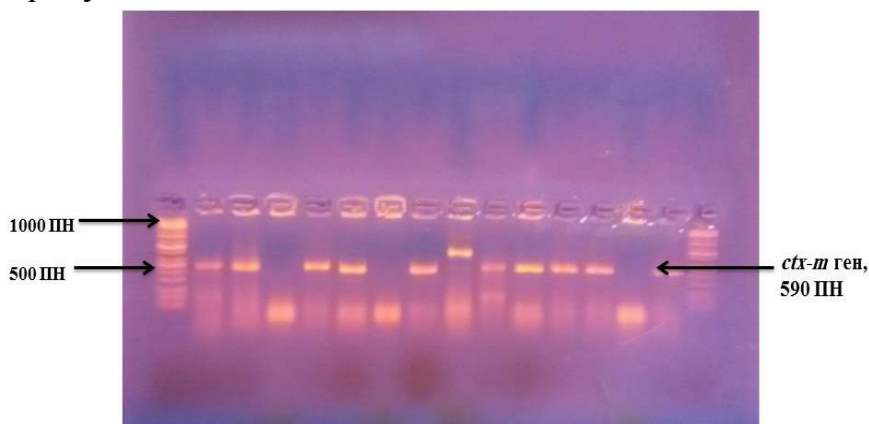


Рисунок 2 – Результаты ПЦР-анализа образцов ДНК клинических штаммов *E. coli* на наличие гена *ctx-m*

Было установлено, что ген *ctx-m*, кодирующий БЛРС, размер которого составлял 590 пар нуклеотидов, обнаруживался у 37 клинических штаммов *E. coli* (63%), для которых предварительно было установлено наличие данных ферментов фенотипическим методом (рис. 3). Тетрахорический коэффициент сопряженности составил 0,67 (при $p < 0,05$).

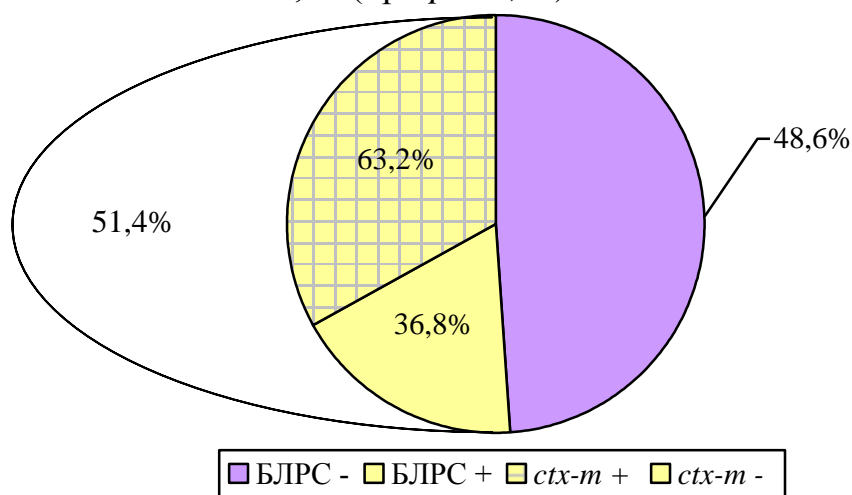


Рисунок 3 – Результаты определения гена устойчивости *ctx-m* у клинических штаммов *E. coli*

Также представляло интерес исследовать наличие генетических детерминант, кодирующих устойчивость к аминогликозидам, т.к. для лечения ИМП в клинической практике широко применяют антибиотики этой группы.

В исследованиях использовали 23 клинических штамма *E. coli*, для которых была установлена устойчивость к тобрамицину и гентамицину. Результаты генотипической детекции гена устойчивости к аминогликозидным антибиотикам *aac(3)-II* представлены на рисунке 4. Было установлено, что частота встречаемости гена *aac(3)-II* среди исследованных штаммов *E. coli* превышала 78% (рис. 5). Тетрахорический коэффициент сопряженности составил 0,86 (при $p < 0,05$).

