**АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЛАКТОБАЦИЛЛ - ПРОБИОТИКОВ**

Савицкая И.С, Жубанова А.А., КистаубаеваА.С., Болекбаева А.Б.

Казахский национальный университет им.аль-Фараби

Для разработки новых препаратов пробиотического действия постоянно ведется поиск новых активных штаммов, отбор которых осуществляется по общепринятым в этой области исследований критериям. Это активное кислотообразование, высокая антагонистическая и адгезивная активность, устойчивость к антибиотикам [1]. Последнее связано с тем, что пробиотики в большинстве своем чувствительны к некоторым широко применяющимся в клинике антибактериальным препаратам, поэтому их использование совместно с антибиотиками считается неоправданным [2]. Для решения вопроса о возможности сочетанного применения пробиотиков и антибиотиков необходимо располагать сведениями о чувствительности к ним новых штаммов, на основе которых разрабатываются новые пробиотические препараты.

В связи с этим, цель исследований- определить спектр и генетическую природу антибиотикорезистентности штаммов лактобацилл.

**Материалы и методы**

В качестве объектов исследования использованы 12 новых штаммов лактобацилл, выделенных из кишечника 40 детей и взрослых обоего пола, не имеющих в анамнезе инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Чувствительность лактобактерий к антибиотикам определяли методом серийных разведений [2]. Выделение плазмидной ДНК проводили методом, описанным Lee S.Y. [3]. Электрофорез препаратов плазмидной ДНК проводили в горизонтальном 0,7% агарозном геле. Элиминацию плазмидной ДНК осуществляли путем инкубации исследуемых штаммов в среде, содержащей бромид этидия или акрифлавин в субингибиторных концентрациях.

Результаты и обсуждение

Для получения информации о природной устойчивости штаммов лактобацилл к антибактериальным препаратам определяли спектр их лекарственной устойчивости с помощью метода серийных разведений для определения минимальной подавляющей концентрации (МПК) (таблица 1).

Таблица 1 - Уровень антибиотикорезистентности штаммов лактобацилл

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Штамм | МПК (мкг/мл) антибиотиков в отношении различных штаммов лактобацилл | | | | | | | | |
| Амино-гликозиды | | β-лактамы | | Фторхинолоны | | Тетра-циклин | Це-фа-лоспорины | Макро-ли-ды |
| Km | Gm | Ap | Am | Cip | Ofl | Tc | Cef | Ery |
| АА-1 | 10 | 10 | 5 | 5 | 20 | 10 | 50 | 30 | 5 |
| АА-9 | 5 | 20 | 10 | 2,5 | 10 | 5 | 50 | 10 | 10 |
| AI-17 | 50 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 50 | 5 | 10 |
| AK-2 | 50 | 20 | 10 | 2,5 | 20 | 20 | 20 | 10 | 2,5 |
| AK-5 | 50 | 20 | 10 | 5 | 10 | 10 | 10 | 5 | 5 |
| AK-9 | 50 | 10 | 2,5 | 5 | 20 | 5 | 50 | 20 | 5 |
| AP-1 | 20 | 20 | 5 | 5 | 10 | 20 | 50 | 20 | 5 |
| AP-5 | 10 | 10 | 10 | 10 | 5 | 10 | 50 | 10 | 10 |
| AП-4 | 50 | 5 | 5 | 10 | 5 | 5 | 20 | 5 | 5 |
| AC-1 | 50 | 20 | 10 | 5 | 10 | 5 | 50 | 10 | 10 |
| AC-31 | 50 | 20 | 5 | 2,5 | 20 | 10 | 10 | 20 | 10 |
| LK-7 | 50 | 20 | 2,5 | 10 | 10 | 20 | 20 | 10 | 10 |
| Примечание: Km-канамицин,Gm-гентамицин, Ap-ампициллин, Am – амоксициллин, Cip – ципрофлоксацин, Ofl – офлоксацин, Tc – тетрациклин, Cef-цефазолин, Ery-эритромицин. | | | | | | | | | |

Поскольку уровни чувствительности исследуемых штаммов к взятым антибиотикам сильно различаются, возникла определенная сложность с интерпретацией данных. Четких критериев для отнесения того или иного штамма лактобацилл к чувствительным или резистентным не существует. В связи с этим эмпирически в качестве пограничных МПК были выбраны те концентрации из серии разведений препаратов, которые задерживали рост хотя бы одного из исследованных штаммов: для канамицина, тетрациклина – 50 мкг/мл, для цефазолина – 30 мкг/мл, для гентамицина, ципрофлоксацина, офлоксацина – 20 мкг/мл, для ампициллина, амоксициллина, эритромицина – 10 мкг/мл. Эти МПК встречаются и у других исследователей [2; 4].

