



TARTU RIIKLIK ÜLIKOOL

GENEETIKA JA DARVINISMI KATEEDER

T I I U I L U S

EPISOOMSETE ELEMENTIDEGA BAKTERITÜ-
VEDE AKRIFLAVIINIRESISTENTSUSEST

Diplomitöö

M. Lillmäe
18. mail 1973.

Juhendaja:

bioloogiakandidaat Ain Heinaru

*Kaitmisele
lubatud*

19. V 73. *H. Kallak*

TARTU 1973

SISUKORD

	Lk
SISSEJUHATUS.....	2
A. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	4
I R- ja col-faktorite üldine geneetiline struktuur.....	4
1. R-faktoritest.....	4
2. Kolitsinogeensusfaktoritest.....	8
3. R- ja col-faktorite seosest.....	9
II Episoomsete elementide eliminatsioonist...	11
III Akридиinide mõjust R-faktoritele.....	15
B. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	19
I Katsematerjal ja meetodika.....	19
1. Üldine meetodika.....	19
a) kasutatud söötmed.....	19
b) kasutatud mikroobitüved	21
2. R-faktori tüübi määramine.....	21
3. Kolitsinogeensususe määramine.....	22
4. Kolitsiintundlikkuse määramine.....	23
5. S-R dissotsiatsioonivormi määramine....	23
6. Konjugatsiooniline ristamine.....	24
7. Akriflaviiniresistentsuse määramine....	25
8. Eliminatsioonikatsed.....	27
9. Ohutusnõuded.....	31
II Katsetulemused ja arutelu.....	32
1. Uuritavate tüvede üldiseloomustus.....	32
2. Katsed akriflaviiniga ja R-faktorite eliminatsioon.....	40
C. KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED!	54
Резюме.....	56
KIRJANDUS.....	57

S I S S E J U H A T U S

Viimase paarikümne aasta jooksul on tekkinud uus suund mikrobioloogias - nimelt on hakatud suurt tähelepanu osutama kromosoomiväliste geneetiliste elementide, episoomide e. plasmiidide uurimisele.

Episoomsete elementide hulka kuuluvad teatavasti F- e. sugufaktorid, R- e. ravimresistentsusfaktorid, col- e. kolitsinogeensusefaktorid, osa mõõdukaid faage jt.

Käesolevas töös on põhitähelepanu pööratud R-faktorite geneetilise struktuuri ja fenotüübilise avaldumise uurimisele, vähesel määral ka nende seosele col-faktoritega.

R-faktorid, determineerides resistentsust ravimitele, omavad suurt tähtsust nii mikroobigeneetika teoreetiliste probleemide uurimisel kui ka meditsiinis ja veterinaarias (tänu R-faktoritele on paljude antibiootikumide kasutamine ebaefektiivne).

Viimatinimetatud asjaolu tingibki vajaduse uurida mitmesuguste toimeainete mõju episoomsete elementide, eriti aga R-faktorite eliminatsioonile bakterirakust. Kirjanduse andmetel on üheks R-faktorite eliminatsiooni põhjustajaks aineks akriflaviin. Siiski on tema mõju kohta R-faktorile saadud väga erinevaid tulemusi.

Lähtudes ülaltoodust oli käesoleva töö ülesandeks

- 1) võrrelda eri bakteritüvede akriflaviinresistentsust
- 2) uurida erinevate R-faktorite mõju ühe ja sama retsi-pienttüve akriflaviinitundlikkusele ning

a) selgitada, kas esineb seos R⁺ bakterite col-

faktorite esinemise ja akriflaviintundlikkuse vahel ja

b) kas esineb seos R-faktori determinantide ja bakteri akriflaviinitundlikkuse vahel

3) viia läbi ristamisi erineva akriflaviiniresistentsusega tüvede vahel ning jälgida, kuidas R-faktori ülekandmine mõjutab bakteritüve akriflaviiniresistentsust

4) uurida R-faktorite elimineerumist akriflaviini toimel

5) vaadelda, kuidas R-faktori kaotamine mõjutab bakteri akriflaviiniresistentsust

6) jälgida, kuidas mõjub R^+ bakteritüvedele nende pikaajalisem mõjutamine akriflaviiniga.

Töö eksperimentaalne osa on tehtud TRü geneetika ja darvinismi kateedris. Töö valmimisel osutatud abi ja nõuannete eest tänan oma juhendajat bioloogiakandidaat A. Heinaru.

A. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

I R- ja col-faktorite üldine geneetiline struktuur

1. R-faktoritest.

1950-ndate aastate lõpus, kui hakati märkama antibiootikumide antibakteriaalse efekti kadumist, avastati Jaapani teadlaste poolt ravimresistentsuse faktor ja selle ülekanne k konjugatsiooniprotsessis (Anderson, 1968).

1960.a. tegid Watanabe ja Fukasawa kindlaks, et ülekan-
duv ravimresistentsus on põhjustatud autonoomselt replikeeru-
va episoomse elemendi poolt. Mitsuhashi tähistas vastava
geneetiliste determinantide kompleksi tähega R (Mitsuhashi,
1965). See kompleks sisaldab resistentsusgeene e. r-determi-
nante ja episoomset elementi RTF (ingl. - resistance transfor-
factor), mis põhjustab resistentsusdeterminantide ülekannet
(Кыггай, 1969). R-determinandid põhjustavad resistentsust
mitmele ravimile üheaegselt - näit. streptomütsiinile, kloor-
amfenikoolile, tetratsükliinile ja sulfoonamiididele (Mitsu-
hashi, 1965). On andmeid ka resistentsusest rohkem kui nel-
jale ravimile. Peale episoomse ravimresistentsuse tuntakse
ka kromosoomset ravimresistentsust. Põhilised erinevused
kromosoomse ja episoomse resistentsuse vahel on järgmised
(Кыггай и др., 1972):

1) episoomid põhjustavad bakteri resistentsust mitmele
ravimile korraga. Kromosoomsed mutandid on resistentsed ainult

ühele ravimile. Mutandid mitmese resistentsusega (2 - 8 ravimile) on vähe tõenäolised.

2) Episoomsed resistentsusgeenid elimineeruvad rakust sageli üheaegselt kas spontaanselt või teatud ühendite mõjul. Kromosoomne resistentsus on stabiilsem.

3) Episoomidele on omane infektsiooniline pärilikkus - ravimresistentsus kandub kõrge sagedusega üle teistesse bakterirakkudesse.

4) Episoomi iseloomustab suhteliselt sõltumatu olek bakteri kromosoomist (replikatsioon, infektsioosne levik, eliminatsioon).

Mõnede teadlaste poolt on leitud, et peale ravimresistentsuse determineerivad R-faktorid resistentsust ka raskemetallide sooladele (Smith, 1967), tundlikkust akridiinvärvidele (Yoshikawa, 1971) ning et R-faktori koosseisus on mitmeid raku omadusi, näit sorbiidi käaritamist, faagi T2 lüüsi jne. determineerivad geene (Анучиноб ур, 1969). Novicki (1969) arvates sisaldab suurem osa plasmidi genoomist talle ebaolulisi determinante, mis on allutatud raku fenotüübile.

Ülekandefaktorid e. sugufaktorid tuntakse enterobakteritel kahte eri tüüpi: F- ja I-sarnased. Need kaks tüüpi determineerivad vastavate sugukiukeste sünteesi, mis erinevad üksteisest antigeense struktuuri poolest (Lawn jt., 1971). F-tüüpi sugufaktoriga R-faktoreid nimetatakse f_i^+ R-faktoriteks. Nad inhibeerivad F-faktori fertiilsust ja lüüsuvad F-spetsiifilise faagi toimel (Meynell ja Dalta, 1966).