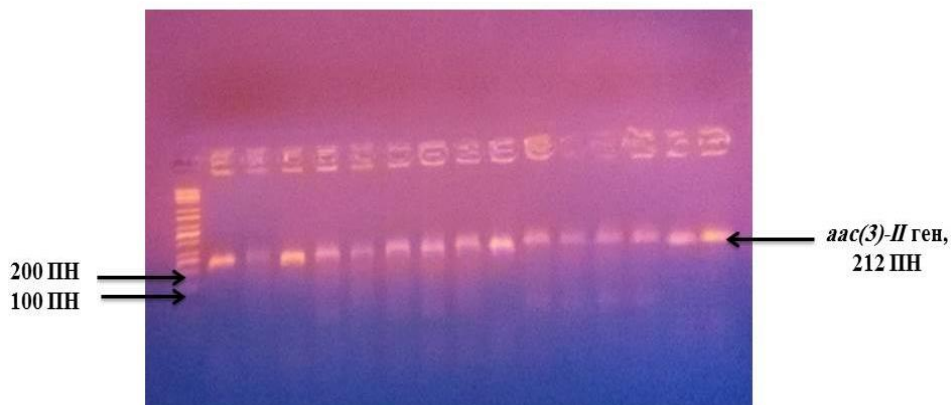


Рисунок 4 – Результаты ПЦР-анализа образцов ДНК клинических штаммов *E. coli* на наличие гена *aac(3)-II*

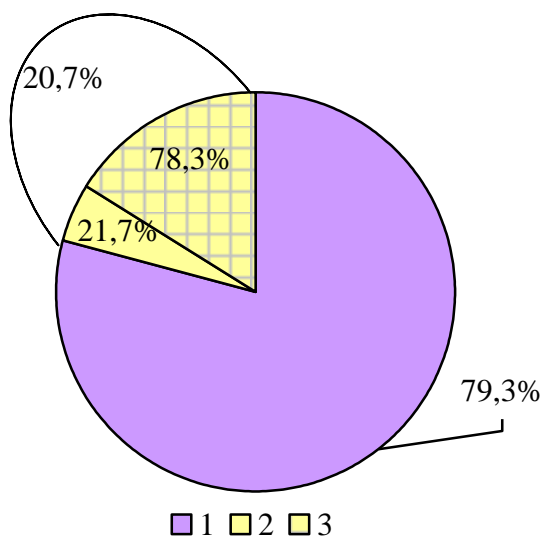


Рисунок 5 – Результаты определения гена устойчивости *aac(3)-II* у клинических штаммов *E. coli* (1 – штаммы *E. coli*, чувствительные к тобрамицину и гентамицину, 2 – штаммы *E. coli*, устойчивые к тобрамицину и гентамицину, 3 – штаммы *E. coli*, имеющие ген *aac(3)-II*)

Таким образом, полученные результаты позволили установить наличие в геноме клинических штаммов *E. coli* детерминант резистентности к антимикробным препаратам, находящим широкое применение для лечения ИМП – бета-лактамным и аминогликозидным антибиотикам.

Определение гена *fimH* у клинических штаммов *E. coli*, выделенных от больных с признаками инфекций мочевыводящих путей

В исследованиях использовали 111 клинических штаммов уропатогенных *E. coli*, у которых с помощью ПЦР было определено наличие гена *fimH*, кодирующего синтез пилей I типа.

Было установлено, что частота встречаемости гена *fimH*, размер которого составлял 446 пар нуклеотидов (рис. 6), среди УРЕС была высокой и составила 63% (рис. 7).