Все исследуемые штаммы лактобацилл были одновременно устойчивы к нескольким препаратам. 5 штаммов: АА-1, AI-17, АК-5, АК-9 и АР-1 имели по 3 маркера антибиотикорезистентности. Штаммы АА-9 и АП-4 были устойчивы к четырем, штаммы АК-2, АР-5, АС-1, АС-31 к пяти, а штамм LK-7 обладал множественной устойчивостью сразу к 6 антимикробным препаратам (таблица 2).

Таблица 2 – Спектр антибиотикорезистентности 12 штаммов лактобацилл

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Штамм | Количество маркеров | Фенотип устойчивости |
| АА – 1 | 3 | Cef Tc Cip |
| AI – 17 | 3 | Km Tc Ery |
| AK – 5 | 3 | Km Gm Ap |
| AK – 9 | 3 | Km Tc Cip |
| AP – 1 | 3 | Gm Tc Ofe |
| AA – 9 | 4 | Gm Ap Tc Ery |
| АП - 4 | 4 | Km Gm Am Ofe |
| AK - 2 | 5 | Km Gm Ap Cyp Ofe |
| AP – 5 | 5 | Km Ap Am Tc Ery |
| AC – 1 | 5 | Km Gm Ap Tc Ery |
| AC – 31 | 5 | Km Gm Cyp Ofe Ery |
| LK – 7 | 6 | Km Gm Am Tc Ofe Ery |

Большинство штаммов оказались устойчивыми к следующим антибиотикам: (в убывающем порядке) канамицину (9 штаммов), гентамицину (8 штаммов), тетрациклину (устойчивость наблюдается также у 8 штаммов), эритромицину (6 штаммов), ампициллину и офл0ксацину (устойчивость к ним выявлена у 5 штаммов), ципрофлоксацину (4 штамма), амоксицилину (3 штамма) и только штамм АА-1 обладал резистентностью к цефазолину. Всего было выявлено 12 различных сочетаний маркеров устойчивости, т.е. каждый штамм имел индивидуальный спектр антибиотикорезистенности.

Генетической основой антибиотикорезистентности являются мутации в собственной ДНК микроорганизмов или внедрение чужеродной, т.е., приобретение бактериями устойчивости к антибиотикам может иметь мутационую природу или детерминироваться приобретением плазмид резистентности. В последнем случае теоретически может происходить неконтролируемая передача плазмидных генов антибиотикорезистентности. В настоящее время микробиологи озабочены возможной ролью молочнокислых бактерий в распространении генов лекарственной устойчивости. Показана возможность передачи R-плазмид от диких и «пробиотических» культур лактобацилл различным видам грампозитивных бактерий в условиях *in vitro* и *in vivo* [1; 5]. Эти находки настораживают и требуют контроля стартерных культур молочнокислых бактерий, используемых для производства продуктов питания, на отсутствие «опасных» плазмид. Представляется целесообразным включение в препараты-пробиотики резистентных штаммов, устойчивость которых контролируется хромосомой.

При исследовании антибиотикорезистенности 12 штамммов лактобацилл установлена высокая нестабильность этого признака. Так, при хранении штаммов в неселективных условиях спонтанная утрата одного или нескольких маркеров происходила уже после одного пассажа. Дополнительная обработка тестированных клонов этих штаммов с разным спектром резистенности кратковременным нагреванием 750С в течение 5 секунд) показала, что в этих условиях поисходит утрата устойчивости к химиопрепаратам (таблица 3).

