

УДК 579.0:579.253:615.015

Ю.А. Ягнюк^{1*}, Т.М. Гурина², О.Г. Перетятко¹,
Н.І. Скляр¹, А.І. Ягнюк³, С.В. Калініченко¹

Антибіотикочутливість музейних штамів *Escherichia coli* після довгострокового зберігання у ліофілізованому стані за помірно низьких температур

UDC 579.0:579.253:615.015

Yu.A. Yagnuk^{1*}, T.M. Gurina², O.G. Peretyatko¹,
N.I. Sklyar¹, A.I. Yagnuk³, S.V. Kalinichenko¹

Antibiotic Sensitivity of *Escherichia Coli* Museum Strains After Long-Term Storage in a Lyophilized State at Moderately Low Temperatures

Реферат: Вивчення чутливості мікробних культур до антибіотиків проводили диско-дифузійним методом, методом серійних розведень у бульйоні та методом серійних розведень в агарі. Відновлення життєздатності та виявлення антибіотикорезистентності у музейних штамів *Escherichia coli*, що тривалий час зберігались у ліофілізованому стані, свідчить про те, що сублімаційне висушування у поєднанні з помірно низькими температурами наступного довгострокового зберігання є ефективним методом утримання колекційних штамів мікроорганізмів у функціонально стабільному стані, у тому числі зі збереженням резистентності до антибіотиків. У одного з 21 дослідженого штаму встановлено резистентність до ампіциліну, ампіциліну-сульбактаму, цефалоспоринів I–III поколінь, у двох штамів — до хлорамфеніколу, нечутливими до тетрацикліну були чотири штами. Виявлення резистентності до цефалоспоринів та захищених пеніцилінів у штаму *E. coli*, вилученого у 1963 р., ще до впровадження вказаних груп антибіотиків у клінічну практику, підтверджує той факт, що антибіотикорезистентність — феномен, пов'язаний скоріше із загальними механізмами адаптації збудників до несприятливих факторів зовнішнього середовища, ніж з широким використанням антимікробних препаратів.

Ключові слова: ліофілізовані музейні штами, помірно низькі температури, *Escherichia coli*, антибіотикорезистентність.

Abstract: Sensitivity of microbial cultures to antibiotics was determined using disco-diffusion method, broth serial dilution and agar serial dilution. Restored viability and detection of antibiotic resistance in the museum *Escherichia coli* strains stored for a lasting time in a lyophilized state indicates that freeze-drying in combination with moderately low temperatures for subsequent long-term storage is an effective method of maintaining collection microorganism strains in a functionally stable state, including preservation of their antibiotic resistance. It was found that one of the 21 studied strains was resistant to ampicillin, ampicillin-sulbactam, cephalosporins of the I–III generations, two strains were resistant to chloramphenicol, and four strains were insensitive to tetracycline. Detection of the resistance to cephalosporins and protected penicillins in *E. coli* strain isolated in 1963, long before the discovery and use of these antibiotics in clinical practice, confirms that antibiotic resistance is a phenomenon associated rather with the general mechanisms of adaptation of pathogens to adverse external environmental factors than with the widespread use of antimicrobial drugs.

Key words: lyophilized museum strains, moderately low temperatures, *Escherichia coli*, antibiotic resistance.

На сьогодні в світі настільки гостро стоїть проблема резистентності мікроорганізмів до антимікробних препаратів, що XXI століття по праву можна назвати «ерою антибіотикорезистентності» [3, 12]. Широке розповсюдження антибіотикорезистентності мікроорганізмів і,

Today worldwide the problem of microorganisms' resistance to antimicrobials is so acute that the XXI century can rightly be called the 'era of antibiotic resistance' [14, 11]. The widespread antibiotic resistance of the microorganisms and, as a consequence, the dramatic decline in the

¹Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України», м. Харків, Україна

²Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

³Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна

¹State Institution 'Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine', Kharkiv, Ukraine

²Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

³Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Пушкінська, 14–16, м. Харків, Україна 61057;
тел.: (+38 057) 731-31-51, факс: (+38 057) 731-31-51
електронна пошта: lazamimus@ukr.net

*To whom correspondence should be addressed:

14–16, Pushkinska str., Kharkiv, Ukraine 61057;
tel.: +380 57 731 3151, fax: +380 57 731 3151
e-mail: lazamimus@ukr.net