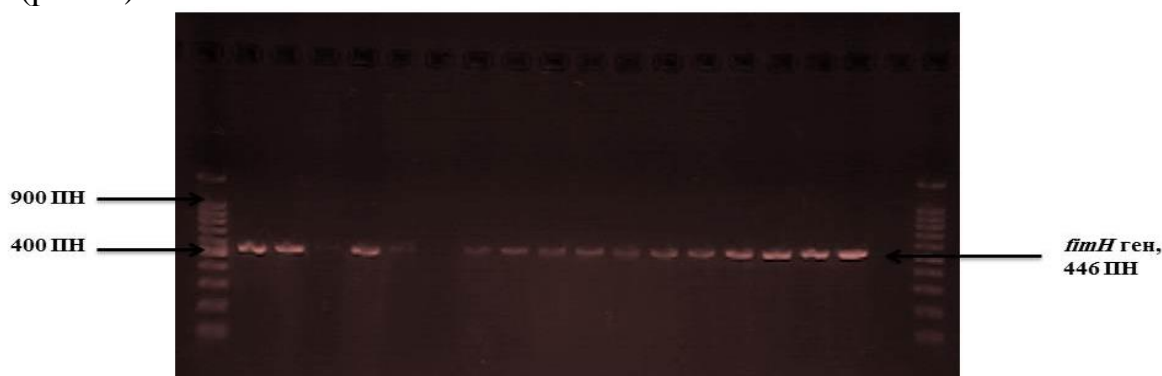


Рисунок 6 – Результаты ПЦР-анализа образцов ДНК клинических штаммов *E. coli* на наличие гена *fimH*

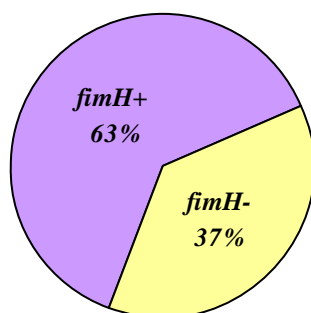


Рисунок 7 – Результаты определения гена *fimH* у клинических штаммов *E. coli*

Таким образом, было установлено, что большинство клинических штаммов *E. coli*, выделенных от больных с признаками ИМП, характеризовались наличием гена *fimH*, кодирующего пили I типа, которые обладают высоким сродством к рецепторам клеток мочевыделительной системы и необходимы для их распознавания, присоединения и колонизации уропатогенными бактериями.

Изучение адгезивной активности штаммов *E. coli*, отличающихся по наличию гена *fimH*

Поскольку для большинства клинических штаммов *E. coli*, выделенных от больных с признаками ИМП, было установлено наличие гена *fimH*, представляло интерес изучить влияние наличия данного гена на адгезивные свойства бактерий.

В исследованиях использовали эталонный штамм *E. coli* ATCC 25922, а также 20 клинических штаммов, выделенных от больных с признаками ИМП и отличающихся по наличию гена *fimH*.

Оценка адгезивных свойств исследуемых штаммов бактерий позволила установить, что по показателю индекса адгезии микроорганизма (ИАМ) эталонный штамм *E. coli* ATCC 25922 характеризовался как низкоадгезивный (табл. 8).

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

№	Штаммы микроорганизмов	Значения ИАМ
1	<i>E. coli</i> ATCC 25922	2,1±0,34
2	<i>E. coli</i> № 3 <i>fimH</i> -	2,8±0,17*
3	<i>E. coli</i> № 7 <i>fimH</i> -	2,2±0,26
4	<i>E. coli</i> № 13 <i>fimH</i> -	2,96±0,8
5	<i>E. coli</i> № 14 <i>fimH</i> -	3,34±0,49*
6	<i>E. coli</i> № 17 <i>fimH</i> -	1,86±0,06
7	<i>E. coli</i> № 22 <i>fimH</i> -	1,99±0,18
8	<i>E. coli</i> № 27 <i>fimH</i> -	2,72±0,07*
9	<i>E. coli</i> № 38 <i>fimH</i> -	3,72±0,32*
10	<i>E. coli</i> № 39 <i>fimH</i> -	2,62±0,12*
11	<i>E. coli</i> № 41 <i>fimH</i> -	3,57±0,46*
12	<i>E. coli</i> № 45 <i>fimH</i> +	5,04±1,01*
13	<i>E. coli</i> № 56 <i>fimH</i> +	6,88±0,81*
14	<i>E. coli</i> № 59 <i>fimH</i> +	7,22±0,54*
15	<i>E. coli</i> № 67 <i>fimH</i> +	5,84±1,04*
16	<i>E. coli</i> № 72 <i>fimH</i> +	4,28±0,24*
17	<i>E. coli</i> № 79 <i>fimH</i> +	6,12±0,32*
18	<i>E. coli</i> № 85 <i>fimH</i> +	6,02±0,38*
19	<i>E. coli</i> № 87 <i>fimH</i> +	5,62±0,32*
20	<i>E. coli</i> № 92 <i>fimH</i> +	7,0±0,93*
21	<i>E. coli</i> № 96 <i>fimH</i> +	5,82±0,22*

Примечание:* – наличие достоверности при уровне значимости $p < 0,05$ по отношению к контролю.