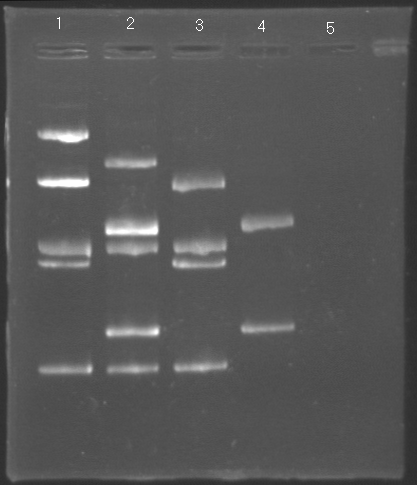
Таблица 3 – Частота (в %) утраты маркеров антибиотикорезистенности у 12 штаммов лактобацилл после кратковременного воздействия повышенной температуры

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Штамм | Маркер антибиотикорезистентности | | | | | | | | |
| Km | Gm | Ap | Am | Cip | Ofe | Tc | Cef | Ery |
| АА – 1 | - | - | - | - | 0 | - | 77 | 0 | - |
| AI – 17 | 55 | - | - | - | - | - | 75 | - | 88 |
| AK – 5 | 44 | 100 | 89 | - | - | - | - | - | - |
| AK – 9 | 68 | - | - | - | 0 | - | 55 | - | - |
| AP – 1 | - | 66 | - | - | - | 0 | 88 | - | - |
| AA – 9 | - | 33 | 96 | - | - | - | 100 | - | 55 |
| АП – 4 | 37 | 100 | - | 58 | - | 0 | - | - | - |
| AK – 2 | 58 | 93 | 45 | - | 0 | 0 | - | - | - |
| AP – 5 | 100 | - | 72 | 67 | - | - | 92 | - | 73 |
| AC – 1 | 37 | 53 | 83 | - | - | - | 100 | - | 100 |
| AC -31 | 100 | 100 | - | - | 0 | 0 | - | - | 38 |
| LK – 7 | 47 | 68 | - | 100 | - | 0 | 100 | - | 76 |

Наиболее часто утрачивалась устойчивость к беталактамным препаратам, аминогликозидам тетрациклину и эритромицину. Выявленная нестабильность антибитикорезистентности лактобацилл к этим антибиотикам отмечается и другими авторами [5]. Этому можно найти объяснение, если предположить, что детерминанты устойчивости к этим антибиотикам имеют плазмидную локализацию, а к фторхинолонам и цефазолину – хромосомную. Это предположение нашло экспериментальное подтвержение.

Нестабильность многих физиологических свойств промышленных штаммов лактобацилл может объясняться экстрахромосомной локализацией некоторых генов. При этом многие исследователи пытались связать конкретные фенотипические черты, характеристики с определенными плазмидами по факту соответствия одновременной утраты плазмиды и признака. Потеря плазмиды может произойти спонтанно или после соответствующей обработки (повышенная температура, акридиновый оранжевый, акрифлавин, бромид этидия, рифампицин). Например, у штамма *L.fеrmentum*, изолированном из фекалий, обнаружены плазмиды, кодирующие устойчивость к тетрациклину и эритромицину. Основанием для подобного заключения явилась одновременная утрата тетрациклинрезистентности и плазмиды молекулярной массой 10 МД после обработки акрифлавином [5]. Выращивание при повышенной температуре или обработка бромидом этидия сопровождалась элиминацией плазмид с одновременной потерей устойчивости к бацитрацину, хлорамфениколу и олеандомицину [6]. При элиминации плазмид лактобациллы становились чувствительными к стрептомицину, неомицину, гентамицину, канамицину, террамицину, рифампицину, полимиксину, колистину [4].

При выборочном исследовании у четырех штаммов установлено наличие плазмидной ДНК. Штаммы АС-31 и АК-2 содержали по 3 плазмиды, у штамма АР-1 обнаружено по 2 полосы плазмидной ДНК и штамм АА-1 содержал одну плазмиду (рисунок 1).



###### Рисунок 1 – Плазмидный профиль штаммов лактобацилл

1- *L.salivarius* AC-31; 2- *L.fermentum* АК-2; 3-*L.plantarum* АР-1;

4- *L.acidophilus* АА-1; 5 –ДНК культур лактобацилл после элиминации плазмид

В соответствии с выявленными маркерами и данными электрофореза препаратов ДНК сравнивали уровни устойчивости к 9 антибиотикам у штаммов, содержащих плазмиды и их безплазмидных производных, которые были получены в результате воздействия этидиумбромида и акрифлавина. Данные этих экспериментов приведены в таблице 4.