I-tüüpi sugufaktoriga R-faktorid e. f_i^- R-faktorid ei pärsi F-faktori funktsioone, on aga tundlikud I-sarnastele niitjatele faagidele (Meynell jt., 1968). Moody ja Runge (1972) tegid katsedes E-coli rakkudega kindlaks, et bakteri kromosoomil on võimelised integreeruma ainult F-sarnased

plasmiidid. Kui plasmiid (F-, R- või col-faktor) on stabiilselt integreerunud, moodustades HFr-tüve, on tal bakteri kromosoomi DNA replikatsiooni initsieriv osa. I-sarnased plasmiidid nende autorite andmetel ei integreeru. Ka R-faktori madalam ülekandesagedus võrreldes F-faktoriga on tingitud fi^+ R-faktori poolt sünteesitavast tsütoplasmaatilisest repressorist, mis inhibeerib R-faktori fertiilsust. R-faktori fenotüübiline derepressioon võib olla tingitud repressori puudumisest või mittetundlikkusest sellele. Repressori toime mehhanismi kohta täpseid andmeid pole. Arvatakse, et ta toimib RNA sünteesi tasemel, inhibeerides geeni avaldumist (Silver, Cohen, 1972).

Üldiselt pooldatakse seisukohta, et R-faktor tekib RTF (sugufaktor) assotsiatsioonil r-determinandiga, moodustades ühtse kompleksi (Kygnau, 1969). Kuid on ka erinevaid seisukohti antud küsimuses. Näit. Coheni ja Milleri (1970) järgi on R-faktorid kompleksid geneetiliselt sõltumatutest DNA ühikutest. Ultratsentrifuugiga tehti kindlaks, et E. coli ja Proteus Mirabilis'e R-faktor koosneb kahest sõltumatult replikeeruvast DNA rõngast tihedustega 1,709 (ülekandefaktor) ja 1,718 (kannab resistentsusdeterminante).

Seda, et R-faktor koosneb kahest iseseisvast osast, tõendavad ka ristamiskatsed, kus E. coli r-determinantidega mitteinfektsioossele tüvele kanti üle RTF-faktor (sugufaktor) tüvelt, millel puudusid r-determinandid. Moodustusid rekombinandid ülekandevõimeliste R-faktoritega (Mitsuhashi, 1969).

Novick (1969) on esitanud hüpoteesi, mille järgi plasmiid sisaldab raku kromosoomile kinnitumise saiti ning replikatsiooni repressiooni (või initsiatsiooni) saiti. Nende abil on plasmidi ja raku replikatsiooni tsüklid omavahel kordineeritud.

Paljude r-determinantidega R-faktori, näit. $R_{(Tc, Cm, Sm, Su)}$ tekke seletamiseks on avaldatud mitu hüpoteesi (Mitsuhashi, 1965):

1) R-faktori sellased olid mikroobides olemas enne anti-biootikumide laialdast kasutamist;

2) Episoom, millel polnud resistentsusgeene, omandas need resistentsuse mikroobi kromosoomilt. Omandamine on soodustatud tetratsükliini, streptomütsiini jt. antibiootikumide laia kasutamise tõttu;

3) $R_{(Cm, Sm, Tc, Su)}$ oli olemas, kuid tal puudus transmissiivsus. Hiljem ta omandas selle teistelt episoomidelt (F-faktor, mõõdukas faag).

Mis puutub R-faktoritega bakterite levikusse, siis on neid leitud kogu maailmas (Бельский, 1969). Katseliselt on kindlaks tehtud, et R-faktor võib üle kanduda Salmonella ja Shigella perekondade ning E. coli tüvede vahel (Watanabe ja Fukasawa, 1960), aga ka teiste sugukondade esindajatele. Belski (Бельский, 1972) andmetel kandub R-faktor inimese sooles sisseviidud doonorilt üle normaalsele soole floorale (näit. Shigellalt E. colile). Inimestel, kes pole kasutanud antibiootikume, on resistentsete enterobakterite esinemine haruldane ja lühiajaline. Autor oletab, et R-faktor, mis pole bakterile hädavajalikuks komponendiks, loob mingid eelised R^- bakterite ees ainult antibiootikumide olemasolu korral. Nende puudumisel on R^+ isendid võib-olla vähem kohastunud mitmesugustele faktoritele, mis mõjuvad looduslikes tingimustes ja seetõttu elimineeruvad järkjärgult, andes koha R^- rakkudele.

Võrreldes R-faktori ülekandega in vitro on inimese (jt. imetajate) sooles ülekanne tugevasti alla surutud. Arvatakse, et see on põhjustatud teiste soolebakterite ainevahetusproduk-

tide (Wiedemann, Knothe, 1970) või mitmesuguste keskkonna-tingimuste, näit. madala pindpinevuse tõttu (Chaloupecky, 1972).

R-faktoritega patogeensete mikroobide organismist kõrvaldamise ainsaks reaalseks meetodiks peetakse praegu antibiootikumide kasutamist nii suurtes kogustes, mis oleksid mikroobidele surmavaks (Watanabe, 1971). R-faktorite elimineerimine bakteritest mitmesuguste kemikaalidega in vivo pole õnnestunud.

2. Kolitsinogeensusefaktoritest (col-faktorid).

Col-faktorid on kromosoomivälised geneetilised determinandid, mis kontrollivad valgusarnaste, inhibeeriva aktiivsusega ainete - kolitsiinide - sünteesi. Võime sünteesida kolitsiini avastas Gratia 1925.a. E. coli tüvedel (Кыгнану, 1969).

Tuntakse transmissiivseid ja mitte-transmissiivseid col-faktoreid. Esimestel on nagu R-faktoritelgi F- või I-sarnane sugufaktor, teised assotsieeruvad ülekandel sugufaktori või transmissiivse col-faktoriga (Novick, 1969).

Kolitsiinid erinevad tavalistest antibiootikumidest, sarnanedes oma mõjumise mehhanismi poolest virulentsetele faagidele (adsorbeeruvad tundliku bakteri pinnaretseptoritel). Uurimused näitavad, et ainsat kolitsiini molekulist piisab tundliku bakteri surmamiseks (Ozeki, 1968). Arvatavasti on kolitsiinidel kaks funktsionaalselt erinevat komponenti, millest üks võimaldab kolitsiini adsorptsiooni raku pinnale, teine aga on antigeensete omadustega (Nomura, 1967). Kolitsiin, mis on adsorbeerunud bakteril, ei tungi raku sisemusse, vaid avaldab bakteri kromosoomile kaudset toimet. (Кыгнану и Лукогел, 1966).

On teada, et kolitsiini süntees põhjustab vastava raku hukkumist, kuid kolitsiini sünteesi determineeriva struktuurgeeni talitlus on bakterite populatsioonis pidurdatud enamikus col-faktorit omavates bakterites. Kolitsiini sünteesi reguleeritakse tõenäoliselt mingi tsütoplasmaatilise repressori poolt (Nomura, 1967). Kolitsinogeensed bakterid on tuntud sama tüüpi kolitsiini mõjule, mida sünteesitakse infitseeritud populatsiooni rakkude poolt.

Kolitsiinresistentsuse teket seostatakse raku pinna spetsiifiliste retseptorite kadumisega. Arvatakse, et selle põhjuseks on mutatsioon, mis lokaliseerub bakteri kromosoomi vastavas lookuses. On aga ka andmeid, mille järgi resistentsus on seotud mõnede geenidega R-faktori koosseisus (Siccardi, 1966).

Küsimus, kas col-faktorid on rakus autonoomses või integreerunud olekus, on veel lahtine, sest tõendeid on mõlema seisukoha poolt. Clowes ja Moody (1965) näiteks tõestavad katseliselt, et col-faktorid on rakus autonoomselt nagu tsütoplasmaatilised elemendid. Ebaõnnestunud elimineerimiskatsed akriidiinvärvidega toetavad aga mõtet, et col-faktorid on integreerunud olekus (Итагакко, 1967). On siiski ka üks õnnestunud katse (Лопкебург и др., 1964), kus E.coli CA 53 (col I) ja mittekoltsinogeense tüve E.coli 94 konjugatsioonisegu töötlemisel akriflaviiniga vähenes kolitsinogeensete bakterite hulk. Siit võib järeldada, et on olemas mitmesuguse tundlikkusega kolitsinogeenseid baktereid.