Клинические штаммы *E. coli* характеризовались различным уровнем адгезивной активности, который зависел от наличия гена *fimH*. Среди клинических штаммов, лишенных гена *fimH*, по степени адгезии было выявлено две группы бактерий: штаммы *E. coli* №№ 7, 17, 22 характеризовались как низкоадгезивные, а штаммы *E. coli* №№ 3, 13, 14, 27, 38, 39, 41 – как среднеадгезивные. Все исследованные клинические штаммы, имеющие в составе генома ген *fimH*, обладали высокой адгезивной активностью, поскольку значения ИАМ составляли от 4,28 до 7,22 (U критерий Манна–Уитни = 0; $p = 0,000157$).

Таким образом, установлены достоверные отличия адгезивной активности *E. coli* в зависимости от наличия гена *fimH*.

Динамика формирования микробных биопленок штаммами уропатогенных *E. coli*

Процесс формирования микробных биопленок моделировали в условиях *in vitro* в лунках иммунологических планшетов в стационарных условиях.

Было установлено, что значения, полученные во все периоды культивирования микробных биопленок условно-патогенных микроорганизмов, достоверно превышали контрольные показатели. Путем множественного сравнения выборок с попарно связанными вариантами установлены достоверные отличия между штаммами по ранговому дисперсионному анализу Фридмана ($\chi^2 = 6,5$; $p < 0,05$).

Показано, что эталонный штамм *E. coli* ATCC 25922 увеличивал свою биомассу через 24 часа культивирования в 8,78 раз по сравнению с контролем, через 48 часов происходило достоверное увеличение связывания красителя в 1,4 раза по сравнению с показателями первых суток, через 72 часа – в 2,1 раза с последующим снижением к 4-м суткам в 1,28 раз (рис. 8). Величина интенсивности пленкообразования клиническим штаммом *E. coli* № 7 на 1-е сутки культивирования характеризовалась увеличением прироста биомассы в 10,18 раз по сравнению с контролем.

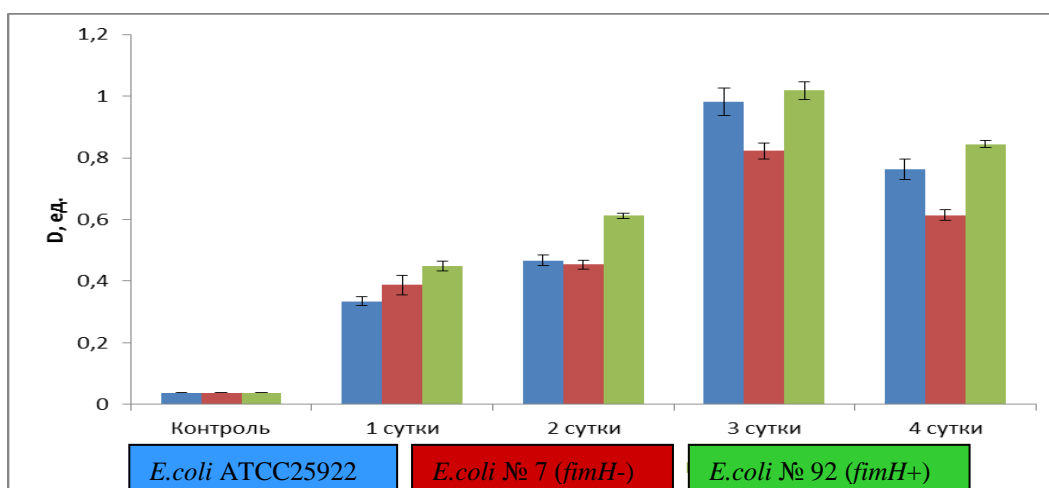


Рисунок 8 – Динамика величин связывания кристаллического фиолетового микробными биопленками, образованными эталонным и клиническими штаммами *E. coli*

