

УДК 616-036.22

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА *SALMONELLA ENTERITIDIS* И *SALMONELLA TYPHIMURIUM* К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

© 2012 Т.Н. Замай^{1,2}, А.Г. Савицкая¹, А.С. Замай^{1,3}, А.В. Дубынина²,
О.С. Коловская^{1,2}, И.Т. Решетнева¹, С.А. Кузнецова^{2,3}, Г.С. Замай¹, Н.М. Титова²,
Л.Л. Петрова¹, Л.В. Труфанова¹, О.В. Перьянова¹

¹ Красноярский государственный университет имени профессора
В.Ф. Войно-Ясенецкого

² Сибирский федеральный университет, г. Красноярск

³ Институт химии и химических технологий СО РАН

Статья посвящена сравнению методов определения чувствительности сальмонелл *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium* к антибактериальным препаратам – азитромицину, флемоксину, эритромицину и бетулину. С помощью классического бактериологического метода и метода проточной цитометрии с применением аптамеров показано, что сальмонеллы проявляют чувствительность ко всем препаратам, однако метод проточной цитометрии обладает важным преимуществом – быстротой определения и меньшими трудозатратами в сравнении с бактериологическим методом.

Ключевые слова: чувствительность к антибиотикам, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, антибактериальные препараты

В последнее время в Российской Федерации сложилась неблагоприятная ситуация по острым кишечным инфекциям, в целом

Замай Татьяна Николаевна, доктор биологических наук, профессор кафедры биологической химии. E-mail: tzamaya@yandex.ru

Савицкая Анна Геннадьевна, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии. E-mail: sannaz061@gmail.com

Замай Анна Сергеевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии. E-mail: annazamaya@yandex.ru

Дубынина Анна Владимировна, студентка

Коловская Ольга Сергеевна, научный сотрудник НИИ молекулярной медицины и патобиохимии. E-mail: zataukin@gmail.com

Решетнева Ирина Тимофеевна, доцент кафедры микробиологии. E-mail: reshetnevair@mail.ru

Кузнецова Светлана Алексеевна, доктор химических наук, профессор. E-mail: kuznetssvet@rambler.ru

Замай Галина Сергеевна, аспирантка

Титова Надежда Митрофановна, кандидат биологических наук, профессор кафедры медицинской биологии. E-mail: tinatib@mail.ru

Петрова Людмила Львовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии. E-mail: ti-la0@yandex.ru

Труфанова Людмила Васильевна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологической химии. E-mail: ti-la0@yandex.ru

Перьянова Ольга Владимировна, кандидат биологических наук, заведующая кафедрой микробиологии. E-mail: perianova@mail.ru

отражающая общемировые тенденции. Из всех возбудителей кишечных инфекций наибольшую опасность представляют различные серотипы сальмонелл вследствие того, что они вызывают генерализацию инфекционного процесса, часто заканчивающегося энтеритом, циррозом печени, менингитом, остеомиелитом, пневмонией и др. [11]. В настоящее время усиливается циркуляция полирезистентных штаммов сальмонелл [2, 3]. Поэтому, несмотря на то, что наиболее распространенным среди сальмонелл является серовар *Salmonella Enteritidis*, играющий основную роль в инфекционной патологии человека, большую опасность представляет серовар *Salmonella Typhimurium*, поскольку он проявляет устойчивость к некоторым антибиотикам, в частности, к амикацину. Заболевания, вызванные полирезистентными штаммами сальмонелл, отличаются более длительным инкубационным периодом и тяжелым течением заболевания, поскольку множественная лекарственная устойчивость бактерий является основной причиной, снижающей эффективность антибактериальной терапии. Разработка новых технологий определения лекарственной устойчивости бактерий к действию антибиотиков – одно из наиболее актуальных и востребованных направлений современной медицины. В настоящее время стала возможной диагностика различных бактериальных инфекций [7], в том числе и сальмонеллеза

[9, 10, 12] с помощью одноцепочечных ДНК аптамеров. Интерес к аптамерам растет, поскольку они, являясь функциональными аналогами естественных антител, способны заменить их в диагностических тест-системах различных модификаций [8]. Аптамеры можно использовать как основу для диагностических средств, поскольку они высоко специфичны, резистентны к денатурации и деградации, легко поддаются химической модификации, иммобилизации на биочипах, что создает предпосылки для формирования высокоструктурированного «рецепторного» слоя [6].

