

**ВИВЧЕННЯ ПЛАЗМІДНИХ ДНК ВАРІАНТІВ *Escherichia coli* 1257,
СТІЙКИХ ДО РЯДУ ДЕЗІНФЕКТАНТІВ**

В.В. Лук'янчук, канд. біол. наук;

Л.В. Поліщук, канд. біол. наук

Інститут мікробіології і вірусології НАН України, м. Київ

*В штамме *Escherichia coli* 1257, виділеному у хворого во время вспышки внутрібольничної інфекції, обнаружен плазмид рЕС1257 (5,0 тпн).*

*Использование дезинфектантов с концентрацией, меньше летальной, приводит к биостатическому, мутагенному и токсическому действиям; при этом в клетке могут происходить мутации хромосомной и плазмидной ДНК, элиминация плазмид и другие процессы. Изучалась плазмидная ДНК у вариантов *Escherichia coli* 1257, устойчивых к дезинфектантам, принадлежащим к различным группам (альдегидсодержащие, производные гуанидина и четвертичные аммониевые соединения). Плазмидные ДНК были выявлены у всех шести устойчивых вариантов. Их рестрикционный анализ не выявил изменений ни в молекулярном размере, ни в количестве или расположении сайтов узнавания для эндонуклеаз рестрикции *Vsp119I* и *VatHI*.*

*Ключевые слова: *Escherichia coli*, дезинфектант, устойчивость, плазмиды, рестриктаза.*

*У штаму *Escherichia coli* 1257 (що виділений від хворого під час спалаху внутрішньолікарняної інфекції) було виявлено плазмиду рЕС1257 (5,0 тпн).*

*При застосуванні менших, ніж летальна, концентрацій дезінфектанти здійснюють бактеріостатичну, мутагенну та токсичну дію, при цьому в клітині можуть мати місце мутації хромосомної та плазмідної ДНК, елімінація плазмід тощо. Досліджувалися плазмідні ДНК варіантів *Escherichia coli* 1257, стійких до дезінфектантів, які належать до різних груп (альдегідвмісне, похідне гуанідину та четвертинна амонієва сполука). Плазмідні ДНК було виявлено у всіх шести стійких варіантів. Їх рестрикційний аналіз не виявив змін ні в молекулярних розмірах, ні у кількості чи розміщенні сайтів пізнавання для ендонуклеаз рестрикції *Vsp119I* та *VatHI*.*

*Ключові слова: *Escherichia coli*, дезінфектант, стійкість, плазмід, рестриктаза.*

ВСТУП

Відкриття антибактеріальної, фунгіцидної та противірусної активності хімічних сполук (як природних, так і синтетичних) та застосування їх для боротьби зі збудниками інфекційних захворювань є одним з важливих досягнень медицини ХХ-го сторіччя [1]. Як біоциди (антибіотики, антисептики, дезінфектанти, консерванти тощо) використовуються сполуки різного походження та хімічної будови [2]. Так, наприклад, всі дезінфекційні засоби (ДЗ) умовно поділяють на п'ять груп: спирти, хлорвмісні речовини, гуанідини, сполуки четвертинного амонію (ЧАС) та альдегідвмісні речовини. Однак у зв'язку з поширенням серед мікроорганізмів стійкості до біоцидів (особливо до антибіотиків та дезінфектантів) пошук нових речовин продовжується у багатьох лабораторіях світу [3].

Біоциди, залежно від їх хімічної будови, мають різні механізми дії на клітину у цілому та на її окремі структури [2, 4]. Встановлено, що при застосуванні менших, ніж летальна, концентрацій дезінфектанти здійснюють бактеріостатичну, мутагенну та токсичну дію [2, 5, 6]. При цьому у клітині можуть мати місце мутації хромосомної та плазмідної ДНК, елімінація плазмід тощо [7, 8].

Відомо, що ряд плазмід *Escherichia coli* кодують стійкість до біоцидів: загальновідома детермінація ними стійкості до антибіотиків, виявлена і детермінація резистентності до дезінфектантів (наприклад, плазміда R124 несе гени стійкості до деоксихлориду) [7, 8, 9].