На вторые сутки культивирования наблюдалось незначительное увеличение интенсивности связывания красителя в 1,17 раза по сравнению с предыдущими. На третьи сутки культивирования микробных биопленок происходило дальнейшее нарастание биомассы данного штамма и увеличение интенсивности связывания кристаллического фиолетового в 1,81 по сравнению с предыдущими сутками, однако на четвертые сутки культивирования происходило снижение в 1,34 раза, как и при культивировании эталонного штамма *E. coli* ATCC 25922. Аналогичные результаты были получены при культивировании клинического штамма *E. coli* № 92, несущего ген *fimH*:

через 24 часа культивирования наблюдалось увеличение интенсивности связывания кристаллического фиолетового в 11,8 раза по сравнению с контролем, через 48 часов – в 1,37 раза по сравнению с предыдущими сутками, через 72 часа – в 1,66 раза с последующим снижением прироста биомассы через 96 часов в 1,21 раза.

Линейная динамика накопления красителя биопленками как эталонного, так и клинических штаммов *E. coli* с первых по трети сутки культивирования, вероятно, связана с последовательными стадиями ее созревания и дифференцировки, поскольку в этот период микробные клетки характеризуются продукцией неспецифических факторов адгезии и высокой метаболической активностью.

Снижение интенсивности связывания красителя через 96 часов культивирования соответствует стадии дисперсии микробных биопленок *E. coli* ввиду дефицита питательных веществ при стационарном способе культивирования в условиях *in vitro*.

Согласно полученным результатам, наибольшая интенсивность связывания красителя всеми исследуемыми штаммами бактерий отмечалась через 24 часа культивирования.

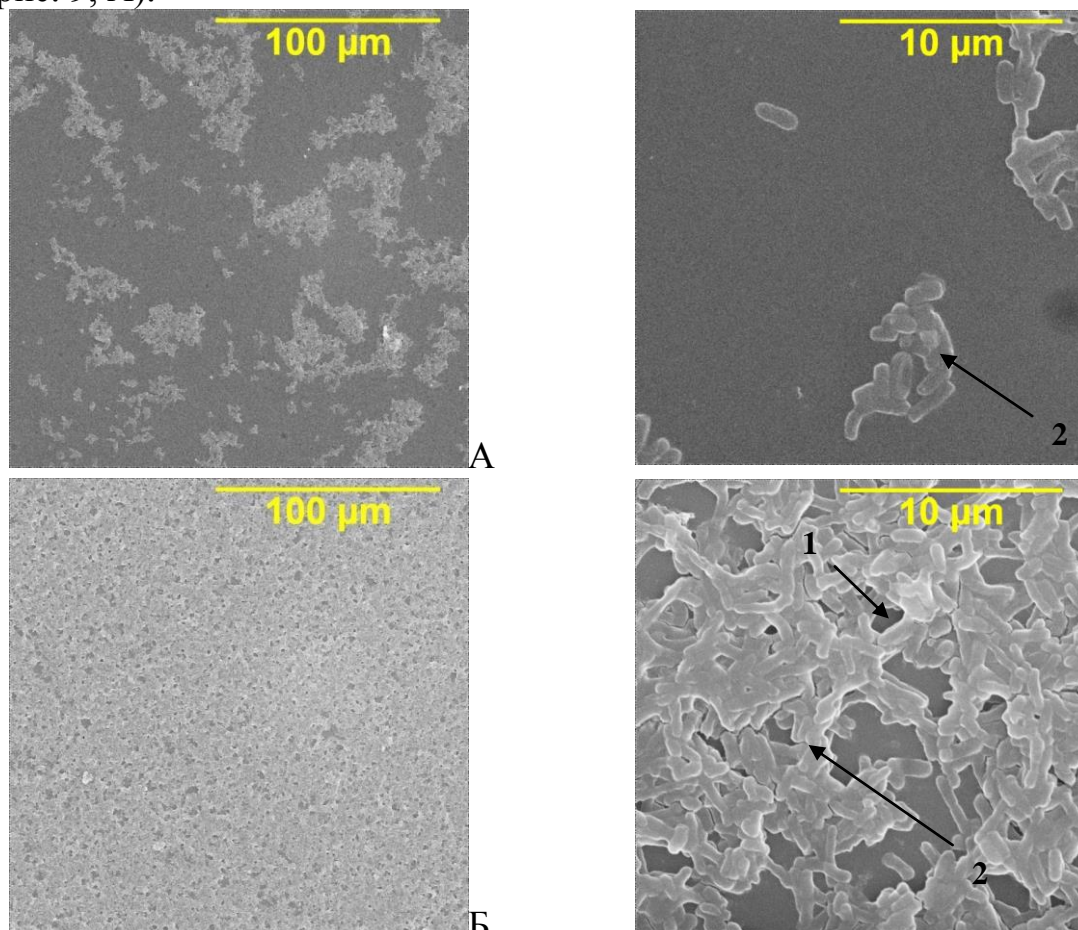
Кроме того, установлено, что для клинического штамма *E. coli* № 92, несущего ген *fimH*, эта способность была достоверно выше по сравнению с пленкообразующей способностью эталонного штамма *E. coli* ATCC 25922 в 1,34 раза и клинического штамма *E. coli* № 7 в 1,16 раза, у которых данный ген не был обнаружен.