Наряду с острой необходимостью определения лекарственной устойчивости сальмонелл возникает проблема создания новых антимикробных лекарственных средств, поскольку вследствие нерационального использования антибактериальных препаратов. В последнее время возрастает интерес к натуральным веществам, обладающим высокой биодоступностью и ярко выраженными антиоксидантными и антимикробными свойствами [5]. Использование композитов натуральных биологически активных веществ еще более предпочтительно за счет синергетического терапевтического эффекта.

Цель работы: описание возможности применения ДНК аптамеров для определения чувствительности *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium* к различным антибактериальным препаратам и композитам биологически активных веществ.

Материалы и методы. Селекция аптамеров к сальмонеллам проводилась с помощью технологии *cell-SELEX* путем чередования позитивной и негативной селекции описанной нами ранее [1, 10]. Исследование аффинности аптамеров к сальмонеллам проводили на проточном цитометре FC 500 (Beckman Coulter Inc., USA). Долю бактерий, связанных с аптамерами, определяли по флуоресценции аптамеров в зеленой области спектра [10]. **Композиты бетулина** с полимером полиэтиленгликолем (ПЭГ) и диацетат бетулина с арабиногалактаном были получены с помощью механохимической активации. Композиты бетулина были получены в Институте химии и химических технологий СО РАН по способу, описанному ранее [4]. Для изучения чувствительности бактерий к антибиотикам и бетулину использовали суточные культуры *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium*, которые доводили питательным бульоном до концентрации примерно 1000 клеток/мл. В опытные пробы *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium* добавляли антибиотики (цефотаксим, азитромицин, флемоксин), а также композит бетулин-ПЭГ. Все пробы инкубировали в CO₂-инкубаторе течение 24-ти часов при температуре 37°C, после чего определяли мутность

проб по McFarland. Чувствительность бактерий к антибиотикам и композитам бетулина определяли с помощью классического бактериологического метода и метода, основанного на связывании бактерий с аптамерами. Для определения числа колониеобразующих единиц в пробах после воздействия антибиотиков и бетулина на чашки Петри высевали по 100 мкл суспензии из контрольных (*Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium*) и опытных (*Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium* с антибиотиками и бетулином) проб в трех повторностях. Подсчет колоний в каждой чашке Петри осуществляли через 24 часа культивирования бактерий при 37°C.

Результаты и обсуждение. Одним из методов определения лекарственной устойчивости является метод лунок в агаре. Первоначальное сравнение антибактериального эффекта композитов бетулина с исходными бетулинами их компонентами проводили этим методом. В застывшей агаризованной среде, засеянной *S. Typhimurium* стерильным пробочным сверлом (диаметр 6-8 мм) делали лунки на расстоянии 1,5-2 см от края чашки. В лунки вносили растворы компонентов композитов и композиты бетулинов. Выяснилось, что наиболее выраженным бактериостатическим эффектом обладал композит бетулина с ПЭГ 10%:90% (лунка 5, рис. 1), при этом сам бетулин обладал слабо выраженным антибактериальным эффектом (лунка 4, рис. 1), а ПЭГ не влиял на рост бактерий (лунка 6, рис. 1).

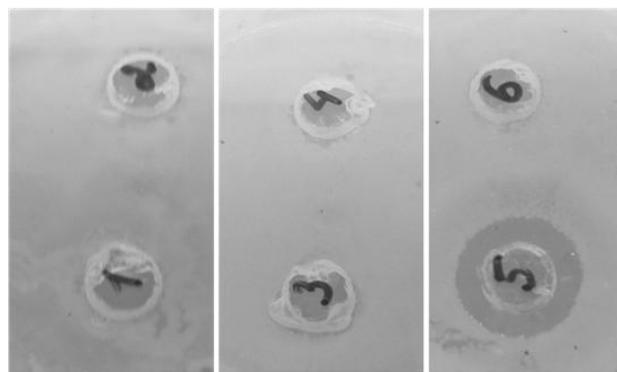


Рис. 1. Определение антибактериальной активности арабиногалактана, композита диацетата бетулина с арабиногалактаном, бетулина и композита бетулина с ПЭГ. Лунка 1 – фосфатный буфер, лунка 2 – арабиногалактан, лунка 3 – композита диацетата бетулина с арабиногалактаном (10%: 90%), лунка 4 – бетулин, лунка 5 – композит бетулина с ПЭГ (10%:90%)

Слабый бактериостатический эффект бетулина при данном методе исследований может объясняться его плохой растворимостью в водных растворах, и, как следствие, слабым проникновением в толщу агара. Влияние композита диацетата бетулина с арабиногалактаном (10%:

90%) (лунка 3, рис. 1) на рост бактерий было также незначительным, сам арабиногалактан (лунка 2, рис. 1) также не проявил антибактериальной активности, возможно вследствие своей разветвленной структуры, препятствующей прохождению в агар. Таким образом, метод лунок оказался непригодным для крупных разветвленных молекул и слаборастворимых веществ, поскольку не позволяет достоверно оценить их антимикробные свойства.