МЕТА ДОСЛІДЖЕНЬ

Метою даної роботи було дослідження впливу багаторазового пасажування штаму *Escherichia coli* 1257 за наявності ряду дезінфектантів (альдегідвмісний, похідне гуанідину та ЧАС) на плазмідний статус клітин та на ряд важливих фізичних характеристик плазміди рЕС1257.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Мікроорганізми, плазмідні ДНК яких досліджувалися, наведені у таблиці 1.

В експериментах використовували середовища МПБ та МПА.

Плазмідну ДНК з *Escherichia coli* отримували методом, який запропонував Кізер [11]. Рестрикційний аналіз плазмідних ДНК проводили за методикою, що представлена в керівництві Маніатіса та співавторів [12]. Електрофорез проводили в 0,8 % агарозі у ТБЕ-буфері [12]. Як стандарт молекулярних розмірів фрагментів плазмідної ДНК використовували HindIII-фрагменти ДНК фага λ [13]. У роботі використовували ДНК фага λ , рестриктази і стандартні буфери для рестрикції фірми "Ферментас" (Литва) [13].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Штам *E. coli* 1257 було досліджено на наявність плазмідної ДНК і виявлено плазмиду рЕС1257 (5 тпн). Встановлено, що на плазміді є унікальні сайти рестрикції для 5 рестриктаз (Bsp120I, SalGI, Eco47I, BamHI та BglII), 2 сайти рестрикції для ферменту Bsp119I та жодного - для 4 рестриктаз (PstI, EcoRI, XbaI та HindIII) [10].

Було проведено дослідження чутливості даного бактеріального штаму до ряду ДЗ, що належали до різних груп (альдегідвмісні, похідні гуанідину та ЧАС), і після багатоетапного пасажування (у ряді випадків понад 30 пересівів) здійснено відбір ряду стійких до них варіантів (таблиця 1).

Таблиця 1 - Культури *Escherichia coli*, які використані у роботі

Мікроорганізм	Умова отримання	Джерело отримання
<i>E. coli</i> 1257 (рСЕ1257) [10]	Вихідна культура, ізольована від хворого під час ВЛІ	Отримано від Рубан Н.М. з колекції культур лабораторії дезінфектології Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського, АМН України
Стійкий варіант Сва-1 (рСва-1)	27 пасажів на ДЗ з групи альдегідвмісних (0,017%)	
Резистентний варіант Сва-2 (рСва-2)	31 пасаж на ДЗ з групи альдегідвмісних (0,008%)	
Резистентний варіант Сва-3 (рСва-3)	31 пасаж на ДЗ з групи альдегідвмісних (0,017%)	
Резистентний варіант Сва-4 (рСва-4)	35 пасажів на ДЗ з групи альдегідвмісних (0,028%)	
Резистентний варіант СвГ-101 (рСвГ-101)	18 пасажів на ДЗ з групи гуанідинів	
Резистентний варіант СвЧ-201 (рСвЧ-201)	18 пасажів на ДЗ, що містить ЧАС	

Відібрані резистентні варіанти і було досліджено на наявність плазмідної ДНК (табл. 2). Як видно з таблиці 2, позахромосомна ДНК наявна у всіх шести досліджених резистентних варіантах. Плазмідні ДНК, що виділені з клітин з різною стійкістю до альдегідвмісного ДЗ (рСвА-1, рСвА-2, рСвА-3, рСвА-4) та клітин, які стійкі до похідного гуанідину (рСвГ-101) чи ЧАС (рСвЧ-201), мають однакову електрофоретичну рухливість, що тотожна рухливості плазміді вихідного штаму (рЕС1257).