Таким образом, в ходе проведенных исследований методом спектрофотометрии было установлено, что как эталонный, так и клинические штаммы *E. coli* способны формировать микробные биопленки в условиях *in vitro*, однако большая интенсивность пленкообразования характерна для клинического штамма *E. coli* № 92, несущего ген *fimH*, который кодирует факторы адгезии – пили I типа.

Исследования морфологических особенностей модели микробной биопленки *E. coli* на поверхности изделий медицинского назначения

Поскольку процесс неспецифической адгезии микроорганизмов и начальные этапы формирования микробных биопленок *in vitro* происходят в первые сутки культивирования, представляло интерес оценить интенсивность пленкообразования клинических штаммов *E. coli*, отличающихся по наличию гена *fimH*. Процесс формирования микробных биопленок моделировали на поверхности изделий медицинского назначения, в качестве которых использовали уретральный катетер, изготовленный из полиуретана. Фрагменты катетера помещали в пробирки с мясо-пептонным бульоном, содержащим суточные культуры исследуемых микроорганизмов в концентрации 2×10^5 м.к./мл. После экспозиции в течение 24 часов при 37°C полученные образцы инактивировали в 96%-ном этаноле и готовили препараты для электронно-микроскопического исследования.

Оценка особенностей пленкообразования клиническим штаммом *E. coli* № 7, у которого отсутствовал ген *fimH*, позволила установить, что через 24 часа культивирования на поверхности фрагментов уретрального катетера происходил процесс адгезии бактерий: отмечались изолированные скопления микробных клеток, расположенные в один или два слоя, объединенные экзополимерным матриксом, количество которого было незначительным (рис. 9, А).



**Рисунок 9 – Электронная микрофотография микробной биопленки клинических штаммов *E. coli*: А – *E. coli* № 7 (*fimH* -), Б – *E. coli* № 92 (*fimH* +)
(1 – каналы микробной биопленки, 2 – структуры экзополимерного матрикса)**

При формировании биопленки штаммом *E. coli* № 92, несущим ген *fimH*, через сутки культивирования вся поверхность образца была покрыта многослойной микробной биопленкой, клетки в которой были либо непосредственно связаны между собой, либо их контакт осуществлялся через компоненты экзополимерного матрикса (рис. 9, Б). Одни участки биопленки имели ровную поверхность благодаря микробным клеткам, лишенным матрикса, другие клетки были связаны с экзополимерным матриксом, благодаря чему их поверхность имела неструктурированный вид. Вся поверхность биопленки была пронизана многочисленными каналами.

Активный процесс формирования микробных биопленок на изделиях медицинского назначения связан с отсутствием специфических защитных противoinфекционных механизмов на инертных поверхностях искусственных

материалов катетеров, дренажей, протезов и др. Это и объясняет формирование бактерионосительства при проведении медицинских манипуляций, а также хронизации инфекционного процесса.