Другим индикатором для определения чувствительности бактерий к антибиотикам стала оценка мутности проб, зависящая от скорости роста бактерий. Проведенный анализ показал, что рост бактерий в контрольных пробах был значительно выше, чем в опытных образцах. После 24-часовой инкубации при 37°C контрольные пробы были мутными, все опытные пробы оставались прозрачными. Исходя из данных полученных в исследованиях по методу определения

мутности проб, оба штамма *S.Typhimurium* и *S.Enteritidis* были чувствительными ко всем используемым нами антибактериальным препаратам.

Более точный классический бактериологический метод использовали для получения уточненных данных. Культивирование контрольных и обработанных антибактериальными препаратами образцов сальмонелл на питательной среде в чашках Петри показало, что азитромицин, в отличие от других антибиотиков, не полностью подавлял рост бактерий *S.Typhimurium* и *S.Enteritidis* (табл. 1). По-видимому, это было связано не с проявлением устойчивости бактерий к азитромицину, а с механизмом его воздействия на бактерии (азитромицин, в отличие от других использованных антибиотиков, обладает не бактерицидным, а бактериостатическим действием). Поэтому метод культивирования на питательной среде не очень пригоден для бактериостатических препаратов.

Таблица 1. Оценка чувствительности классическим бактериологическим методом бактерий *S.Typhimurium* и *S.Enteritidis* к антибиотикам, бетулину и его композиту с ПЭГ.

Тип пробы	Количество колоний <i>S.Enteritidis</i> в мл, КОЕ/мл	Количество колоний <i>S.Typhimurium</i> в мл, КОЕ/мл
контроль	$5,0 \cdot 10^8$	$6,37 \cdot 10^8$ КОЕ/мл
флемоксин	0 (стерильно)	0 (стерильно)
азитромицин	$0,008 \cdot 10^6$ КОЕ/мл	$0,011 \cdot 10^6$ КОЕ/мл
цефотаксим	0 (стерильно)	0 (стерильно)
бетулин	$4,41 \cdot 10^8$ КОЕ/мл	$3,99 \cdot 10^8$ КОЕ/мл
бетулин: ПЭГ (10%:90%)	$4,42 \cdot 10^8$ КОЕ/мл	$2,23 \cdot 10^8$ КОЕ/мл

Определение чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам с помощью классического бактериологического метода, т.е. способности бактерий к росту после обработки этими препаратами, несмотря на высокую точность и воспроизводимость результатов, имеет недостатки – оно достаточно трудоемко и требует длительного культивирования и может давать ложные результаты в случае бактериостатических препаратов. Поэтому в экстренных случаях, когда нужно принять срочное решение о терапии, необходимы способы, позволяющие быстро и точно определить эффект от применения антибиотиков. Очевидно, что эту проблему можно решить с помощью маркеров, которые будут связываться только с живыми бактериями, но не способны связываться с неживыми. В ходе селекции были получены аптамеры с высокой аффинностью и специфичностью только к живым *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium*, позволяющие идентифицировать разные серовары (*Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium*) одного вида сальмонелл – *Salmonella Enterica*, различающихся по своей устойчивости

к антибиотикам. Для индикации антибактериальной устойчивости использовали аптамеры SE-20, ST-12, которые связывались только с живыми *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium*, соответственно. Исследования, проведенные методом проточной цитометрии с использованием аптамеров к живым *Salmonella Enteritidis* и *Salmonella Typhimurium*, показали, что сальмонеллы после обработки антибактериальными препаратами не связываются с аптамерами (рис. 2).

Таким образом, данные о жизнеспособности бактерий, полученные при помощи классического бактериологического метода соответствовали результатам, полученных методом проточной цитометрии с использованием аптамеров. В то же время использование аптамеров для определения чувствительности к антибактериальным препаратам обладало двумя важными преимуществами – быстротой определения и меньшими трудозатратами, возможностью оценки не только бактерицидного, но и бактериостатического эффекта.