3. R- ja col-faktorite seosest.

R- ja col-faktorite vastastikuse toime kohta on teada, et col-faktor rekombineerub R-538 drd -ga (s.o. mittepidur-

datud mutant), andes transmissiivse plasmiidi, mis sisaldab col-determinante ja R-faktori sugufaktorit, kuid mitte resistentsusdeterminante (Cooper, 1971). Rekombinatsiooni on täheldatud ka F-sarnase col -faktoriga bakteri infitseerimisel f_i^+R222 -ga (tekkis 30% Cm-resistentseid rakke). Oletatakse, et rekombinatsioon on võimalik homoloogiliste osade olemasolu tõttu colV2 ja R222 vahel (Moody, 1970).

Ka on katseliselt kindlaks tehtud, et paljud ülekanduva col-faktoriga E.coli tüved ($tr^+ col^+$) omavad tüüpilisi juuresolekul võimet mobiliseerida kromosoomiväliseid Sm-resistentsusdeterminante, mis varem ei kandunud üle retsipientrakku. Sm-determinantide ülekandega kaasnes alati col-faktori ülekanne. See näitab $tr^+ col^+$ tüvede ökoloogilist tähtsust (neid on leitud E.coli metsiktüvede hulgas) resistentsusdeterminantide levikul looduslikes tingimustes (Federicq jt., 1971).

II Episoomsete elementide eliminatsioonist

Episoomsete elementide eliminatsioon võib toimuda kahel viisil:

- 1) spontaanselt
- 2) mõjutades mitmesuguste agensitega.

On andmeid, et peale *E. coli* K 12 $R_{(Sm, Cm, Sa)}$ -faktoriga tüvede kolmeaastast säilitamist kaotasid umbes 90% neist spontaanselt R-faktori. Osadel rakkudel kadus ainult R-faktori ülekandevõime (Mitsuhashi, 1969). Peaaegu alati võib R-faktoritega kultuuridest leida tundlikke rakke, mis on spontaanselt kaotanud R-faktori. Neid võib kultuuris olla kuni 1% (Watsanabe, Fukasawa, 1961).

Kuna bakterite episoomne ravimresistentsus kujutab endast tõsist ohtu resistentsete mikroobide piiramatuks levikuks, siis pööratakse viimaselajal R-faktorite uurimisele suurt tähelepanu nende rakust elimineerimise võimalustele. Siiani pole veel saavutatud sellist eliminatsiooni efekti, et seda saaks kasutada kliinilistel eesmärkidel (Kygnau u. q. 1972). Asja muudab keerukamaks ka see, et suurem osa tuntud elimineerivatest vahenditest on kas mutageenid või kantserogeenid.

Elimineerivate agensitena kasutatakse sagedamini ultraviolettkiirgust, temperatuuri muutust, tümiini vaegust, raskemetallide soolaid, lämmastikushapet. Kõige sagedamini kasutatakse siiski akridiinvärvidega (akriflaviin, akridiinoranž, akrihhiin) mõjutamist. Toodud agensid võivad esineda nii induktoritena kui ka elimineerijatena, olenevalt raku füsioloogilisest seisundist, doosist, ekspositsiooniajast

jt. tingimustest (Kygyaü, 1969). Nendest tingimustest sõltub ka eliminatsiooni kiirus.

Ravimresistentsuse elimineerumist temperatuuri mõjul on uuritud näit. Staphylococcus Aureus'el. Inkubeerimisel 43°C juures 6 tunni jooksul kadus resistentsus Pn, Sm ja Tc osas 13-1 uuritud R⁺ tüvel 18-st (Kasuga jt., 1968). Kirjanduses on andmeid, nii F-, R- kui ka col-faktorite eliminatsiooni kohta (viimase kohta küll vähem), põhiliselt akridiinvärvidega. Nähtavasti kujutavad akridiinid endast universaalseid vahendeid mitmesuguste episoomide elimineerimiseks.

Nagu juba öeldud, elimineerub col-faktor väga harva. Nii näiteks E.coli col I rakkude töötlemisel 0,65 M HNO₃-ga 90° juures 15 minuti vältel elimineerus 0,8% rakkudest col-faktor. Akriflaviin (20 - 200 g/ml) toodud katses col I faktorit ei elimineerinud (Deyko ja Lorkiewiez, 1970).

Akriflaviiniga keskkonnas on kolitsinogeensuse ülekanne tugevasti vähenenud, eriti HFCT-süsteemis. Vähenemine on tingitud äsja col-faktori omandanud rakkude hukkumisest. Arvatakse, et neil rakkudel, mis on äsja omandanud col-faktori, on kõrgenenud tundlikkus akriflaviinile. LFCT-süsteemi populatsioonis akriflaviin ei mõjunud col-faktori ülekandele. On veel teine võimalus: col-faktor, mis pärast infektsiooni on mõnda aega autonoomses olekus elimineeritakse akriflaviini poolt (Luxogeg u Παγαυκο, 1965).

Episoomidest elementidest kõige kergemini elimineeritav on F-faktor (Clewes, 1972). Näiteks Grindley jt said F-faktori ja n-determinantidega (K - kanamütsiinresistentsuse determinant). E.coli rakkude töötlemisel akridiinoranžiga 3 tüüpi kolooniaid: F⁺K⁻, F⁻K⁺ ja F⁻K⁻. See näitab, et toimus sõltumatu K-determinandi ja F-faktori eliminatsioon. Hfr(K) tüve-

des elimineerus vaid K, mitte F. Tähendab, K-determinant oli sõltumatus olukorras nii, F^+ kui Hfr-tüvedes (Grindley jt. 1970).

Üsna palju on uuritud R-faktorite rakust elimineerumist mitmesuguste agensite mõjul (Mitsubishi jt., 1961; Watanabe ja Fukasowa, 1961; Yoshikawa, 1971; Асманов, 1971; Грамман, 1972).

R-faktorite elimineerumise mehhanismid pole aga lõpuni selgitatud. Samuti on lahtine ka bakterite resistentsuse ja tundlikkuse küsimus mitmesugustele ainetele.

Nii näiteks on Glatman uurinud kofeiini, rifampitsiini ja etiidiumbromiidi mõju E.coli R^+ tüvedele (Грамман, 1972). Ta leidis, et kofeiin ei põhjusta resistentsusmarkerite eliminatsiooni, kuid mõjub R 1 drd faktori ülekandele konjugatsioonil, pidurdades seda ensüümide sidumisega. Ka etiidiumbromiid surus alla R-faktori ülekande. Seevastu rifampitsiini mõjul toimub E.coli R^+ kultuurides R^- rakkude selektsioon. See on põhjuseks, miks rifampitsiini mõjul kaob R^+ kultuuride ravimresistentsus. Näit. E.coli R I drd kultuuri töötlemine selle ainega 30 minuti vältel tõstis tunduvalt bakterite tundlikkust Cm ja Tc suhtes. Watanabel (1971) on õnnestunud in vitro rifampitsiini abil elimineerida R-faktoreid.

Yoshikawa (1971) andmetel põhjustas nalidiksiinhappe, akriflaviini ja kanamütsiiniga töötlemine E.coli R^+ ja R^- kultuuride eluvõime langust. Pikemaajalisemal mõjutamisel aga R^+ kultuurides eluvõime tõusis. Seega R-faktori olemasolu bakteris tõstab mutatsioonide sagedust, mis muudavad teda resistentseks nende ainete suhtes. Resistentsust põhjustanud mutatsioonid ise leiti bakteri kromosoomis, mitte R-faktoris. Siin on seega tegemist R-faktori kaudse mõjuga.

Eliminatsiooni püütakse seletada ka plasmiidide replikatsiooni häiretega. Yamagata (1969) andmetel autonoomse F-faktoriga E.coli rakkude pikemaajalisel kultiveerimisel akriflaviiniga söötmel F-faktor kaob. Ta esitab mitu hüpoteesi selle nähtuse seletamiseks:

- 1) akридиin blokeerib F-faktori replikatsiooni;
- 2) häiritakse replikatsiooni initsiatsiooni;
- 3) akридиin ei mõju replikatsioonile, kuid viib F-faktori koopiate ebavõrdsele jagunemisele tütarrakkudes. (Yamagata, Uchida, 1969).

