

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА
ENTEROBACTERIACEAE ИЗ ПОЧВЫ И ВОДЫ К АНТИБИОТИКАМ
ДИСКО-ДИФФУЗИОННЫМ И ЭКСПРЕСС-МЕТОДОМ**

А.С. Губейко, М.М. Воробьева, Д.В. Дубновицкая

Полесский государственный университет, Пинск, asagubejko@gmail.com

Бесконтрольное применение различных групп антибиотиков привело к появлению антибиотикорезистентных штаммов бактерий, в том числе и среди представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

Согласно литературным данным резист характерен как для патогенных, так и непатогенных бактерий. В связи с этим необходимо проводить мониторинг антибиотикорезистентности для получения полной картины антибиотикорезистентности.

Серьезную проблему представляет распространение *Enterobacteriaceae* с продукцией бета-лактамаз расширенного спектра (ESBL) [1]. Среди всех грамотрицательных бактерий по ESBL свойством, особое место занимают *Escherichia coli*, что и определяет актуальность их использования при изучении антибиотикорезистентности [2].

Согласно литературным данным, бета-лактамы являются наиболее часто применяемыми препаратами для лечения бактериальных инфекций, однако, как показывают результаты исследований, большинство представителей *Enterobacteriaceae* демонстрируют резистентность и к этой группе антибиотиков [3].

В рамках настоящей работы использовали быстрый, простой и дешевый модифицированные тест Carba NP для выявления устойчивости к бета-лактамам антибиотикам среди бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. В качестве дополнительного метода, позволяющего определить устой-

чивость непатогенных микроорганизмов к разным группам антибиотиков, в нашем случае и к бета-лактамами, использовали не референтные методы, поскольку они трудоемкие и затратные, а коммерческие тест-системы, в частности диско-диффузионный метод [4]. Наличие готовых дисков с антибиотиками позволяет использовать данный метод для оценки резистентности непатогенных микроорганизмов, выделенных из окружающей среды, к антибиотикам в условиях студенческой научно-исследовательской лаборатории.

Цель работы – выявить способность у штаммов микроорганизмов, выделенных из окружающей среды, продуцировать бета-лактамазы, модифицированным тестом Carba NP, а также определить чувствительность этих штаммов бактерий к разным группам антибиотиков, в том числе к бета-лактамам, диско-диффузионным методом.

Выделили три штамма *E. coli* из почвы рынка Кирова и воды фонтана возле магазина Копеечки и из реки Пины, и один штамм *R. ornithinolytica* из почвы рынка Кирова. Идентификацию этих штаммов осуществляли по определителю Берджи, основанном на морфологически-тинкториальных, культуральных, биохимических свойствах микроорганизмов и ПЦР-теста на базе Пинского зонального центра гигиены и эпидемиологии.

После корректной идентификации выделенных штаммов бактерий. Устанавливали на чувствительность к бета-лактамам антибиотикам выделенных штаммов бактерий с помощью модифицированного теста Carba NP в пробирках и на планшетах для ИФА. Для модифицированного теста Carba NP в пробирках было использовано 5 бета-лактаменных антибиотиков: амоксициллин, амоклав, цефтриаксон, цефепим и мегасеф. Для модифицированного теста Carba NP в планшете для ИФА было использовано 8 бета-лактаменных антибиотиков: амоксициллин, амоклав, амоксикар, аугометин мегасеф, цефтазидим цефтриаксон, цефепим.

Для подтверждения или опровержения результатов модифицированного теста Carba NP в пробирках и на планшетах для ИФА проводили диско-диффузионный метод, учитывая стандарт, представленный Европейским комитетом. ДДМ было взято 13 антибиотиков: цефтриаксон, цефепим, цефексим, цефтазидим, цефотаксим, тикарциллин + клавулановая к-та, мерепенем, ципрофлоксацин, норфлоксацин, моксифлоксацин, перфлоксацин, амикацин, бацитрацин.

Согласно результатам идентификации по определителю Берджи выделенные бактерии по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам и ПЦР-тесту идентифицированы как *E. coli* и *R. ornithinolytica* (таблица 1).