Надійшла 17.02.2023
Прийнята до друку 17.05.2023

Received 17, February, 2023
Accepted 17, May, 2023

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023
© Publisher Publishing House 'Akademperiodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

як наслідок, різке зниження ефективності етіотропної терапії інфекційних захворювань є серйозною загрозою благополуччю і здоров'ю людства. У країнах Євросоюзу щорічно реєструється майже 400 тисяч інфекцій, викликаних антибіотикорезистентними збудниками, від яких гинуть близько 25 тисяч чоловік, а фінансові витрати на лікування перевищують 1,5 млрд євро [8, 16]. У США, за даними центру з контролю та профілактики захворювань (CDC), щонайменш 2 мільйони людей щорічно інфікуються стійкими до антибіотиків бактеріями, число летальних випадків внаслідок неефективної антибіотикотерапії наближується до 23 тисяч чоловік, а економічні збитки, пов'язані з цією проблемою, оцінюються від 21 до 32 млрд доларів на рік [7]. Вважається, що головною причиною формування й швидкого розповсюдження резистентності є селективний тиск на мікроорганізми через активне застосування антимікробних препаратів у тваринництві та нераціональне їхнє використання у клінічній медицині (безрецептурний продаж антибіотиків, неадекватне дозування, лікування антимікробними препаратами легких форм інфекційного процесу та ін.). Проте останніми роками все частіше з'являються повідомлення про те, що стійкість до антибіотиків виникла внаслідок складних екологічних та еволюційних стосунків між самими бактеріями, які склались задовго до появи людини як біологічного виду. Підтвердженням цьому є чисельні повідомлення про виявлення резистентності до антибіотиків у мікроорганізмів, вилучених із зразків, що не піддавались антропогенному впливу [4, 13, 15]. Щоб отримати відповідь на запитання, антибіотикорезистентність є результатом селективного тиску, або стійкість обумовлена експресією вже наявних генів, необхідно досліджувати музейні штами мікроорганізмів, ізольовані як в доантибіотичний період, так і в періоди впровадження та широкого використання різних груп антибіотиків. Одним із способів утримання мікроорганізмів у колекціях є сублімаційне висушування (ліофілізація) з подальшим довгостроковим зберіганням за помірно низьких температур. Однак, у процесі ліофілізації та подальшого довгострокового зберігання бактерії піддаються стресовим факторам, що можуть вплинути як на виживання мікроорганізмів, так і на їхні біологічні властивості [14].

Метою дослідження було вивчення чутливості до антибіотиків у музейних штамів *Escherichia coli*, які тривалий час зберігались у ліофілізованому стані за помірно низьких температур.

effectiveness of etiotropic therapy in infectious diseases is a serious threat to the well-being and health of mankind. Nearly 400,000 infections caused by antibiotic-resistant pathogens are reported annually in the EU countries, killing about 25,000 people and, meanwhile treatment costs exceed € 1.5 billion [6, 16]. In the United States, according to the data of Centers for Disease Control and Prevention (CDC), at least 2 million people are infected with antibiotic-resistant bacteria each year, the number of fatal cases resulting from ineffective antibiotic therapy is approaching 23,000, and the economic costs associated with this problem are assessed from \$ 21 billion to \$ 32 billion a year [5]. It is believed that the main reason for the formation and rapid spread of resistance is selective pressure on microorganisms through the active use of antimicrobials in animal breeding and their inefficient use in clinical medicine (over-the-counter sale of antibiotics, inadequate dosage, use of antimicrobial drugs for mild forms of infectious process, etc.). However, recently it has been increasingly reported that the emergence of antibiotic resistance is the result of sophisticated environmental and evolutionary relationships between the bacteria themselves, long before humans emerged as a biological species. Numerous reports on the detection of antibiotic resistance in microorganisms isolated from samples not subjected to anthropogenic influence have been confirmed [2, 12, 15]. To answer the question whether antibiotic resistance is the result of selective pressure, or that is due to the pre-existing genes expression, it is necessary to examine the museum strains of microorganisms isolated both during the pre-antibiotic period as well as during the administration and widespread use of different antibiotic groups. One of the methods of long-term storage of microorganisms in collections is freeze-drying (lyophilization). However, in the process of lyophilization and subsequent long-term storage, bacteria are exposed to stress factors that can affect both the survival of microorganisms and their biological properties [13].

The aim of the research was to study antibiotic sensitivity of *E. coli* museum strains after long-term storage in a lyophilized state at moderately low temperatures.