Viimasel ajal seostatakse elimineerivate ainete mõju bakterirakule tema pinnastruktuuriga (Salisbury, Hedges, Dalta, 1972). Uuriti akriidiinoranži (AO) ja naatriumdodetsüülsulfaadi (SDS) mõju F⁺- ja R-faktoritele. F-faktorid elimineerusid AO mõjul hästi nii nendest rakkudest, mis pidevalt sünteesisid sugukiukest (drd), kui ka nendest, milles kiukeste süntees oli represseritud f⁺R faktori tõttu. Derepresseritud (drd) kiukeste sünteesiga F- ja I-sarnaste R-faktoritega mutandid olid vähem mõjutatavad AO-ga kui metsiktüüpi (represseritud) plasmiidid. SDS-ga töötlemine selekteeris F-kiukest sünteesivast R⁺ kultuurist välja ilma kiukesteta rakud kaotatud või mutantse R-faktoriga (sama tulemuse said ka Tomoeda jt. 1968.). Derepresseritud plasmiidide olemasolu muutis raku tundlikumaks SDS-le. Detergendid (ka SDS) mõjuvad bakteri membraanile. Sellega on seletatav kiukestega rakkude suurem tundlikkus SDS-le (kiukesed võimaldavad detergendi parema ligipääsu membraanile). Ilma kiukesteta rakkude arvu tõus on tingitud mitte otsesest efektist plasmiidile, vaid spontaansete ilma kiukesteta variantide selektiivsetest eelistest.

III Akridiinide mõjust

R-faktoritele

Akridiinvärve on kasutatud kõikide episoomide eliminatsiooni uurimiseks.

Akriflaviin nagu teisedki akridiinvärvid on tuntud kui mutageen. On kindlaks tehtud, et akriflaviin tungib kromosoomis DNA aluste vahele ja põhjustab sellega replikatsiooni- vigu. Ka on teada, et kompleksi DNA-akridiin moodustumisel aktiveeritakse või inhibeeritakse polünukleotiidfosforülaasi (Couper, 1969). Üldiselt on akridiinvärvid bakteriostaatilise toimega, pidurdades mikroobide kasvu, kuid mitte surmates neid.

Uurides akridiinide mõju episoomsetele elementidele on kindlaks tehtud, et nad võivad elimineerida F-, R- ja vähesel määral ka col-faktoreid. On selgunud, et kakridiinid elimineerivad plasmiide vaid siis, kui viimased on autonoomses olekus (Clowes, 1972). Nii toimub sugufaktori F eliminatsioon F^+ populatsioonist ligi 100%-lise sagedusega. Üleminekul integreerunud olekusse Hfr pole sugufaktor ega elimineeritav (Hirota, 1960). Sellepärast soovitavad mõned autorid (Mitsubishi jt., 1961) R-faktorite elimineerumist akridiinide toimel kasutada nende autonoomse oleku tõendina, ehkki R-faktorid elimineeruvad madala sagedusega.

Kuid mitte kõik episoomid pole akriflaviini mõjul elimineeritavad. Näiteks mõned R-faktorid elimineeruvad kõrge sagedusega (Vondraškova ja Štarka, 1966), teised aga üldse mitte (Meynell jt., 1968).

Eliminatsioon akridiini toimel sõltub ka tüvest, millesse R-faktor on viidud. Watanabe (1963) andmetel mõjub akrifla-

flaviin ühe ja sama R-faktori elimineerimisele erinevalt Shigella sp. ja E. coli tüvedes (elimineerus vastavalt 46% ja 0,9% R-faktoritest). Akridiinoranžiga tehtud katsetes täheldati ampitsilliinresistentsuse kadumist tüvedel Salmonella oranienburg ja Salmonella derby, kuid mitte tüvel Salmonella panama (Bandens ja Chabbert, 1967). Akridiinoranži mõju erinevatele plasmiididele on erinev: kõige efektiivsemalt elimineerib ta F-faktorit, samal ajal on Col M ja Col Ib talle täiesti resistentsed (Clowes, 1972). Erinevalt aga [^]nimestus Tanakal mõnel Sh. sonnei tüvel col-faktori eliminatsioon akridiinoranži toimel (Watanaka, 1970).

See, kas elimineeruvad kõik R-faktori resistentsusdeterminandid või ainult osa, sõltub nähtavasti R-faktori omadustest. Nii on Watanabe ja Fukasawa (1961) täheldanud alati kõigi, seevastu Kétyi ja Vertenyi (1967) vaid vahel kõigi, vahel aga ainult osa r-determinantide eliminatsiooni.

Üldiselt on teada, et eri bakteritüved ise on erineva akriiflaviinresistentsusega, kusjuures see on määratud kromosoomsete geenide poolt. Raku vastupidavus akriiflaviinile määratakse geeni Acr A poolt, mis asub kromosoomil lac lookuse lähedal (Nakamura ja Sugamuma, 1972). Selline resistentsus pole elimineeritav akridiinvärvidega.

Kirjanduses esineb vastukäivaid andmeid R-faktoritega bakteritüvede akriiflaviinresistentsuse kohta. Osa uurijaid on arvamusel, et akriiflaviini toimel selekteeruvad R^+ bakterikultuurist välja R^- segregandid, s.t. bakterid, mis on spontaanselt kaotanud R-faktori. R^+ bakterid akriiflaviini toimel hukuvad (Yoshikawa ja Sewag, 1967). Näit. Yoshikawa (1971) uuris R-faktorite eliminatsiooni akriiflaviiniga E. coli, Shigella flekneri ja Salmonella typhimurium'i tüvedel,

mis sisaldasid või ei sisaldanud faktorit R_{100} . R^+ ja R^- rakkude segu kultiveerimisel akriflaviiniga söötmel suurenes R^- rakkude hulk. Sama täheldati ka R^+ rakkude kultuuris. Ka teised akridiinvärvid viisid R^- rakkude proportsionaalsele kasvule nii R^-R^+ segus kui ka R^+ kultuuris. Seega oleksid R^+ bakterid akriflaviinile tundlikumad kui sama tüve R^- vormid.

Teisest küljest püüab osa autoreid, seletada R-faktorite eliminatsiooni puudumist sellega, et vastavates tüvedes R-faktor asub integreerunult bakteri kromosoomil (Mitsushashi, 1961). Kuna akriflaviin mõjub esmalt just tsütoplasmaatilisele DNA-le, siis sel puhul pole R-faktorid mõjutatavad akriflaviini poolt (vähemalt nii kergesti mitte). On ka selline seisukoht, et r-determinantide ja F-faktori eliminatsioon toimub teineteisest sõltumatult (Grindley jt., 1970). Näit. tüvedes, kus F-faktor on integreerunud kromosoomil, elimineerub ainult resistentsusdeterminant.

Lähtudes esimesest seisukohast (Yoshikawa, 1971) peavad R-faktorit omama mingeid akriflaviintundlikkuse geene. Kui see oleks nii, siis oleks sama tõenäoline arvata ka akriflaviiniresistentsuse determinantide olemasolu.

Teise seisukoha järgi - kui R-faktor on integreerunud kromosoomil - jääb arusaamatuks, kuidas episoom saab üle kanduda teise bakterisse ilma kromosoomita.

On ka võimalik, et R-faktorite olemasolu bakterites põhjustab mingeid ainevahetusprotsesside muutusi, mis omakorda mõjutavad akriflaviiniresistentsust. Sel juhul ei pruugi R-faktor omada konkreetseid geene selle tunnuse määramiseks. Veel on teoreetiliselt võimalik, et R-faktori ja kromosoomi vahel toimub rekombinatsioon ja episoom saab endale kromo-

soomsed akriflaviinresistentsuse geenid. Näit. on kindlaks tehtud E.coli K-12 W 1895 geneetilise determinandi asukoht kromosoomil, mis kontrollib tundlikkust akriflaviinile ja teistele aluseliste värvidele (Nakamura, 1965). Spontaansete rekombinatsioonide juhtumeid episoomide ja kromosoomi geenide vahel on täheldatud näit. Staphylococcus aureus'el (Vernon, 1970).