Таблиця 2 - Наявність плазмідної ДНК у резистентних варіантах *E.coli* 1257

Мікро-організм	Наявність плазмідної ДНК	Кількість і розмір фрагментів, утворених ендонуклеазами, тпн		Молекулярний розмір плазміді, тпн
		BamHI	Bsp119I	
Вихідний штаму <i>E. coli</i> 1257	Виявлена (рЕС1257)	1 - 5,0	2 - 2,0; 3,0	5,0
СвА-1	Виявлена (рСвА-1)	1 - 5,0	2 - 2,0; 3,0	5,0
СвА-2	Виявлена (рСвА-2)	1 - 5,0	2 - 2,0; 3,0	5,0
СвА-3	Виявлена (рСвА-3)	1 - 5,0	2 - 2,0; 3,0	5,0
СвА-4	Виявлена (рСвА-4)	1 - 5,0	2 - 2,0; 3,0	5,0
СвГ-101	Виявлена (рСвГ-101)	1 - 5,0	2 - 2,0; 3,0	5,0
СвЧ-201	Виявлена (рСвЧ-201)	1 - 5,0	2 - 2,0; 3,0	5,0

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

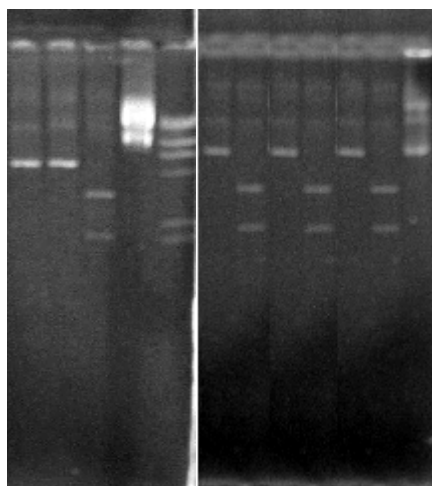


Рисунок 1 - Електрофореграма рестриктів плазміді рЕС1257 та плазмідних ДНК стійких варіантів:

Доріжки:

- 1 - рЕС1257+ SalGI,
- 2 - рЕС1257+ BamHI,
- 3 - рЕС1257+ Bsp119I,
- 5, 12 - λ + HindIII.
- 6 - рСвА-1 + BamHI,
- 7 - рСвА-1 + Bsp119I,
- 8 - СвГ-101 + BamHI,
- 9 - рСвГ-101 + Bsp119I,
- 10 - рСвЧ-201 + BamHI,
- 11 - рСвЧ-201 + Bsp119I

Було проведено рестрикційний аналіз плазмідних ДНК, стійких до ДЗ-варіантів, з використанням 2 ендонуклеаз рестрикції (Bsp119I та BamHI) для дослідження нуклеотидної будови плазмідних ДНК, однак не виявлено змін у кількості чи молекулярних розмірах утворених фрагментів під дією цих ендонуклеаз рестрикції (рис. 1).

ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Речовини, які застосовуються як ДЗ (залежно від хімічної будови), мають різні механізми дії на клітину в цілому та на її окремі структури [2, 4, 5, 7].

Так, наприклад, однією з найбільш вживаних у різних галузях господарства є ЧАС-група дезінфектантів [4, 14]. Для цих сполук характерний мембраноатакуючий механізм дії на мікробну клітину. ДЗ цього типу руйнують біополімери клітинних мембран, що призводить до лізису клітин. Однак ці самі речовини у менших концентраціях призводять до порушення функцій мембран, у тому числі і до порушень реплікації хромосомних та плазмідних ДНК [4]. Таким чином, у клітині, що вижила, можуть мати місце мутації хромосом та плазмід, зміна плазмідного статусу тощо [2, 5, 6, 7].

Здебільшого механізми дії біоцидів та механізми стійкості мікроорганізмів до них невідомі. Як вважають, детермінанти резистентності мають здебільшого хромосомну локалізацію. Однак є дані про плазмідну локалізацію генів стійкості до біоцидів різної хімічної будови та сфер застосування [15, 16, 17]. Детермінація плазмідами стійкості до антибіотиків загальновідома, однак є дані про кодування плазмідами резистентності і до дезінфекційних засобів [18, 19]. Опубліковані дані про здатність R-плазмід підвищувати стійкість до таких амоніумвмісних антибактеріальних речовин, як цетримід та хлорид бензалконіум [19, 20].