Таблица 4 - Уровни антибиотикорезистентности штамммов, содержащих плазмиды и их безплазмидных производных

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Штаммы | Вариант | МПК, мкг/мл | | | | | |
| Km | Gm | Ap | Cip | Ofl | Ery |
| AA - 1 | исходный | 10 | 10 | 5 | 20 | 10 | 5 |
| + ЭБ | 10 | 5 | 5 | 20 | 10 | 5 |
| +АФ | 10 | 5 | 5 | 20 | 10 | 5 |
| AP - 1 | исходный | 20 | 20 | 5 | 10 | 20 | 5 |
| + ЭБ | 20 | 5 | 5 | 10 | 20 | 5 |
| +АФ | 20 | 2,5 | 5 | 10 | 20 | 5 |
| AK - 2 | исходный | 50 | 20 | 10 | 20 | 20 | 2,5 |
| + ЭБ | 10 | 5 | 5 | 20 | 20 | 2,5 |
| +АФ | 5 | 5 | 2,5 | 20 | 20 | 2,5 |
| AC - 31 | исходный | 50 | 20 | 5 | 20 | 10 | 10 |
| + ЭБ | 10 | 5 | 5 | 20 | 10 | 5 |
| +АФ | 10 | 5 | 5 | 20 | 10 | 2,5 |

Воздействие на указанные культуры классических факторов, приводящих к потере плазмид привело к одновременной утрате признаков устойчивости к гентамицину у штаммов *L.salivarius* AC-31, *L.plantarum* АР-1 и *L.fermentum* АК-2, в то же время их плазмидный профиль свидетельствует о наличии во всех трех штаммах одинаковой по размеру плазмиды (рисунок 1), которая может содержать гены, контролирующие устойчивость к нему. Элиминация плазмид сопровождалась потерей резистентности к канамицину у штаммов *L.salivarius* AC-31 и *L.fermentum* АК-2 (они также имеют общую полосу плазмидных ДНК). Аналогичный результат был получен и для тетрациклина, т.е. потеря плазмид коррелировала с появлением чувствительности к этому антибиотику у ранее резистентных штаммов *L.plantarum* АР-1 и *L.acidophilus* АА-1. У этих культур также отмечено одновременное присутствие одной идентичной полосы. Кстати, по данным электрофореза в штамме *L.acidophilus* АА-1 присутствует только 1 плазмида, но после ее утраты у этого штамма сохраняется резистентность к ципрофлоксацину и офлоксацину. Эти данные свидетельствуют в пользу предположения о локализации в плазмидах детерминант устойчивости в канамицину, гентамицину, тетрациклину, ампициллину и эритромицину. О таком расположении генов, определяющих устойчивость к этим антибиотикам, уже упоминалось ранее при исследовании плазмид у лактобактерий [2].

Сохранение резистентности к ципрофлоксацину, офлоксацину, и цефазолину у безплазмидных вариантов этих же штаммов говорит о возможном расположении данных детерминант в хромосоме. Для дополнительного подтверждения обнаруженного феномена проведена серия экспериментов по многократному пассированию указанных штаммов на селективных средах, содержащих данные антибиотики и без них. Результаты суммированы в таблице 5.

Таблица 5 – Антибиотикочувствительность штаммов, содержащих плазмиды после многократных пересевов на средах с антибиотиками и без них

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Штаммы | Присутствие антибиотика в среде | Km | Gm | Ap | Cip | Ofl | Ery |
| AA - 1 | + | S | R | S | R | S | S |
| – | S | S | S | R | S | S |
| AP - 1 | + | S | R | S | S | R | S |
| – | S | S | S | S | R | S |
| AK - 2 | + | R | R | R | R | R | S |
| – | S | S | S | R | R | S |
| AC - 31 | + | R | R | S | R | S | R |
| – | S | S | S | R | S | S |
| *Примечание:* R – резистентный; S – чувствительный. | | | | | | | |

Оказалось, что в процессе неоднократных (20-30) пассажей на селективных средах с антибиотиками, все резистентные к ним культуры остаются таковыми. Однако, исключение антибиотика из ростовой среды приводит к спонтанной утрате маркеров резистентности к канамицину, гентамицину, ампициллину, тетрациклину, эритромицину. Устойчивость штаммов к антибиотикам ципрофлоксацину и офлоксацину сохраняется при повторных пересевах, даже когда все штаммы были свободны от плазмидной ДНК.