Viimastel aastatel on bakterite resistentsuse mehhanisme mitmesugustele ainetele (antibiootikumid, mutageenid) hakatud seostama rakuseina ja membraanstruktuuride omadustega. Nii uurisid Nakamura ja Suganuma (1972) sellelt seisukohalt akridiintundlikke ($AcrA$) ja akridiinresistentseid ($AcrA^+$) tüvesid. Raku seinas erinevusi ei leitud, küll aga olid erinevused nende tüvede plasmamembraanides ja ribosoomide agregatsioonides, kui rakku töödeldi akriflaviiniga. Akriflaviini sidumise ja naatriumdodetsüülsulfaadi (SDS) tundlikkuse erinevused $AcrA$ ja $AcrA^+$ tüvede vahel on seoses plasmamembraanile erinevustega. Geen $AcrA$ vastutab raku akriflaviin-tundlikkuse eest. Akriflaviin mõjub esmalt plasmamembraanile ja $AcrA$ mutatsioon on sellega kaudselt seotud (katse tulemused näitasid, et $AcrA$ mutatsioon mõjub ka plasmamembraanile, mitte rakuseinale). Tekib plasmamembraani lamellatsioon.

Veel seostatakse kirjanduse andmetel akriflaviintundlikkust tsütoplasmaatilise repressori omadustega. Novick'i (1969) järgi siiski tsütoplasmaatiline repressor ei mõjuta bakteri akriflaviintundlikkust, sest fi^+ R-faktorite drd -mutandid ei ole tundlikumad akridiinidele kui nende pidurdatud variantid (Novick, 1969).

Üldiselt on kirjanduse andmed akriflaviinresistentsuse mehhanismide kohta vaesturääkivad ja neid on ebapiisavalt, nii et põhjalikku ülevaadet antud küsimusest anda ei saa.

B. EKSPIMENTAALNE OSA

I. KATSEMATERJAL JA METOODIKA

1. Üldine metoodika

a) kasutatud söötmed

Praktiliste tööde läbiviimiseks kasutati järgmisi söötmeid ja lahuseid:

- 1) Hottingeri hüdroolüsaat. Valmistati korruga suuremates kogustes, et jätkuks pikemaks ajaks. Valmistamise metoodika on lühidalt järgmine: 3 kg rasva- ja köõlustevabale hakklihale lisati 4,5 l vett ja kuumutati kuni aurumiseni (lihavesi peab jääma punaseks). Saadud segu valati suurtesse (10 - 20 l) pudelitesse, kuhu lisati 4,5 g Na_2CO_3 ja 18 g pankreatiini. HCl-ga reguleeriti pH 5,5-ni ning lisati 60 ml kloroformi, et takistada saastumist. Kummikorgiga suletud pudel asetati 2 - 3 päevaks termostaati (37°C) ning loksutati seda iga paari tunni järel intensiivselt. Enne lõplikku sulgemist lisati veel 60 ml kloroformi.
- 2) Lihapeptonpülgong (LPP) valmistati Hottingeri hüdroolüsaadist. 1,5 liitrile Hottingeri hüdroolüsaadile lisati 13,5 liitrit kraanivett, 135 g peptonpulbrit, 75 g NaCl ja 3 g Na_2HPO_4 . Saadud segu pH viidi NaCl lahuse lisamisega 7,0-ni ning keedeti selginemiseni. Seejärel autoklaaviti suurtes kolbides 1 t. 1 at juures, filtreeriti läbi kahekordse filterpaberi ja autoklaaviti veelkord 1 at juures 20 minutit (väikestes kolbides).
- 3) Lihapeptonagar (LPA) valmistati LPP-st, millele lisati

vastav kogus agar-agarit, olenevalt sellest, kas tehti 0,5 või 1,5%-line agarsööde.

4) Peptoonvesi valmistati peptoonpulbrist (10 g 1 liitri dest. vee kohta), lahusele lisati 5 g NaCl ning NaOH kuni pH=7,4. Sööde autoklaaviti, filtreeriti tekkinud sade ja autoklaaviti teistkordselt 1 at juures 30 minutit.

5) Endo sööde valmistati NSVL-s toodetavast preparaadist, mida lisati 5 g 100 ml dest. vee kohta. Segu keedeti 5 minutit, filtreeriti ning kuumutati uuesti keemiseni. Söödet sai kasutada ainult värskelt. Endo söötmega Petri tasse tuli enne kasutamist hoida pimedas.

6) Minimaalsöötmena (Davis ja Mingioli, 1950) kasutati järgmise koostisega lahust: KH_2PO_4 - 3,0 g; K_2HPO_4 - 7,0 g; Na-tsitraat - 0,5g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,0g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,1g; dest. vett kuni 1000 ml-ni. Lahusele lisati 15g agarit „Bacto” ning hiljem, enne kasutamist 10 ml 25%-list steriilset glükoosi vesilahust.

Kõiki söötmeid autoklaaviti 1 at juures 30 minutit, välja arvatud glükoosi lahus, mida steriiliti 0,5 at juures 30 minutit. Endo söödet steriiliti keetmise teel. Enne väljavalamist tassidele jahutati söötmeid $\approx 45^\circ$ -ni. Lisaks kasutati veel mitmeid ravimpreparaate: streptomütsiini (15 ja $200\mu\text{g/ml}$), klooramfenikooli ($25\mu\text{g/ml}$), tetratsükliini ($25\mu\text{g/ml}$), penitsilliini ($1000\mu\text{g/ml}$), neomütsiini ($20\mu\text{g/ml}$). Klooramfenikool lahustati alkoholis, tetratsükliin steriilses dest. vees, mille pH oli viidud HCl-ga 4,5-ni; ülejäänud ained lahustati dest. vees. Neomütsiini lisati söötmele (LPA), milles puudus NaCl (Heinaru, 1970). Akridiinvärvidest kasutati akriflaviini (British Drug Houses LTD), mida säilitati nii lahuse (konts. 1mg/ml) kui ka pulbrina.

Mikroobisuspensioonide lahjendamiseks kasutati füsioloogilist lahust (0,9 % NaCl lahus) või minimaalsöödet ilma glükoosi ja agarita.

Kõiki söötmeid steriiliti autoklaavis 1 at juures 30 minutit. Petri tasse ja tühje katseklaase steriiliti kuumkapis 160°C juures 2 tundi. Külviaasadega töötamisel steriiliti neid töö käigus pidevalt piirituslambi leegis. Boksi kiiritati enne töö algust ultraviolettlambiga 10-15 minuti jooksul.

b) kasutatud mikroobitüved

Põhiliseks katsematerjaliks olid 464 E.coli K12 R⁺ rekombinanttüve, mis olid saadud kaugõppeüliõpilaselt K. Leisilt Tartu raj. Sanitaar- ja Epidemioloogiajaamast. Pärast nende tüvede omaduste kindlakstegemist valiti neist välja huvitavamad edaspidisteka uuringuteks. Peale nende kasutati veel 18 rahvusvahelist standardtüve: E.coli K12 P678, E.coli HfrH, E.coli K12 C85, E.coli O111 H12 Len., E.coli O111 Sv, E.coli B, E.coli , E.coli K12 W3876 jt., lisaks veel 16 Fredericq'i kolitsinogeenset standardtüve.

Uuritavaid tüvesid säilitati pistekülvidena 0,5 %-lises LPA-s külmkapis.