Materials and methods

The subject of the study was 21 strain of *E. coli* provided by the Museum of Microorganisms of the State Institution 'I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology,



Матеріали і методи

Об'єктом дослідження був 21 штамп *E. coli* з Музею мікроорганізмів Державної установи «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (ІМІ (Х)). Штами було ізольовано в різних країнах світу і передано на зберігання до Музею мікроорганізмів за часів СРСР: 8 штамів *E. coli* виділено на території України (м. Харків), 3 штами — в Інституті вакцин і сироваток ім. Л. Пастера (м. Ленінград, ІВС (Л)), з 10 штамів колекції Фредеріка, що надійшли з Державного інституту стандартизації та контролю ім. Л.О. Тарасевича (м. Москва) (ДІСК), 8 було ізольовано у Німеччині, 2 — у Індії (таблиця). Ліофілізовані зразки зберігались у колекції від 44 до 56 років за помірно низьких температур (4–6°C). Для відновлення ліофілізованих зразків штамів *E. coli* вміст ампули розчиняли 1,0 мл поживного бульйону, мікробну суспензію висівали на кров'яний агар, посіви інкубували при температурі 37°C протягом 24 годин [14]. Визначення чутливості мікробних культур до антибіотиків проводили диско-дифузійним методом, методом серійних розведень в бульйоні та методом серійних розведень в агарі [2, 9, 17]. У досліджах використовували бульйон та агар Мюллера-Хінтона (Himedia, Індія); стандартні комерційні диски з ампіциліном, карбеніциліном, тікарциліном, піперациліном («Аспект», Україна), з цефазоліном, цефуроксимом, цефтазидимом, цефепімом, тетрацикліном, доксицикліном, котримоксазолем («Фармактив», Україна), з ампіциліном-сульбактамом, норфлоксацином, ципрофлоксацином, левофлоксацином, гатифлоксацином, гентаміцином, амікацином, хлорамфеніколом (Himedia, Індія); антибіотики: ампіцилін, ампіцилінсульбактам, піперацилін («Фармекс Груп», Україна), цефазолін, цефуроксим, тетрациклін, доксициклін («Борщагівський ХФЗ», Україна), цефепім, гентаміцин, амікацин («Лекхім», Україна), цефтазидим, тікарцилін («Сандоз ГмБХ», Австрія), хлорамфенікол («Київмедпрепарат», Україна).

Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин проводили за шкалою McFarland з використанням електронного приладу «Densi-La-Meter» (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чеська Республіка).

Статистичну обробку отриманих даних [1] проводили з використанням програмного забезпечення «Statistica 6.1» (StatSoft Inc., США).

Результати та обговорення

Встановлено, що під час рекультивування ліофілізованих штамів *E. coli* кількість життє-

National Academy of Medical Sciences of Ukraine'. The strains were isolated in different countries of the world and transferred for storage to the Museum of Microorganisms during the USSR: 8 strains of *E. coli* were isolated in the territory of Ukraine (Kharkiv) in the Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology (IMI), 3 strains – in the L. Pasteur Institute of Vaccines and Serums (Leningrad, former USSR) (IVS (L)), out of 10 strains of the Frederick collection that came from the L.O. Tarasevich State Institute of Standardization and Control (Moscow, former USSR) (SISC), 8 were isolated in Germany, 2 – in India (Table). Freeze-dried samples were stored in the collection within 44-56 years at moderately low temperatures. To restore the lyophilized samples of *E. coli* strains, the contents of the ampoule were dissolved in 1.0 ml of nutrient broth, the microbial suspension was sown on blood agar, bacterial inoculations were incubated at 37°C for 24 hours [13]. The sensitivity of microbial cultures to antibiotics was determined by the disc diffusion, serial broth dilution in broth and serial agar dilution [10, 7, 17]. The Muller-Hinton broth and agar (Himedia, India), standard commercial discs with ampicillin, carbenicillin, ticarcillin, piperacillin (Aspect, Ukraine), with cefazoline, cefuroxime, ceftazidime, cefepime, tetracycline, doxycycline, co-trimoxazole (Farmaktiv, Ukraine), with ampicillin-sulbactam, norfloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, gentamicin, amikacin, chloramphenicol (Himedia, India); antibiotics: ampicillin, ampicillin-sulbactam, piperacillin (Pharmex Group, Ukraine), cefazoline, cefuroxime, tetracycline, doxycycline (Borshchagivskyi KhFZ, Ukraine), cefepime, gentamicin, amikacin (Lekhim, Ukraine), ceftazidime, ticarcillin (Sandoz GmbH, Austria), chloramphenicol (Kyivmedpreparat, Ukraine) were used in the experiments.