Использование метода сканирующей электронной микроскопии позволило установить структурные особенности микробных биопленок, образованных клиническими штаммами *E. coli*, отличающимися по наличию гена *fimH*.

Таким образом, проведенные нами исследования позволили установить, что большинство выделенных штаммов условно-патогенных бактерий, вызывающих ИМП, характеризовались множественной резистентностью к антимикробным препаратам, которая у клинических штаммов *E. coli* была обусловлена наличием генов *ctx-m* и *aac(3)-II*. Ген *fimH*, обнаруженный у большинства клинических штаммов *E. coli*, определял их высокий адгезивный уровень, а также обуславливал интенсивный процесс пленкообразования в условиях *in vitro* как в лунках иммунологического планшета, так и на поверхности образцов уретрального катетера.

Выводы

1. Из 200 штаммов бактерий, выделенных от пациентов Багдадского учебного госпиталя, в 92,5% возбудителями ИМП являлись представители семейства Enterobacteriaceae, из которых 55,5% (111 штаммов) были уропатогенные *E. coli*, 14% (28 штаммов) – *Klebsiella* spp., 11,5% (23 штамма) – *Enterobacter* spp., 10% (20 штаммов) – *Proteus* spp. 1,5% (3 штамма) – *Morganella morganii*. Уропатогенные бактерии выделялись с большей частотой в возрастной группе 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 имипенему и амикацину. 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 63% штаммов *E. coli*, для которых предварительно было показано наличие БЛРС фенотипическим методом, и гена *aac(3)-II* у 78,2% исследуемых штаммов уропатогенных *E. coli*, устойчивых к тобрамицину и гентамицину.

4. Доказано наличие гена *fimH*, детерминирующего синтез пилей I типа, у 63% клинических штаммов уропатогенных *E. coli*; штаммы, имеющие данный ген, по показателю индекса адгезии микроорганизмов характеризовались как высокоадгезивные (ИАМ составил 4,28 – 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 с эталонным штаммом *E. coli* ATCC 25922 и клиническими штаммами, не имеющими данного гена.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в журналах из списка рекомендованных ВАК РФ:

1. Glinskaya E. V., Al-Bayati B. M., Nechaeva O. V., Luneva I. O. Antibiotic susceptibility of pathogens in urinary tract infections in community // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия «Химия. Биология. Экология». – 2015. – Том 15, Выпуск 4. – С. 63–66.
2. Al-Bayati B. M., Glinskaya E. V., Nechaeva O. V., Luneva I. O. Genotypic detection of *fimH* virulence gene in uropathogenic *E. coli* (UPEC) isolated from urinary tract infections // Известия Дагестанского государственного педагогического университета. Серия «Естественные и точные науки». – 2015. – № 3 (32). – С. 55–58.
3. Al-Bayati B. M., Glinskaya E. V., Nechaeva O. V., Luneva I. O., Babaylova A. V. Urinary tract infection in community: Age and gender relationship // Вестник Удмуртского университета. Серия «Биология. Науки о Земле». – 2016. – Выпуск 2. – С. 128–131.
4. Аль Баяти Б. М., Глинская Е. В., Нечаева О. В., Лунева И. О. Бета-лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС), продуцируемые клиническими штаммами *E. coli* при инфекциях мочевыводящих путей // Известия Уфимского научного центра Российской академии наук. – 2016. – Выпуск 1. – С. 62–65.
5. Glinskaya E. V., Al-Bayati B. M., Nechaeva O. V., Luneva I. O. Urinary tract infections: age and gender features // Проблемы медицинской микологии. – 2016. – Том 18, № 2. – Р. 54–55.
6. Нечаева О. В., Тихомирова Е. И., Заярский Д. А., Беспалова Н. В., Глинская Е. В., Шуршалова Н. Ф., Аль Баяти Б. М., Бабайлова А. В. Антибиопленочная активность полиазолидинаммония, модифицированного гидрат-ионами йода, в отношении микробных биопленок уропатогенных кишечных палочек // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Том 162, № 12. – С. 753–755.
7. Нечаева О. В., Аль Баяти Б. М., Глинская Е. В., Ульянов В. Ю., Вакараева М. М., Заярский Д. А., Тихомирова Е. И., Беспалова Н. В. Особенности формирования микробных биопленок условно-патогенными штаммами *Escherichia coli* и разработка способов борьбы с ними // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2016. – Том 18, № 2(3). – С. 776–782.
8. Glinskaya E. V., Al-Bayati B. M., Nechaeva O. V., Luneva I. O. Isolation, identification, and antimicrobial susceptibility of uropathogenic *E. coli* and *Klebsiella* spp. // International Research Journal. – 2015. – № 10 (41). – Part 3. – Р. 89–91.