2. R-faktori tüübi (r-determinantide) määramine (Heinaru, 1970)

R-determinandid määrati kõikidel töös kasutatud R⁺ tüvedel 5 ravimi suhtes: streptomütsiin (Sm), tetratsükliin (Tc), klooramfenikool (Cm), neomütsiin (Nm) ja penitsilliin (Pn). Kõigist ravimpreparaatidest tehti alglahjendused, lisades neile dest. vett kuni kontsentratsioonini 10000 μg/ml (klooramfenikool tuli eelnevalt lahustada etanoolis). Seejärel vee-

ti steriilse pipetiga ravimi lahust ja valati see kindlasse kogusesse vedelasse 45^o-ni jahutatud agarsöötmesse arvestusega, et

Tc	kontsentratsioon on	25 μ g/ml
Cm	"	on 25 μ g/ml
Pn	"	1000 μ g/ml
Nm	"	20 μ g/ml
Sm	"	15 μ g/ml ja 200 g/ml

Streptomütsiiniga tehti katse kahe erineva kontsentratsiooniga, sest eelkatsetes ja kirjanduse andmeil on osadel tüvedel täheldatud kõrget, osadel madalat Sm-resistentsuse astet.

Kui ravimiga sööde oli välja valatud ja üks ööpäev seisnud, tehti igal tassil olevale söötmele külviaasaga külvid kriipsukestena kõikide tüvede puljongkultuuridest. Järgmisel päeval vaadati mikroobide kasvu tassidel. Kasvu esinemisel on tüvi vastavale ravimile resistentne, s.t. omab resistentsusdeterminanti.

3. Kolitsinogeensuse määramine

Kasutati kahekihilise agari meetodit (Gratia, 1925).

Uuritavad tüved külvati pistekülvidena Petri tassidele agarsöötmesse (LPA) ja inkubeeriti üleöö. Seejärel surmati kolooniad kloroformi aurudega tilgutades Petri tassi kaanele mõned tilgad (ca 0,1 ml) kloroformi. 15 minuti möödudes avati Petri tassi kaas ja lasti kloroformi aurudel hajuda. Seejärel kaeti söötme pind sulatatud ja 45^o-ni jahutatud 0,5%-lise LPA-ga, millele oli eelnevalt lisatud 0,1 ml indikaatormikroobi logaritmilises paljunemisfaasis olevat kultuuri. Jälgiti, et segu kataks ühtlaselt Petri tassil oleva söötme pinna. Pärast ööpäevast inkubeerimist 37^oC juures

vaadati indikaatormikroobi kasvu (joon. 1.). Indikaatormikroobina kasutati E.coli tüvesid C85, K12 ja P678.

4. Kolitsiintundlikkuse määramine.

Kolitsiintundlikkus määrati Fredericq'i järgi. Käesolevas töös kasutati 16 Fredericq'i kolitsinogeenset standardtüve. Iga tüve värskest puljongkultuurist tehti külviaasaga joonkülv 1,5%-lisele LPA-le, kusjuures ühele Petri tassile külvati paralleelsete joontena kaks kolitsinogeenset tüve. Pärast 24 tunnist inkubeerimist 37°C juures surmati mikroobid kloroformi aurudega. Aurude eemaldamiseks lasti tassidel avatult seista 15-20 minutit. Järgnevalt tehti külviaasaga joonkülvid uuritavate tüvede puljongkultuuridest. Selleks tõmmati paralleelsed jooned Fredericq'i standardtüvedest tassi serva suunas ning kahe standardtüve vahele. Kokku külvati ühele tassile 15-18 uuritavat tüve. Vastavale standardkolitsiinile tundliku tüve korral esines kasvu pidurdus, s.t. standardtüve läheduses tundlik tüvi ei kasvanud (joon. 2).

5. S-R dissotsiatsioonivormi määramine

Mikroobitüvede dissotsiatsioonivormid määrati kahel meetodil:

a) alusklaasil viidi läbi aglutinatsioonireaktsioon trüpaflaviini 0,25 %-lises lahuses. Tekkinud teralisus alusklaasil olevas segus näitas R-vormi esinemist, ühtlaselt hägune segu S-vormi esinemist (Boivin jt. , 1936).

b) Mikroobide puljongkultuure keedeti katseklaasides 1 t. vesivannil. Keetmisel sadenesid R-vormis olevad rakud, puljong jäi selgeks. S-R-vormis olevad puljongkultuurid jäid veidi häguseks, S-vormis olevad kultuurid ei muutunud (Heinaru, 1970)

6. Konjugatsiooniline ristamine

Ristamiskatsete eesmärgiks oli saavutada R-faktori ülekandmine R^+ tüvedelt R^- retsipienti ning jälgida R-faktori omandamisega seotud muudatusi bakterirakus. Ristamiste läbiviimiseks kasutati kahte meetodit (esimest neist vähem):

1) Ristamine LPA-1

Doonorid ja retsiplendid külvati joontena LPA-le. Järgmisel päeval puudutati steriilse alusklaasi servaaga kasvanud mikroobikolooniate pinda ja kanti sellega kõikide uuritava tüvede rakud uutele HPA tassidele nii, et doonorid (auksotroofsed ja retsiplendid (prototroofsed ja Cm-tundlikud) oleksid külvatud ristjoontena. Joonte ristumiskohtades kasvavad juhul, kui oli toimunud rekombinatsioon, rekombinandid. Järgnevalt tehti nendelt tassidelt sametriididega jäljendkülv minimaalsöötmel, millele oli lisatud klooramfenikooli (25ug/ml). Kuna kasutatud doonorid olid auksotroofsed tüved, siis kasvasid sellel söötmel ainult prototroofsed rekombinandid, mis olid omandanud R-faktori.

2) Ristamine vedelsöötmes

Enamuses katsetes viidi bakterite konjugatsiooniprotsess läbi ristamissegus. Kasutati kahte süsteemi:

a) LFT-süsteem (low frequency of transfer system) e. madalsagedusliku ülekande süsteem (Watanabe, 1963). Doonoritena kasutati siin R^+lac^+ E.coli tüvesid, retsiplendina R^-lac^- tüvesid. Nii doonorite kui retsiplendide värsketest (lag-faasi) puljongkultuuridest võeti vastavalt 0,01 ja 0,1 ml suspensiooni ning viidi 5 ml LPP-sse. Pärast ööpäevast inkubeerimist termostaadis $37^{\circ}C$ juures toimusid väljakülvid Ende söötme tassidele (1 aasatäis mikroobisuspensiooni hõõruti steriilse spaatliga söötme pinnal laiali), mis sisalda-

sid klooramfenikooli (25 ug/ml). Endo söötmel saab rekombinante eristada laktoosi fermentatsiooni võime alusel - laktoosi mittefermenteerivad mikroobid (lac^-) annavad söötmel valgeid kolooniaid. Kuna kasutatud doonorid olid lac^+R^+ , retsiplendid aga lac^-R^- , siis oli rekombinante (lac^-R^+) doonoritest kerge eraldada värvuse järgi (R^- retsiplendid ravimiga söötmel ei kasvanud). Rekombinandid eraldati ja külvasi ümber säilitamiseks.

b) HFT-süsteem (high frequency of transfer system) e. kõrgsagedusliku ülekande süsteem (Watanabe, 1963). Selles süsteemis viiakse ristamine läbi kahes etapis, kasutades vahetsipienti. Kõik doonorid ja retsiplendid külvasi LPP-sse ja inkubeeriti 6 tundi. Seejärel võeti 1 normaalaasatäis doonorit ja 0,1 ml retsipienti (vahekord $\approx 1:10$) ning ristati 5 ml LPP-s. Segu inkubeeriti 20-24 tundi, siis ristati vahetsipient ja lõppretsipient uuesti 5 ml LPP-s, vahekorras 1:10 või 1:5. Ristamissegud inkubeeriti $37^\circ C$ juures 1 ööpäev ja tehti siis väljakülvid ravimiga selektiivsöötmele. Aukstroofsete retsipientide (lac^-), näit. E.coli K12 P678 ja E.coli W3876 puhul kasutati rekombinantide eraldamiseks ravimisisaldusega Endo söödet, prototroofsete retsipientide puhul (näit. E.coli O111 Sv, E.coli HfrH) aga ravimisisaldusega minimaalsöödet. Viimasel juhul aga doonorid pidid olema aukstroofsed, nii et söötmel said kasvada ainult R^+ prototroofsed rekombinandid. Pärast ristamist külvasi kontrolliks kõik doonorid ja retsiplendid ravimisisaldusega söötmele (minimaalsöötmel kasvu esineda ei tohi) (joon. 3.)