Microorganisms suspensions with a determined concentration of microbial cells was prepared by the McFarland scale using Densi-La-Meter electronic device (PLIVA-Lachema Diagnostika, Czech Republic).

The results were statistically processed with non-parametric statistics methods [1] using the package of licensed statistical software 'Statistica 6.1' (StatSoft Inc., USA).

Results of and discussion

It was established that during the recultivation of lyophilized *E. coli* strains, the number of viable cells in the samples was equal to 104 to

Походження досліджуваних штамів *E. coli*
Origin of the *E. coli* strains under study

Назва штаму Strain name	Інвентарний номер Identification number	Джерело, місце, рік виділення Place and year of isolation	Установа, з якої надійшов штам, рік надходження Where the strain was taken from, year of arrival
<i>E. coli</i> O26	01004	Харків, 1969 р. Kharkiv, 1969	IMI, Харків, 1969 р. IMI, Kharkiv, 1969
<i>E. coli</i> O13	01032	Ленінград, 1962 р. Leningrad, 1962	IBC (Л), 1962 р. IVS (L), 1962
<i>E. coli</i> 4008	01036	Ленінград, 1962 р. Leningrad, 1962	IBC (Л), 1962 р. IVS (L), 1962
<i>E. coli</i> 4011	01037	Ленінград, 1962 р. Leningrad, 1962	IBC (Л), 1962 р. IVS (L), 1962
<i>E. coli</i> 830	01038	Харків, 1963 р. Kharkiv, 1963	IMI, Харків, 1963 р. IMI, Kharkiv, 1963
<i>E. coli</i> 173	01041	Харків, 1965 р. Kharkiv, 1965	IMI, Харків, 1965 р. IMI, Kharkiv, 1965
<i>E. coli</i> Ca-18(B)	01042	Берлін, 1963 р., колекція Фредеріка Berlin, 1963, Frederick Collection	ДІСК, 1965 р. SISK, 1965
<i>E. coli</i> 406	01046	Харків, 1974 р. Kharkiv, 1974	IMI, Харків, 1974 р. IMI, Kharkiv, 1974
<i>E. coli</i> 3193	01047	Харків, 1974 р. Kharkiv, 1974	IMI, Харків, 1974 р. IMI, Kharkiv, 1974
<i>E. coli</i> 3866	01048	Харків, 1974 р. Kharkiv, 1974	IMI, Харків, 1974 р. IMI, Kharkiv, 1974
<i>E. coli</i> 4081	01049	Харків, 1974 р. Kharkiv, 1974	IMI, Харків, 1974 р. IMI, Kharkiv, 1974
<i>E. coli</i> «Д»	01050	Харків, 1963 р. Kharkiv, 1963	IMI, Харків, 1963 р. IMI, Kharkiv, 1963
<i>E. coli</i> γ	01051	Індія, 1963 р., колекція Фредеріка India, 1963, Frederick Collection	ДІСК, 1965 р. SISK, 1965
<i>E. coli</i> B	01052	Індія, 1964 р., колекція Фредеріка India, 1964, Frederick Collection	ДІСК, 1965 р. SISK, 1965
<i>E. coli</i> K-235 (K)	01053	Берлін, 1963 р., колекція Фредеріка Berlin, 1963, Frederick Collection	ДІСК, 1965 р. SISK, 1965
<i>E. coli</i> Ca-58(H)	01055	Берлін, 1963 р., колекція Фредеріка Berlin, 1963, Frederick Collection	ДІСК, 1965 р. SISK, 1965
<i>E. coli</i> Ca-57(C)	01056	Берлін, 1963 р., колекція Фредеріка Berlin, 1963, Frederick Collection	ДІСК, 1965 р. SISK, 1965
<i>E. coli</i> Ca-42(F)	01058	Берлін, 1963 р., колекція Фредеріка Berlin, 1963, Frederick Collection	ДІСК, 1965 р. SISK, 1965
<i>E. coli</i> Ca-7(V)	01059	Берлін, 1963 р., колекція Фредеріка Berlin, 1963, Frederick Collection	ДІСК, 1965 р. SISK, 1965
<i>E. coli</i> Ca-30 (E1 + V)	01060	Берлін, 1963 р., колекція Фредеріка Berlin, 1963, Frederick Collection	ДІСК, 1965 р. SISK, 1965
<i>E. coli</i> ROW	01061	Берлін, 1963 р., колекція Фредеріка Berlin, 1963, Frederick Collection	ДІСК, 1971 р. SISK, 1971

Примітки: IMI — Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова (м. Харків); IBC (Л) — Інститут вакцин і сироваток ім. Л. Пастера (м. Ленінград); ДІСК — Державний інститут стандартизації та контролю ім. Л.О. Тарасевича (м. Москва).