Механизм бактерицидного действия фторхинолоновых препаратов последнего поколения ципрофлоксацина и офлоксацина связан с ингибированием двух жизненно важных для бактериальной клетки ферментов из группы топоизомераз – ДНК-гиразы (в большей степени) и топоизомеразы IV. Эти ферменты осуществляют конформационные изменения в молекуле бактериальной ДНК, необходимые для ее нормальной репликации ДНК. Гены обоих ферментов находятся на бактериальной хромосоме [7].

В связи с этим на первых этапах клинического применения фторхинолов полагали, что резистентность микроорганизмов к ним практически не будет развиваться. Основаниями для такого суждения были спецефический механизм антимикробного действия, быстрый бактерицидный эффект и отсутствие убедительных данных о плазмидном механизме передачи устойчивости для класса хинолонов [8]. Однако сейчас очевидно, что проблема антибиотикорезистентности в полной мере затрагивает и эту группу антибиотиков. Резистентность микроорганизмов к фторхинолам развивается медленно по типу хромосомной и связана с мутациями в генах, кодирующих ДНК-гиразу или топоизомеразу IV. Уровень резистентности бывает более высоким при многоступенчатых мутациях. При этом резистентность развивается только к фторхинолам [9].

Приведенная информация находится в полном соответствии с полученными в работе данными и дает основание заключить, что резистентность штаммов лактобацилл к ципрофлоксацину и офлоксацину имеет хромосомную природу.

**Литература:**

1 Бондаренко В.М., Грачева Н.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериозы кишечника у взрослых. КМК Scientific Press: М. - 2003. – 220 с.

2 Лыкова Е.А. Антибиотиковая резистентность штаммов входящих в состав препаратов пробиотиков //ЖМЭИ. – 2000. - №2. - С. 64-66.

3 Lee S.Y., Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA // Biotechniques. – 1990. - Vol.9. - N6. - P. 676-979.

4 Козлова Е.В., Пивоваренко Т.В., Малиновская И.В., Аминов Р.И., Коваленко Н.К., Боронин А.М. Устойчивость к антибиотикам штаммов лактобацилл // Антибиотики и химиотерапия. – 1992. – Т.37. - №6. – С.12-15.

5 Тюрин М.В., Шендеров Б.А., Панасенко В.И. Генетическая природа антибиотикорезистентности лактобацилл // Антибиотики и химиотерапия. – 1989. – Т.34. - №7. – С.539-545.

6 Тюрин М.В. Антибиотикорезистентность и антагонистическая активность лактобацилл: Дис. … канд. мед. наук. - М., 1990. – 146 с.

7 Сидоренко С.В. Роль хинолов в антибактериальной химиотерапии. Механизм действия, устойчивость микроорганизмов, фармакинетика и переносимость// РМЖ. - 2003. - Т. 11. - №2. - С. 98-102.

8 Яковлев В.П., Падейская Е.Н., Яковлев С.В. Ципрофлоксацин в клинической практике. М. - 2000. - 272с.

9 Падейская Е.Н. Юбилейные даты высокоактивных антимикробных препаратов: ципрофлоксацин // Фарматека. - 2007. - №17. - С. 45-52.

**РЕЗЮМЕ**

Исследованные штаммы лактобактерий обладали различным типом и уровнем устойчивости к антибиотикам. Большинство штаммов оказались устойчивыми к канамицину, офлоксацину, ципрофлоксацину, тетрациклину, гентамицину, эритромицину. Устойчивость к фторхинолонам сохраняется после многократных пассажей в неселективных условиях.

**ТҮЙІН**

Зерттелген лактобактерия штаммдары әр түрлі антибиотикке тұрақтылық қасиетімен анықталды. Көптеген штамдар канамицинге, офлоксацинге, ципрофлоксацинге, тетрациклинге, гентамицинге және эритромицинге тұрақтылық қасиетін көрсетті. Фторхинолонға тұрақтылық бірнеше пассажға дейін сақталады.

**SUMMURY**

Investigated strains of lactobacilli possessed various type and a level of stability to antibiotics. The majority of strains have appeared steady to canamicin, ofloxacin, ciprofloxacin, tetracycline, gentamycin and erythromycin. Stability to phtorhinolons is kept after repeated passages in not selective conditions.