7. Akriflaviiniresistentsuse määramine

Akriflaviiniresistentsuse määramiseks töötati välja kaks meetodit. Kõigepealt tuli leida uuritavate tüvede akrifla-

viiniresistentsuse aste, st. akriflaviini kontsentratsioon, mille juures tüved enam ei kasva, ning edaspidi optimaalse kontsentratsiooni juures määrata täpsemalt iga tüve akriflaviiniresistentsus. Külvamiseks kasutati uuritavate tüvede värskaid puljongkultuure, millest tehti külvinõelaga külv neljale agarsöötmele tassile, kuhu oli lisatud vastavalt 100, 200, 300 ja 400 µg/ml akriflaviini. Akriflaviin oli lahustatud destilleeritud vees ja steriilitud autoklaavis. Pärast ööpäevast inkubeerimist kontrolliti, millistel tassidel mikroobitüved kasvasid.

Kuna see meetod andis vaid väga ligikaudseid andmeid akriflaviiniresistentsuse kohta, siis täpsemaks määramiseks ja tüvede omavaheliseks võrdlemiseks kasutati akriflaviini kontsentratsiooni gradientmeetodit (0-400 µg/ml). Meetodi eeliseks on see, et akriflaviini kontsentratsiooni muutus on sujuv ja võimaldab küllaldase täpsusega võrrelda erinevate tüvede akriflaviiniresistentsust. Määramine toimus järgmiselt: Veidi kaldu asetatud Petri tassile valati pipetiga 10 ml LPA-d ning lasti sellel tarduda. Seejärel asetati tass horisontaalsele lauale ja valati peale 10 ml LPA-d, mis sisaldas vajalikul hulgal akriflaviini. Tassile märgiti ära ka akriflaviini kontsentratsiooni tõusu suund. Kuna uuritavate tüvede akriflaviiniresistentsuse aste oli küllaltki erinev, kasutati täpsemaks määramiseks söötmeid 0-200 ja 0-400 µg/ml akriflaviini gradiendiga. (hilisemates katseseeriates kasutati ainult viimast). Ööpäeva vanustest uuritavate tüvede puljongkultuuridest tehti lahjendused 2 ml fosfaatpuhvrts (s.o. minimaalsööde ilma agari ja glükoosita) arvestusega, et üks normaalaasatäis sisaldaks umbes 200 mikroobi. Kui söötmetega tassid olid 1 ööpäev seisnud, kanti neile üks aasatäis mikroobisuspensiooni ja tõmmati sellega paral-

leelsed kriipsud tassi ühest servast teise akriflaviini kontsentratsiooni gradiendi suunas (joon. 4). Ühele tassile sai selliselt kanda 10-12 tüve. Järgmisel päeval mõõdeti ära kaugus, milleni erinevad tüved kasvanud olid. Selleks tõmmati vertikaaljoon 2,5 cm kaugusele tassi servast ja mõõdeti kõikide tüvede kasvu ulatus sentimeetrites selle joone suhtes (nii saadi võrdsed tingimused kogu tassi ulatuses).

Katsete käigus selgus, et õigem on mikroobisuspensiooni lahjendused fosfaatpuhvrts ära jätta ja teha külvid otse puljongkultuurist. Vastasel juhul sattus LPA-le liiga vähe mikroobe ning oli raske vahet teha pidurdatud ja pidurdamata kasvu vahel. Määramise juures tuli üldse silmas pidada seda, et akriflaviini kui bakteriostaatilise toimega aine puhul on tähtis külvatud mikroobide ja nendega kaasatuleva söötme hulk.

8. Eliminatsioonikatseted (Watanabe, 1963)

Eliminatsioonikatsete eesmärgiks oli jälgida R-faktorite elimineerumist akriflaviini toimel. Eelnevalt külvati kõik uuritavad tüved kontrolliks streptomütsiini-, tetratsükliini- ja klooramfenikoolisisaldusega (25 ug/ml) söötmetega tassidele, sest R-faktor võis säilitatud kultuuri osal rakkudel olla spontaanselt elimineerunud. Kontrollitud tüved külvati ümber LPP-sse ja inkubeeriti 4-6 tundi. Saadud mikroobisuspensioonist külvati 2 aasatäis akriflaviinisisaldusega (kontsentratsioon 20 ug/ml, pH=7,6) LPP-sse ja inkubeeriti üleöö. Edasi püüti teha väljakülvid LPA-ga tassidele nii, et igal tassil oleks loetav arv kolooniaid (40+200). Selleks kasutati järgmisi võimalusi:

a) pärast 24 t. inkubeerimist akriflaviinisisaldusega puljongis lahjendati 1 külviaasatäis mikroobisuspensiooni

10 ml füsioloogilises lahuses, sealt külvati 1 aasatäis edasi LPA-ga Petri tassile ja hõõruti spaatliga laiali (hõõruda tuli seni, kuni söötme pind muutus kuivaks). Iga bakteritüvi külvati 3 korduses.

b) 10 ml füsioloogilise lahuse asemel lahjendati 1 aasatäis mikroobisuspensiooni 5 ml füsioloogilises lahuses.

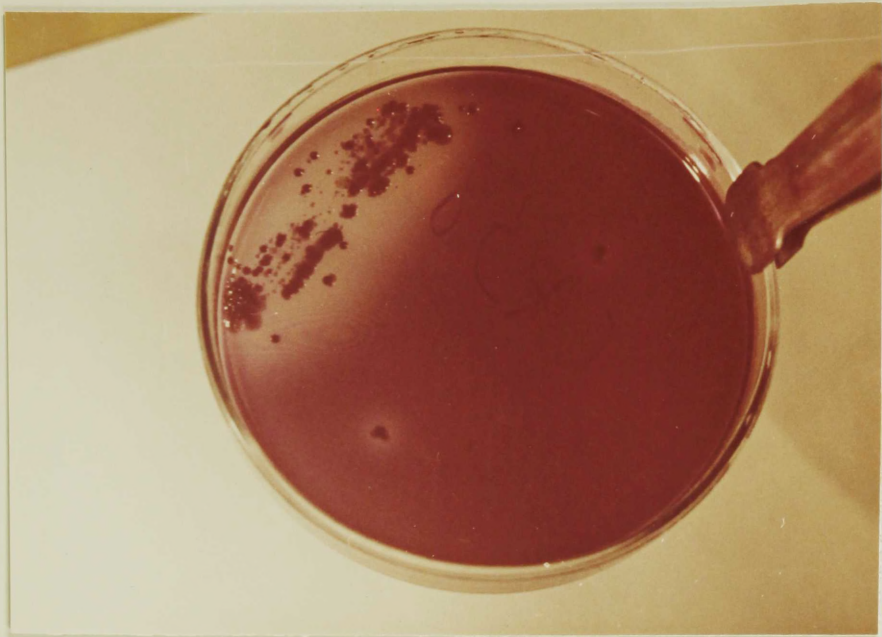
c) 24 t. akriflaviinisisaldusega puljongis inkubeeritud kultuurist kanti 1 normaalaasatäis suspensiooni LPA-le ja hõõruti spaatliga laiali. Sama spaatliga hõõruti veel 2 tassil söötme pinda. Nii sai jälle iga tüvi kantud 3-le tassile, seejuures esimesele kõige rohkem, viimasele kõige vähem. Pärast ööpäevast inkubeerimist kontrolliti kolooniate arvu kõigil tassidel ja eraldati need tassid, millest oli võimalik teha jäljendkülvil (st. kus oli loetav arv, s.o. keskm. 40-300, pesi). Kõige paremaid tulemusi andis viimane meetod, kus nõutav arv kolooniaid oli tavaliselt 2. või 3. tassil. Lahjenduste puhul (a ja b) oli söötmetele sattunud mikroobide arv enamasti liiga väike.