Таблица 1. – Биохимические свойства выделенных бактерий

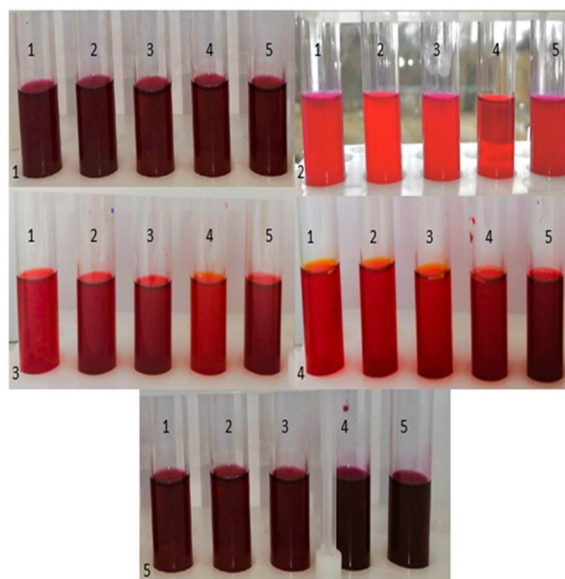
Биохимические свойства	<i>E. coli</i> 1	<i>E. coli</i> 2	<i>E. coli</i> 3	<i>E. coli</i> по Берджи	<i>R.</i> <i>ornithinolytica</i>	<i>R. ornithi-</i> <i>nolytica</i> по Берджи
По сахаролитической активности:	+	+	+	+	+	+
глюкоза	+	+	+	+	+	+
сахароза	+	+	+	+/-	-	+/-
мальтоза	+	+	+	+	+	+
маннит	+	+	+	+	+	+
сорбит	+	+	+	+	+	+
По способности расщепления лактозы	+	+	+	+		-
По сульфитредуцирующей способности	-	-	-	-	+	+
Восстановление нитраты в нитриты	+	+	+	+	+	+
По способности использовать цитрат	+	+	+	+	+	+/-
По способности ацетат натрия	+	+	+	+	-	-
По каталазоположительности	+	+	+	+	+	+
Индолообразование	+	+	+	+	-	-

Примечание – *E. coli* 1, выделенная из почвы; *E. coli* 2, выделенная из воды фонтана; *E. coli* 3, выделенная воды реки Пины; *R. ornithinolytica* (предположительно), выделенная из почвы.

После выделения и корректной идентификации бактерий семейства Enterobacteriaceae и установления степени патогенности провели модифицированный тест Carba NP в пробирках и планшете для ИФА.

Модифицированный тест Carba NP в пробирках показал, что после 18–24 часов инкубации штаммы бактерий *E. coli*, выделенные из воды и почвы, демонстрируют устойчивость к амоксициллину, амоклаву, цефтриаксону, цефепиму и мегасефу. Также штаммы бактерий *E. coli* являются продуцентами бета-лактамаз, на это указывало изменение окраски с малинового цвета питательной среды на оранжевый.

Штамм *R. ornithinolytica* демонстрирует устойчивость ко всем исследуемым бета-лактамам антибиотикам, на это указывало наличие осадка на дне пробирки; но не обладает бета-лактамазной активностью, так как не наблюдалось изменение цвета среды (рисунок 1).

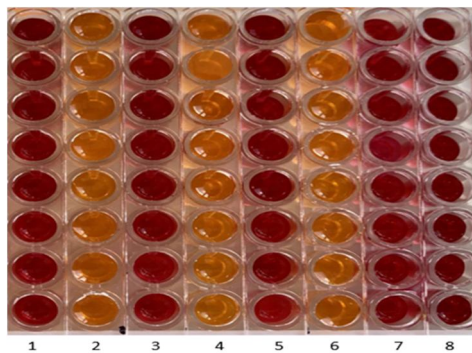


а – амоксициллин, б – амоклав, в – цефтриаксон, г – цефепим, д – мегасеф;
1 – контроль, 2–4 – *E. coli*; 5 – *R. ornithinolytica*

Рисунок 1. – Модифицированный тест Carba NP в пробирках

Модифицированный тест Carba NP в планшете для ИФА показал, что после инкубации менее 2-х часов штаммы бактерий *E. coli*, выделенные из воды и почвы, демонстрируют устойчивость к амоксициллину, амоклаву, амоксикару, аугометину, мегасефу, цефтазидиму, цефтриаксону, цефепиму. Также штаммы бактерий *E. coli* являются продуцентами бета-лактамаз, на это указывало изменение окраски раствора с малинового цвета на оранжевый.

Штамм *R. ornithinolytica* не является продуцентом бета-лактамаз, так не наблюдалось изменение цвета раствора (рисунок 2).