Публикации в других журналах и изданиях

1. Al-Bayati B. M., Glinskaya E. V., Nechaeva O. V., Luneva I. O. Multidrug resistant pathogens in urinary tract infections // Основные проблемы естественных и математических наук: сборник научных трудов по итогам Международной научно-практической конференции. Волгоград, 2015. – С. 43–45.
2. Al-Bayati B. M. *ctx-m* antibiotic resistance gene in uropathogenic *E. coli* (UPEC): Genotypic identification // Исследования молодых ученых в биологии и экологии: Сборник научных трудов VIII Региональной научной конференции. Саратов, 2016. – Выпуск 14. – С. 3–6.
3. Аль Баяти Б. М., Глинская Е. В., Бабайлова А. В. The detection of *aac(3)-II* aminoglycoside resistance gene among uropathogenic *Escherichia coli* // Материалы и методы инновационных исследований и разработок: Сборник статей Международной научно-практической конференции. Пенза, 2016. – С. 10–15.

Благодарности

Автор глубоко признателен научному руководителю – к.б.н., доценту кафедры микробиологии и физиологии растений ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского» Глинской Елене Владимировне, сотрудникам кафедры микробиологии и физиологии растений и лаборатории молекулярной биологии за всестороннюю помощь в работе и ценные консультации.

Аль Баяти Басим Мохаммад Ибрахим Адаптивные свойства уропатогенных *Escherichia coli*

В работе представлены результаты изучения видового состава возбудителей, выделенных от пациентов с признаками инфекций мочевыводящих путей Багдадского учебного госпиталя. Определен спектр чувствительности клинических штаммов *E. coli* к антимикробным препаратам. Установлено, что продукция бета-лактамаз расширенного спектра уропатогенными штаммами *E. coli* связана с наличием плазмидного гена *ctx-m* и обуславливает их полирезистентность к бета-лактамным антибиотикам. Показано, что сочетанная устойчивость клинических штаммов *E. coli* к аминогликозидам II и III поколения связана с наличием плазмидного гена *aac(3)-II*. Проанализировано влияние наличия гена *fimH* на процесс формирования микробных биопленок уропатогенными штаммами *E. coli* в условиях *in vitro* на инертных поверхностях лунок иммунологического планшета и фрагментах полиуретанового уретрального катетера.

Al-Bayati Basim Mohammad Ibrahim Adaptive properties of uropathogenic *Escherichia coli*

The results of investigating the species composition of urinary pathogens which were isolated from patients of the Baghdad teaching hospital and had the clinical symptoms of urinary tract infection are presented in this paper. The antibiotic susceptibility pattern of clinical strains of *E. coli* to antimicrobial agents was determined. It has been established that the production of extended spectrum beta-lactamases by uropathogenic *E. coli* strains is associated with the existence of *ctx-m* plasmid gene, which causes their multiresistance to beta-lactam antibiotics. It was shown that the combined resistance of clinical strains of *E. coli* to aminoglycosides II and III generation is associated with the presence of the plasmid gene *aac(3)-II*. The effect of the presence of *fimH* gene on the formation of microbial biofilms by uropathogenic strains of *E. coli* in vitro conditions on the inert surfaces of the immunological plate wells and fragments of the polyurethane urethral catheter was analyzed.

Подписано в печать 23.06.2017. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.
Гарнитура Times. Печ. л. 1,0.
Тираж 100. Заказ № 468-82.

Издательство «Техно-Декор»,
Саратов, Московская, 160, тел.: 26-38-48,
sar-print.ru