Наші дослідження впливу багаторазового пасажування клінічного штаму *Escherichia coli* 1257 за наявності ДЗ, що належали до різних груп (альдегідвмісні, похідні гуанідину та ЧАС), на плазмідні ДНК клітин не виявили змін у плазмідному статусі жодного зі стійких варіантів штаму: не спостерігалось ні елімінації плазмід, ні збільшення їх кількості. Не виявлено і змін у таких важливих фізичних характеристиках молекул плазмідних ДНК шести отриманих стійких варіантів, як молекулярний розмір, кількість або розміщення сайтів пізнавання для 2 використаних рестриктаз.

Як відомо, хімічні речовини, що набули широкого застосування у всіх галузях діяльності людини чи-то як гербіциди, чи-то як дезінфектанти, здійснюють значний вплив як на мікрофлору навколишнього середовища, так і на мікрофлору людини. Така дія призводить до змін у спадковості клітини та/чи її метаболізмові [6, 9, 17, 18].

Загальновідомі мутації хромосомної ДНК мікроорганізмів під дією хімічних речовин, які використовуються у промисловості, сільському господарстві, побуті та медицині. Відомо також про зміни у плазмідному статусі мікроорганізмів під дією хімічних речовин: елімінацію плазмід, ексцизію їх з хромосоми, про асоціацію та дисоціацію плазмід тощо [6, 19, 20]. Однак мало є інформації про зміни нуклеотидної будови плазмід під дією біоцидів. Вважають, що це пов'язано зі значною стабільністю плазмідної ДНК у клітинах, з недостатністю інформації про їх нуклеотидну будову і детерміновані ними властивості та рядом інших причин [8, 9, 19, 20].

ВИСНОВКИ

1 З вищенаведених результатів можна зробити висновок про відсутність впливу довготривалої дії трьох досліджуваних дезінфекційних

речовин (групи альдегідвмісні, похідні гуанідину та ЧАС) на плазмідний статус клінічного штаму *Escherichia coli* 1257.

2 Не виявлено мутагенної дії цих досліджуваних дезінфекційних речовин на плазмиду pEC1257 – розмір фрагментів, що утворюються при гідролізі ендонуклеазами Bsp119I та BamHI плазмідних ДНК, варіантів з різною стійкістю до альдегідвмісного ДЗ (pCVA-1, pCVA-2, pCVA-3, pCVA-4) та варіантів, що стійкі до похідного гуанідину (pCVG-101) чи ЧАС (pCVЧ-201), мають однакову електрофоретичну рухливість, яка тотожна молекулярному розмірові відповідних фрагментів плазмиди вихідного штаму (pEC1257).

3 Необхідно дослідити зміни ряду фізіологічних та біохімічних характеристик стійких варіантів штаму *Escherichia coli* 1257 - це дозволить отримати додаткову інформацію про вірогідні зміни в нуклеотидних послідовностях їх позахромосомних ДНК та/чи виявити вплив даного ДЗ на метаболізм мікроорганізму в цілому.

SUMMARY

STUDYING OF PLASMID DNAs OF *Escherichia coli* 1257 VARIANTS, THAT ARE RESISTANT TO SOME OF DISINFECTING AGENTS

V.V. Lukyanchuk, L.V. Polishchuk

Institute of microbiology and virology of NAS of Ukraine,

Plasmid pEC1257 (5,0 kb) was found at strain Escherichia coli 1257 (which has been isolated from a patient during flash of an intrahospital infection).

Application of disinfectants in less than lethal concentrations results in bacteriostatic, mutagenic and toxic effects. Mutations of chromosomal and plasmid DNA, elimination of plasmid and some other events occur in a survive cells. Studying of plasmid DNAs of Escherichia coli 1257 variants which were resistant to disinfectants, belonging to various groups (aldehydes, guanidines, and quaternary ammoniums) was carried out. Plasmid DNAs have been revealed at all six resistant variants of Escherichia coli 1257. Restriction analysis of them found changes neither in the molecular sizes of them, nor in quantity or in localization of restriction sites for endonucleases Bsp119I and BamHI.