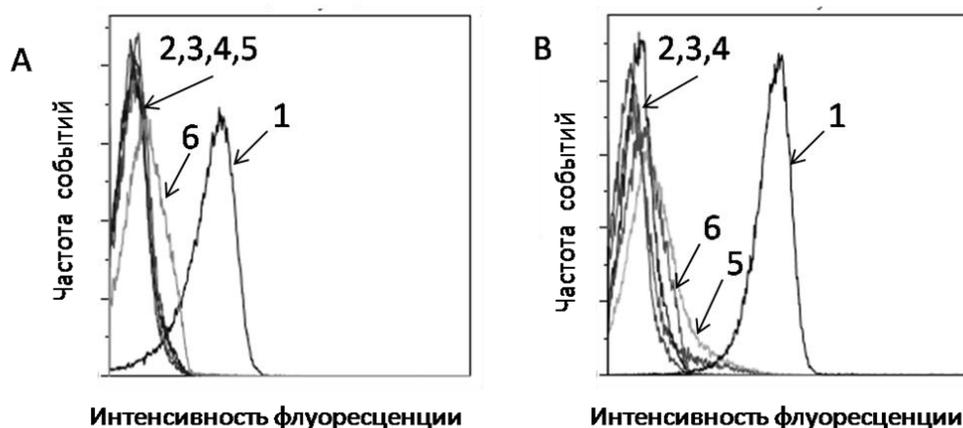


Рис. 2. Оценка жизнеспособности с помощью аптамеров, способных связываться только с живыми бактериями:

S. Enteritidis (A): 1 – флуоресценция аптамера SE-20_60 связанного с живыми *S. Enteritidis*; 2 – флуоресценция аптамера SE-20_60 связанного с *S. Enteritidis* после 15 мин воздействия температуры 95°C; 3 – флуоресценция аптамера SE-20_60 связанного с живыми *S. Enteritidis* после суточной инкубации с флемоксином; 4 – флуоресценция аптамера SE-20_60 связанного с живыми *S. Enteritidis* после суточной инкубации с цефотаксимом; 5 – флуоресценция аптамера SE-20_60 связанного с живыми *S. Enteritidis* после суточной инкубации с азитромицином; 6 – флуоресценция аптамера SE-20_60 связанного с живыми *S. Enteritidis* после суточной инкубации с композитом бетулина с ПЭГ.

S. Typhimurium (B): 1 – флуоресценция аптамера ST-12_60 связанного с живыми *S. Typhimurium*; 2 – флуоресценция аптамера ST-12_60 связанного с *S. Typhimurium* после 15 мин воздействия температуры 95°C; 3 – флуоресценция аптамера ST-12_60 связанного с живыми *S. Typhimurium* после суточной инкубации с азитромицином; 4 – флуоресценция аптамера ST-12_60 связанного с живыми *S. Typhimurium* после суточной инкубации с цефотаксимом; 5 – флуоресценция аптамера ST-12_60 связанного с живыми *S. Typhimurium* после суточной инкубации с флемоксином; 6 – флуоресценция аптамера ST-12_60 связанного с живыми *S. Typhimurium* после суточной инкубации с композитом бетулина с ПЭГ.

Выводы: метод определения на основе аптамеров позволяет получать точные данные о жизнеспособности бактерий в присутствии антибактериальных и бактериостатических препаратов, соответственно, судить о степени их устойчивости к ним микроорганизмов. Композиты бетулина с ПЭГ могут быть использованы в дополнение к классической антибактериальной терапии, что позволит уменьшать дозы препаратов и добиваться лучших терапевтических результатов за счет их синергетического эффекта.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» (Государственный контракт № 16.512.11.2107), программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине 45», РФФИ (11-03-12114-офи-м).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Замай, Т.Н. Новый перспективный способ идентификации возбудителя сальмонеллеза / Т.Н. Замай, А.Б. Салмина, О.С. Замай и др. // Вестник новых медицинских технологий. 2011. №4. С. 36-39.
2. Иванов, А.С. Современные представления об антибиотикорезистентности и антибактериальной терапии сальмонеллезом // Клиническая микробиология и анти-микробная химиотерапия. 2009. Т.11, №4. С. 305-326.
3. Козлова, Н.С. Антибиотикорезистентность сальмонелл, выделенных в Санкт-Петербурге и Ленин-