Notes: IMI – Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology, Kharkiv, Ukraine; IVS (L) – L. Pasteur Institute of Vaccines and Serums, Leningrad, former USSR; SISK – L.O. Tarasevich State Institute of Standardization and Control, Moscow, former USSR.



здатних клітин у зразках дорівнювала від 10^4 до 5×10^8 КУО/мл (вихідна концентрація мікроорганізмів у суспензії під час ліофілізації складала 10^9 КУО/мл). Результати вивчення чутливості досліджених ешерихій до антибіотиків пеніцилінового ряду показали, що частота розповсюдження нечутливих до ампіциліну штамів складала $(4,8 \pm 2,7)$ %. Резистентним до ампіциліну (МІК 64 мкг/мл) виявився штам *E. coli* «Д» (01050), вилучений у ІМІ (Х) в 1963 р., який також був стійким до ампіциліну-сульбактаму (МІК 64 мкг/мл).

Слід зазначити, що в нашому дослідженні було вивчено також рівень чутливості історичних штамів кишкової палички до так званих «протисиньогнійних» препаратів — карбоксипеніцилінів (карбеніциліну та тікарциліну), оскільки зазначені антибіотики широко використовувались у клінічній практиці 70–80-х років минулого століття для лікування інфекцій, спричинених *E. coli*, резистентними до ампіциліну [5, 6, 11]. До карбоксипеніцилінів, а також до антибіотика групи уреїдопеніцилінів — піперациліну — всі штами виявились чутливими.

Результати вивчення антибіотикочутливості *E. coli* показали, що серед штамів досліджуваної групи частота розповсюдження резистентності до цефазоліну (цефалоспорин I покоління), цефуроксиму (цефалоспорин II покоління) та цефтазидиму (цефалоспорин III покоління) складала $(4,8 \pm 2,7)$ %. Резистентним до цефалоспоринів виявився вищезазначений штам *E. coli* «Д» (01050) — МІК 32 мкг/мл. Стійкості до цефепіму (цефалоспорин IV покоління) не виявлено.

Аналіз результатів визначення чутливості *E. coli* до хлорамфеніколу показав, що 2 штами з 21, що складало $(9,5 \pm 3,7)$ %, були резистентними до даного препарату: штам *E. coli* «Д» (01050), та штам *E. coli* 4008 (01036), що надійшов до нашої колекції з ІВС (Л) у 1962 р. — МІК антибіотиків складала 32 та 64 мкг/мл відповідно.

Вивчення чутливості ешерихій до антибіотиків тетрациклінового ряду показало високу активність доксицикліну — усі дослідні культури були чутливими до цього препарату, у той час як до тетрацикліну виявлено $(19,1 \pm 8,5)$ % нечутливих штамів. Резистентність до тетрацикліну встановлена у вищезазначених штамів *E. coli* «Д» (01050) (МІК 32 мкг/мл), *E. coli* 4008 (01036) (МІК 32 мкг/мл) та у штаму *E. coli* γ (01051) з колекції Фредеріка, вилученого у 1963 році в Індії (МІК 16 мкг/мл). Помірно-стійким до тетрацикліну (МІК 8 мкг/мл)

5×10^8 CFU/ml (the initial concentration of microorganisms in the suspension during lyophilization was 10^9 CFU/ml). When studying the sensitivity of the studied *E. coli* to antibiotics of the penicillin series, it was found that the proportion of ampicillin-resistant strains amounted (4.8 ± 2.7) %. Ampicillin-resistant (minimal inhibiting concentration (MIC) 64 µg/ml) was the *E. coli* 'D' strain (01050) obtained in IMI (Kh) in 1963, which was also resistant to ampicillin-sulbactam (MIC 64 µg/ml). It should be noted that our study also examined the level of sensitivity of historical *E. coli* strains to the so-called 'anti-Pseudomonas aeruginosa' drugs – carboxypenicillins (carbenicillin and ticarcillin), as these antibiotics were widely used in the 1970s – 1980s in clinical practice for treatment of the infections caused by *E. coli* resistant to ampicillin [3, 4, 9]. All strains proved to be sensitive to carboxypenicillins as well as to ureidopenicillin (piperacillin).