2, 4, 6 – штаммы бактерий *E. coli*, 8 – штамм бактерий *R. ornithinolytica*,
1, 3, 5, 7 – контроль

Рисунок 2. – Модифицированный тест Carba NP в планшете для ИФА

В ходе проведения модифицированного Carba NP теста, было установлено, что не все штаммы семейства Enterobacteriaceae обладают бета-лактамазной активностью. Поэтому диско-

диффузионный метод использовали в качестве дополнительного метода при определении чувствительности к разным группам антибиотиков, в том числе и к бета-лактамам.

Результаты диско-диффузионного метода на определение чувствительности штаммов бактерий *E. coli* и *R. ornithinolytica*, выделенных из почвы и воды, к различным классам антибиотиков представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Результаты определения чувствительности к различным классам антибиотиков штаммов *E. coli* и *R. Ornithinolytica*

Название антибиотика	<i>E. coli 1</i>	<i>E. coli 2</i>	<i>E. coli 3</i>	<i>R. ornithinolytica</i>
Бета-лактамы				
Цефтриаксон	R	R	R	R
Цефепим	R	R	R	R
Цефексим	R	S	S	R
Цефтазидим	R	S	S	S
Цефотаксим	R	R	R	S
Тикарциллин + клавулановая к-та	R	R	R	R
Мерепенем	S	S	S	S
Фторхинолоны				
Ципрофлоксацин	S	R	R	S
Норфлоксацин	S	S	S	S
Моксифлоксацин	S	S	S	S
Перфлоксацин	R	R	R	R
Аминогликозиды				
Амикацин	R	R	R	S
Полипептидный антибиотик				
Бацитрацин	R	R	R	R

Примечание – *E. coli 1*, выделенная из почвы; *E. coli 2*, выделенная из воды фонтана; *E. coli 3*, выделенная из воды реки Пины; *R. ornithinolytica*, выделенная из почвы; R – резистентный микроорганизм к исследуемому антибиотику; S – чувствительный микроорганизм к исследуемому антибиотику

Установлено, что исследуемые штаммы бактерий *E. coli* демонстрируют абсолютную резистентность амикацину, бацитрацину, перфлоксацину, тикарциллину+клавулановой к-те, цефотаксиму, цефепиму и цефтриаксону, однако, штаммы *E. coli*, выделенные из почвы, оказались чувствительными к мерепенему, ципрофлоксацину, норфлоксацину и моксифлоксацину, а штаммы, выделенные из воды, – к цефексиму, цефтазидиму, мерепенему, норфлоксацину и моксифлоксацину. Следовательно исследуемые штаммы *E. coli* обладают множественной лекарственной устойчивостью, что необходимо учитывать при подборе лекарственного препарата.

Необходимо подчеркнуть, что при проведении модифицированного тест Carba NP, штаммы *E. coli*, выделенные из почвы и воды, также демонстрировали устойчивость к цефтриаксону и цефепиму.

Штамм бактерии *R. ornithinolytica* оказался резистентным к цефепиму и цефтриаксону, что коррелирует с полученными нами данные при проведении модифицированного тест Carba NP. Кроме того, данный штамм также демонстрировал устойчивость к цефотаксиму, тикарциллину+клавулановой кислоте, бацитрацину и перфлоксацину, однако, оказался чувствительным к цефтазидиму, цефотаксиму, мерепенему, ципрофлоксацину, норфлоксацину, моксифлоксацину и амикацину. Исследуемый штамм *R. ornithinolytica* также обладает множественной лекарственной устойчивостью, что необходимо учитывать при подборе лекарственного препарата.

Учитывая выше представленные данные, можно заключить, что для упрощения и ускорения проведение мониторинга эффективно использовать как модифицированные тесты Carba NP, так и диско-диффузионный метод, результаты которых легко интерпретировать и использовать для дальнейшего прогноза развития резистентности к антибиотикам бактерий семейства *Enterobacteriaceae*.

Список использованных источников

1. Молекулярная характеристика Enterobacterales с продукцией БЛРС / С. А. Хрульнова [и др.] // КМАХ. – 2018. – Т. 20, № 4. – С. 375-380.
2. Выделение штаммов Escherichia coli и Klebsiella, продуцирующих бета-лактамазы, и их антибиотикорезистентность [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://vetkuban.com/num1_202208.html. – Дата доступа: 24.10.2023.
3. Резистентность микроорганизмов, обусловленная бета-лактамазами, и способы ее преодоления [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.mif-ua.com/archive/article/4011>. – Дата доступа: 24.10.2023.
4. Реализация системы мониторинга антибиотикорезистентности [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://monitoring.amrcloud.net/>. – Дата доступа: 24.10.2023.