- градской области в 1992-2000 гг. / Н.С. Козлова, Д.П. Гладилин, Л.А. Лунатова и др. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001. Т.1. С. 20.
4. Кузнецова, С.А. Способ получения бетулина: Пат. РФ 2264411 / С.А. Кузнецова, Б.Н. Кузнецов, А.Г. Михайлов, В.А. Левданский // 2005. 4 с.
5. Кузнецова, С.А. Изучение состава гексанового экстракта бересты и его токсико-фармакологических свойств / С.А. Кузнецова, Б.Н. Кузнецов, О.Ф. Веселова // Химия растительного сырья. 2008. №1. С. 45-49.
6. Cho, E.J. Applications of aptamers as sensors / E.J. Cho, J.W. Lee, A.D. Ellington // Annual Review of Analytical Chemistry. 2009. №1. P. 241-264.
7. Hamula, C.L.A. Selection of Aptamers against Live Bacterial Cells / C.L.A. Hamula, H. Zhang, L.L. Guan et al. // Anal. Chem. 2008. №20. P. 7812-7819.
8. Iliuk, A.B. Aptamer in bioanalytical applications / A.B. Iliuk, L. Hu, W.A. Tao // Anal Chem. 2011. №12. P. 4440-4452.
9. Joshi, R. Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of Salmonella enterica serovars / R. Joshi, H. Janagama, H.P. Dwivedi et al. // Molecular and Cellular Probes. 2009. №23. P. 20-28.
10. Labib, M. Aptamer-based Viability Impedimetric Sensor for Bacteria / M. Labib, A.S. Zamay, O.S. Kolovskaya et al. // Analytical chemistry. 2012 (Letter) DOI: 10.1021/ac302217u.
11. Pegues, D.A. Salmonella species, including Salmonella typhi. In Principles and Practice of Infectious Diseases / D.A. Pegues, M.E. Ohl, S.I. Miller // Eds G.L. Mandell, Bennet, J.E., Dolin, R. – 6th Ed. New York: Churchill Livingstone, 2005. P. 2636-2654.

12. Wang, F. Aptamers That Preferentially Bind Type IVB Pili and Inhibit Human Monocytic-Cell Invasion by *Salmonella enterica* Serovar Typhi / F. Wang, M.-S.

Zhang, J.-M.Hu // Antimicrob Agents Chemother. 2005. №10. P. 4052-4060.

**DETERMINATION OF SENSITIVITY OF *SALMONELLA*
ENTERITIDIS AND *SALMONELLA TYPHIMURIUM*
SALMONELLOSIS ACTIVATORS TO ANTIBACTERIAL
PREPARATIONS WITH THE HELP OF FLOWING
CYTOMETRY METHOD**

© 2012 T.N. Zamay^{1,2}, A.G. Savitskaya¹, A.S. Zamay^{1,3}, A.V. Dubynina²,
O.S. Kolovskaya^{1,2}, I.T. Reshetneva¹, S.A.Kuznetsova^{2,3}, G.S. Zamay¹, N.M. Titova²,
L.L. Petrova¹, L.V.Trufanova¹, O.V. Peryanova¹

¹ Krasnoyarsk State University named after Professor V.F. Voyno-Yasenetskiy

² Siberian Federal University, Krasnoyarsk

³ Institute of Chemistry and Chemical Technologies SB RAS

Article is devoted to comparison the methods of determination the sensitivity of *Salmonella Enteritidis* and *Salmonella Typhimurium* salmonellas to antibacterial preparations – azitromycin, flemoxin, erythromycin and betiline. By means of a classical bacteriological method and method of flowing cytometry with application of aptamer it is shown that salmonellas show sensitivity to all preparations, however the method of flowing cytometry possesses important advantage – speed of definition and smaller labour costs in comparison with bacteriological method.

Key words: *sensitivity to antibiotics, Salmonella Enteritidis, Salmonella Typhimurium, antibacterial preparations*

Tatiana Zamay, Doctor of Biology, Professor at the Biochemistry Department. E-mail: tzamay@yandex.ru

Anna Savitskaya, Research Fellow of the Scientific Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry. E-mail: sanna3061@gmail.com

Anna Zamay, Candidate of Biology, Associate Professor at the Biochemistry Department. E-mail: annazamay@yandex.ru

Anna Dubynina, Student

Olga Kolovskaya, Research Fellow of the Scientific Research Institute of Molecular Medicine and Pathological Biochemistry. E-mail: zamaykin@gmail.com

Irina Reshetneva, Associate Professor at the Microbiology Department. E-mail: reshetnevaira@mail.ru

Svetlana Kuznetsova, Doctor of Chemistry, Professor. E-mail: kuznetssvetl@rambler.ru

Galina Zamay, Post-graduate Student

Nadezhda Titova, Candidate of Biology, Professor at the Medical Biology Department. E-mail: tinami6@mail.ru

Lyudmila Petrova, Candidate of Biology, Associate Professor at the Biochemistry Department. E-mail: mi-la0@yandex.ru

Lyudmila Trufanova, Candidate of Biology, Associate Professor at the Biochemistry Department. E-mail: mi-la0@yandex.ru

Olga Peryznova, Candidate of Biology, Head of the Microbiology Department. E-mail: perianova@mail.ru