The results of the *E. coli* antibiotic sensitivity study showed that among the strains of the analyzed group, the share of resistance to cephazolin (first generation cephalosporin), cefuroxime (second generation cephalosporin) and ceftazidime (third generation cephalosporin) amounted (4.8 ± 2.7) %. The above-mentioned *E. coli* 'D' strain (01050) – MIC 32 µg/ml was found to be resistant to cephalosporins. Resistance to cefepime (IV generation cephalosporin) was not found.

Analyzing the results of determining the *E. coli* sensitivity to chloramphenicol revealed that 2 strains out of 21 ones, which amounted (9.5 ± 3.7) %, were resistant to this drug: it was "D" strain of *E. coli* (01050), and *E. coli* strain 4008 (01036) that came to our collection from IVS (L) in 1962 – MIC of the antibiotic was 32 µg/ml and 64 µg/ml, respectively.

Studies of *E. coli* sensitivity to antibiotics of the tetracycline series showed high doxycycline activity – all of the cultures tested were sensitive to this drug, whereas (19.1 ± 8.5) % of strains were detected to be non-sensitive to tetracycline. Tetracycline resistance was established in the above strains of *E. coli* 'D' (01050) (MIC 32 µg/ml), *E. coli* 4008 (01036) (MIC 32 µg/ml) and *E. coli* 0 (01051) from Frederick collection, isolated in India in 1963 (MIC 16 µg/ml). Moderately sensitive to tetracycline (MIC 8 µg/ml) was the *E. coli* 3193 strain (01047), IMI (Kh), isolated in 1974.

According to the results of our studies it was found that aminoglycosides, fluoroquinolones and co-trimoxazole showed high efficiency:



виявився штам *E. coli* 3193 (01047), ІМІ (X), 1974 року виділення.

За результатами проведених нами досліджень встановлено, що аміноглікозиди, фторхінолони та ко-тримоксазол проявляли високу ефективність — нечутливих до вищезазначених антибіотиків серед штамів *E. coli* проаналізованої групи не встановлено.

Таким чином, серед музейних *E. coli*, вилучених у 1662–1974 рр., виявлено штамми з асоційованою стійкістю до декількох груп антибіотиків: *E. coli* 4008 (01036), стійкий до хлорамфеніколу та тетрацикліну; *E. coli* «Д» (01050), стійкий до ампіциліну, ампіциліну-сульбактаму, цефалоспоринів I–III поколінь, хлорамфеніколу та тетрацикліну.

Слід зазначити, що серед досліджених нами музейних штамів *E. coli* найбільш високими були показники резистентності до тетрацикліну, що узгоджується з даними інших дослідників [10]. Даний феномен, можливо, обумовлений селективним тиском на мікроорганізми через широке використання тетрацикліну у 50–60-х роках минулого століття. Проте, особливу наукову цінність, на наш погляд, може представляти резистентність до β -лактамінів у штаму *E. coli* «Д» (01050), який був виділений у 1963 р., до впровадження у клінічну практику цефалоспоринів та захищених пеніцилінів. Так, цефазолін синтезовано у 1971 р., цефуроксим — у 1977 р., цефтазидим — у 1983 р., а використання ампіциліну-сульбактаму почалось лише у 1987 р. До того ж, виявлення резистентності до цефтазидиму (цефалоспорину III покоління) свідчить про наявність у даного штаму β -лактама з розширеного спектру (ESBL) [2].

Висновки

1. Показники відновлення життєздатності та виявлення антибіотикорезистентності у музейних штамів *E. coli*, що тривалий час (від 44 до 56 років) зберігались у ліофілізованому стані, свідчать про те, що сублімаційне висушування у поєднанні з помірно низькими температурами наступного довгострокового зберігання є ефективним методом утримання колекційних штамів мікроорганізмів у функціонально стабільному стані, у тому числі зі збереженням резистентності до антибіотиків.

2. Серед музейних культур *E. coli*, вилучених у 60–70-х роках минулого століття, ідентифіковано штамми з резистентністю до ампіциліну, ампіциліну-сульбактаму, цефалоспоринів I–III поколінь, тетрацикліну та хлорамфеніколу.

no *E. coli* strains resistant to the above antibiotics among the analyzed group were detected.