Key words: Escherichia coli, disinfectant, stability, plasmid, endonuclease.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Савохина М.В. Изучение антибактериальной и фунгицидной активности солей замещенных акридил-9-тиоуксусных кислот/ М.В. Савохина / Вісник СумДУ. Серія Медицина. - 2007. - №2 (73). - С. 32-36.
2. Зарицький А.М. Дезінфектологія. Ч.1. – Житомир: Рута. - 2001. - 383 С.
3. Галушко Н.А. Порівняльний аналіз чутливості до дезінфектантів сучасних і музейних штамів шигел / Н.А. Галушко // Вісник СумДУ. Серія Медицина. - 2006. - №2 (72). - С. 24-25.
4. Пути создания эффективных и безопасных антимикробных жидких средств и эволюция общественного восприятия дезинфекционных мероприятий /Бахир В.М., Леонов Б.И., Паничева С.А., Прилуцкий В.И., Шомовская Н.Ю., Стрельников И.И., Сучков Ю.Г. // Дезинфекционное дело. - 2004. - №3. - С.46-49.
5. McDonnell G. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance /G.McDonnell, A.D.Russell // Clin. Microbiol. Rev. - 1999. - N 1 (12). - P.147-179.
6. Alp S. Bacterial resistance to antiseptics and disinfectants // Microbiol bul. - 2007. - №1 (41). - P155-161.
7. Thomas L. Antimicrobial activity of chlorhexidine diacetate and benzalkonium chloride against *Pseudomonas aeruginosa* and its response to biocide residues residues / L.Thomas, A.D.Russell, J.Y.Maillard// J Appl Microbiol. - 2005. - N3(98). - P.533-543.
8. Russell A.D. Plasmids and bacterial resistance to biocides/ A.D.Russell // J. Appl. Microbiol. - 1997.-N 2(83). - P. 155-165.
9. Russell A.D. Do biocides select for antibiotic resistance?/ A.D.Russell // Journal of Pharmacy and Pharmacology. - 2000. - N 2 (52). - P. 227-233.
10. Плазмиди штаму *Escherichia coli* / Марієвський В.Ф., Рубан Н.М., Кролевецька Н.М., Лук'яничук В.В., Поліщук Л.В. //Лабораторна діагностика. - 2006. - №4 (38). - С.35-37.
11. Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli* / Kieser T. // Plasmid. - 1984. – Vol.12. - P.19-36.
12. Маниатис Т. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбук. - М.: Мир, 1984. - 356 с.

13. Каталог фірми MBI. Fermentas. - 2007-2008.
14. Четвертичные аммониевые соединения, обладающие противомикробной активностью: / Желдакова Р.А., Ольховник В.К., Садрия М., Матвеев Ю.В., Василевский Д.А., Крень Е.А. // «Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы VI научной конференции. – Минск, 2008. - Т.2. - С.112-114.
15. Envelope protein changes, autoagglutination, sensitivity to hydrophobic agents and a conditional division lesion in Escherichia coli strains carrying ColV virulence plasmids /Rowbury R.J., Deeney C.M., Reakes C., Rossouw F.T., Smith D.G., Tewari R. // Ann. Inst. Pasteur Microbiol. - 1985. - 1 (36A). - P.147-157.
16. Rossouw F.T. Effects of the resistance plasmid R124 on the level of the OmpF outer membrane protein and on the response of Escherichia coli to environmental agents / F.T.Rossouw, R.J.Rowbury// J. Appl. Bacteriol. - 1984. - № 1 (56). - P.63-79.
17. Russell A.D. Antibiotic and biocide resistance in bacteria /A.D.Russell, M.J.Day // Microbios. - 1996. - No342 (85). - P.45-65.
18. Russell A.D. Bacterial resistance to disinfectants : present knowledge and future problems / A.D. Russell // J. Hosp. Infection. - 1999. - No43. - P.S57-68.
19. Пехов Ф.П. Плазмиды/ Ф.П. Пехов. - М.: Медицина, 1986.-225 с.
20. Брода П. Плазмиды/ П.Брода. - М.: Мир, 1982.-220 с.

Надійшла до редакції 16 квітня 2009 р.