Thus, strains with associated resistance to several antibiotic groups were identified among museum *E. coli* isolated in 1662–1974: *E. coli* 4008 (01036), resistant to chloramphenicol and tetracycline; *E. coli* 'D' (01050) resistant to ampicillin, ampicillin-sulbactam, cephalosporins generations I, II, III, chloramphenicol and tetracycline.

It should be noted that among the studied *E. coli* museum strains, the highest were the indices of tetracycline resistance, which was consistent with the data of other researchers [8]. This phenomenon may be stipulated by a selective pressure on microorganisms due to the widespread use of tetracycline in the 1950s and 1960s. However we believe that the resistance to β -lactams in *E. coli* 'D' strain (01050), which was isolated in 1963, prior to the introduction of cephalosporins and protected penicillins into clinical practice, may be of particular scientific value. For example, cefazolin was synthesized in 1971, cefuroxime in 1977, ceftazidime in 1983, and the use of ampicillin-sulbactam only started in 1987. In addition, the detected resistance to ceftazidime (third generation cephalosporin) indicates the presence of extended spectrum β -lactamase (ESBL) in this strain [10].

Conclusions

1. The indices of viability restoration and detection of antibiotic resistance in museum *E. coli* strains stored for a long time (from 44 to 56 years) in a lyophilized state indicate that freeze-drying in combination with moderately low temperatures for subsequent long-term storage is an effective method of maintaining collection microorganism strains in a functionally stable state, including preservation of their antibiotic resistance.

2. Among *E. coli* museum cultures isolated in the 1960s–1970s, the strains with resistance to ampicillin, ampicillin-sulbactam, I-III generation cephalosporins, tetracycline and chloramphenicol were identified.

3. Detection of the resistance to cephalosporins and protected penicillins in *E. coli* strain isolated in 1963, long before the discovery and use of these antibiotics in clinical practice, confirms that antibiotic resistance is a phenomenon associated rather with the general mechanisms of adaptation of pathogens to adverse external factors environment than with the widespread use of antimicrobial drugs.



3. Виявлення резистентності до цефалоспоринів та захищених пеніцилінів у штаму *E. coli*, вилученого у 1963 р. (до впровадження вказаних груп антибіотиків у клінічну практику) підтверджує той факт, що антибіотикорезистентність — феномен, пов'язаний більш за все з загальними механізмами адаптації збудників до несприятливих факторів зовнішнього середовища, ніж з широким використанням антимікробних препаратів.

Література

1. Антомонов МЮ. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных. Киев: Медінформ; 2017. 578 с.
2. Про затвердження методичних вказівок : Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів : Наказ Міністерства охорони здоров'я України № 167, 05 квітня 2007. Київ: МОЗ України; 2007. 51 с.
3. Салманов АГ. Резистентність до антибіотиків та біоцидів. International J Antibiotics and Probiotics. 2017; 1(2): 92–125.
4. Blanquart F. Evolutionary epidemiology models to predict the dynamics of antibiotic resistance. Evol Appl. 2019; 12(3): 365–83.
5. Bodey GP, Terrell LM. *In vitro* activity of carbenicillin against gram-negative bacilli. J Bacteriol. 1968; 95(5): 1587–90.
6. Brumfitt W, Percival A, Leigh D. Clinical and laboratory studies with carbenicillin. A new penicillin active against *Pseudomonas pyocyanea*. Lancet. 1967; 289(7503): 1289–93.
7. Centers for disease control and prevention. Antibiotic resistance threats in the United States. 2013. [Internet]. 2013 April 23 [cited 2022 Oct 20]. Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
8. Fitchett JR. Antimicrobial resistance: opportunity for Europe to establish global leadership. Lancet Infect Dis. 2016; 16 (4): 388–9.
9. Jones RN, Fuchs PC, Gerlach EH, et al. Piperacillin and carbenicillin; a collaborative *in vitro* comparison against 10,838 clinical bacterial isolates. Cleveland Clin Quart. 1979; 46(1): 49–55.
10. Maloy SR, Nunn WD. Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1981; 146(2): 831.
11. Neu HC, Swarz H. Printed in Great Britain 301 resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* to carbenicillin. J Gen Microbiol. 1969; 58(3): 301–5.
12. Podolsky SH. The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). Palgrave Commun [Internet]. 2018 Oct 23 [cited 2023 Oct 17]; 4(1): 124. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41599-018-0181-x>
13. Ramey A, Ahlstrom C. Antibiotic resistant bacteria in wildlife: perspectives on trends, acquisition and dissemination, data gaps, and future directions. J Wildl Dis. 2020; 56(1): 1–15.
14. Romanko MY, Ushkalov VO, Paliy AP, et al. Physiological activity of *Salmonella* spp. bacteria after lyophilization and rehydration. Probl Cryobiol Cryomed. 2022; 32(2): 158–163.
15. Santiago-Rodriguez T, Fornaciari G, Luciani S, et al. Gut microbiome and putative resistome of inca and italian nobility mummies. Genes [Internet]. 2017 Nov 7 [cited 2022 Oct 19]; 8(11): 310. Available from: <https://www.mdpi.com/10.3390/genes8110310>
16. Taylor J, Hafner M, Yerushalmi E. Estimating the economic costs of antimicrobial resistance: Model and Results. Cambridge: RAND Corporation; 2014. 87p.
17. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 10.0. [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Oct 13]. Available from: <http://www.eucast.org>

References

1. Antomono MYu. [Mathematical processing and analysis of biomedical data]. Kyiv: Medinform 2017: 578p. Russian.
2. Blanquart F. Evolutionary epidemiology models to predict the dynamics of antibiotic resistance. Evol Appl. 2019; 12(3): 365–83.
3. Bodey GP, Terrell LM. *In vitro* activity of carbenicillin against gram-negative bacilli. J Bacteriol. 1968; 95(5): 1587–90.
4. Brumfitt W, Percival A, Leigh D. Clinical and laboratory studies with carbenicillin. A new penicillin active against *Pseudomonas pyocyanea*. Lancet. 1967; 289(7503): 1289–93.
5. Centers for disease control and prevention. Antibiotic resistance threats in the United States. 2013. [Internet]. 2013 April 23 [cited 2022 Oct 20]. Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
6. Fitchett JR. Antimicrobial resistance: opportunity for Europe to establish global leadership. Lancet Infect Dis. 2016; 16 (4): 388–9.
7. Jones RN, Fuchs PC, Gerlach EH, et al. Piperacillin and carbenicillin; a collaborative *in vitro* comparison against 10,838 clinical bacterial isolates. Cleveland Clin Quart. 1979; 46(1): 49–55.
8. Maloy SR, Nunn WD. Selection for loss of tetracycline resistance by *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1981; 145(2): 1110–1.
9. Neu HC, Swarz H. Printed in Great Britain 301 resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* to carbenicillin. J Gen Microbiol. 1969; 58(3): 301–5.
10. [On the approval of methodological guidelines: Determination of microorganisms' sensitivity to antibacterial drugs: Order of the Ministry of Health of Ukraine No 167], 2007 Apr 05. Kyiv: Ministry of Health of Ukraine, 2007. – 51p. Ukrainian.
11. Podolsky SH. The evolving response to antibiotic resistance (1945–2018). Palgrave Commun [Internet]. 2018 Oct 23 [cited 2023 Oct 17]; 4(1): 124. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41599-018-0181-x>
12. Ramey A, Ahlstrom C. Antibiotic resistant bacteria in wildlife: perspectives on trends, acquisition and dissemination, data gaps, and future directions. J Wildl Dis. 2020; 56(1): 1–15.
13. Romanko MY, Ushkalov VO, Paliy AP, et al. Physiological activity of *Salmonella* spp. bacteria after lyophilization and rehydration. Probl Cryobiol Cryomed. 2022; 32(2): 158–163.
14. Salomanov AG. [Resistance to antibiotics and biocides]. Int J Antibiotics and Probiotics. 2017; 1(2): 92–125. Ukrainian.
15. Santiago-Rodriguez T, Fornaciari G, Luciani S, et al. Gut microbiome and putative resistome of inca and italian nobility mummies. Genes [Internet]. 2017 Nov 7 [cited 2022 Oct 19]; 8(11): 310. Available from: <https://www.mdpi.com/10.3390/genes8110310>
16. Taylor J, Hafner M, Yerushalmi E. Estimating the economic costs of antimicrobial resistance: Model and Results. Cambridge: RAND Corporation; 2014. 87p.
17. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 10.0. [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Oct 13]. Available from: <http://www.eucast.org>