Jäljendkülvilid tehti streptomütsiiniga (25 µg/ml), tetratsükliiniga (25 µg/ml) ja klooramfenikooliga (25 µg/ml) söötmetega tassidele. Jäljendkülvide (Lederberg ja Lederberg, 1952) tegemiseks kasutati auto mootori kolbi (Heinaru, 1970), mis kaeti pansametiga. Nii alg- kui ka jäljendplaatidele oli märgitud jäljendkülvil tegemise suund. Järgmisel päeval võrreldi algplaatide ja jäljendplaatide kolooniate arvu. Kõige parem oli seda teha tasside üksteise peale aetamisel nii, et kolooniad mõlemal tassil oleksid kohakuti. Ravimiga söötmetel puuduvad kolooniad märgiti algplaadil ära ning külvati kontrolliks uuesti ravimitega söötmetele. Kui R-faktori või osade r-determinantide elimineerumine oli kontrollitud väljakülvidel vastavatele ravimitega tassidele, külvati kõik R⁻ segre-

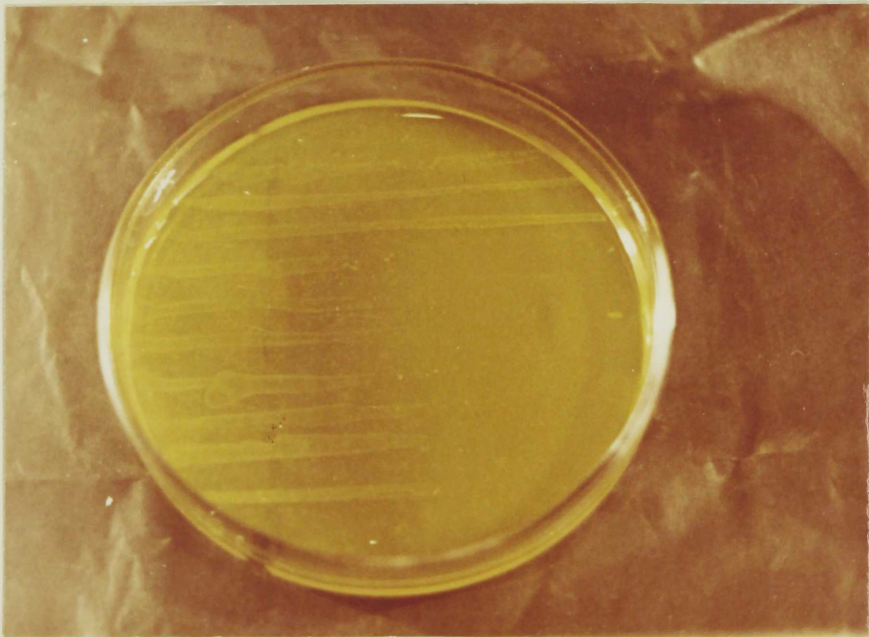
Joon.1. Kolitsinogeensuse määramine Gratia kahekihilise agari meetodil.



Joon.2. Kolitsiintundlikkuse määramine kolitsinogeense standardtüve suhtes.



Joon.3. Ristamine Endo söötmel. Näha lac^- rekombinantkolooniad (valged) ja lac^+ doonorkolooniad (punased).



Joon.4. Akriflaviiniresistentsuse määramine akriflaviini kontsentratsiooni gradientmeetodil.

gandid säilitamiseks 0,5 % LPA-sse. Et jälgida, kas tüvede pikemaajaline mõjutamine akriflaviiniga muudab eliminatsiooni sagedust, tehti kõigile uuritavatele tüvedele 10-kordne ülekanne uutesse akriflaviiniga (20 µg/ml) puljongitesse, st. ööpäeva vanusest kultuurist kanti 1 aasatäis üle vürtsesse akriflaviinisisaldusega LPP-sse. Pärast 10. ülekannet (passaazi) kontrolliti uuesti eliminatsiooni jäljendkülvimeetodiga (analoogselt meetodiga c). R-faktori eliminatsiooni kontrolliti ning R⁻ segregandid säilitati 0,5 % LPA-s.

9. Ohutusnõuded

Kuna mikroobidega töötamisel esineb nakatumisoht, tuli pidevalt jälgida ohutustehnika nõuete täitmist.

Laboratooriumis viibiti ainult valges kitlis. Laboratooriumi ei toodud kaasa toiduaineid ega jooke. Külviaasad ja nõelad kuumutati, kasutatud spaatleid hoiti 70° etanoolis. Petri tassidesse ja katseklaasidesse külvatud kultuurid hävitati autoklaavimisel 1 at juures 1 tund. Töö lõpul pesti käed seebiga ja desinfitseeriti vastava lahusega. Boksi steriilimisel bakteriotsiidsete lampidega ei viibitud samal ruumis (Санитарные нормы..., 1972). Hapete ja alustega töötamisel hoiduti nende sattumisest riietele ja nahale (Тривуна по мекхике..., 1965). Autoklaaviga töötamisel jälgiti kõikide nõuete täitmist (Тривуна..., 1971). Eelnevalt oli sooritatud vastav eksam. Kõik autoklaavinised märgiti üles selleks ettenähtud vihikusse.

Kõik elektriseadmed olid vastavate eeskirjade kohaselt maandatud (Tarbijate..., 1972).

II. KATSETULEMUSED JA ARUTELU

1. Uuritavate tüvede üldiseloomustus

Käesolevas töös olid põhimaterjaliks 464 E.coli K12 R⁺ rekombinanttüve, mis saadi Tartu Rajooni Sanitaar- ja Epidemiologiajaamast K. Leisi käest. Edaspidisteks uuringuteks tehti kindlaks nende tüvede põhilised omadused: määrati R-faktori tüüp, kolitsinogeensus, kolitsiintundlikkus, S-R dissotsiatsioonivorm, akriflaviiniresistentsuse aste. Need katsed tehti koos üliõpilase S. Parisega (v.a. akriflaviiniresistentsuse astme määramine). Eelnevalt oli kaugõppeüliõpilase K. Leisi poolt määratud vastavate tüvede R-faktorite doonorite kolitsinogeensus. Pärast nende tüvede esialgset uurimist valiti sealt välja huvitavamad, mida kasutati edaspidistes ristamising eliminatsioonikatsetes.

464 R⁺ rekombinanti olid saadud sel teel, et retsiipiendile E.coli K12-le oli üle kantud R-faktoreid 224-st erinevast Shigella sonnei metsiktüvest. Seega oli meil tegemist 224 eri päritoluga R-faktoriga. Sedastati 6 erinevat R-faktori tüüpi, neist kõige sagedamini esines SmCmTc R-faktor (tabel 1).

Kirjandusest on teada, et teatud R-faktorite puhul võib esineda nii madalaastmelist streptomütsiiniresistentsust (kuni 100 µg/ml) kui ka kõrgeastmelist streptomütsiiniresistentsust (1000-5000 µg/ml) (Pearce ja Meynell, 1968).

Meie katsetes, lähtudes kirjanduse andmetest (Heinaru, 1970) määrati Sm-resistentsus 15 (madal - sm) ja 200 µg/ml (kõrge-Sm) streptomütsiini puhul. Kõik streptomütsiiniresistentsed tüved osutusid kõrge resistentsuse astmega tüvedeks, s.t. kasvasid mõlema kontsentratsiooni puhul.

Ühe ja sama doonori erinevate rekombinantide hulgas (neid

**E.coli K-12 R⁺ TÜVEDE JA NENDE
DOONORITE JAOTUS R-FAKTORI TÜÜBI JÄRGI** **Tabel 1.**

Doonorite üldarv	Col ⁺ doono- rite arv	Col ⁺ doono- rite arv	Rekombinan- tide üldarv	Col ⁺ rekombi- nantide arv	R-faktori tüüp*
173	52	121	373	8	Sm Cm Tc
29	13	16	56	5	Cm
11	11	0	20	0	Sm Cm Tc Pn
5	1	4	6	1	Cm Pn
5	3	2	5	2	Cm Sm
1	0	1	1	0	Cm Tc
224	80	144	464	16	Kokku

ÜHE JA SAMA DOONORI Tabel 2 ERINEVAD REKOMBINANDID

E.coli K 12 R tüve nr.	Rekombinant	r-determinandid
<u>III</u> 15	α b	Cm Sm Cm
<u>IV</u> 12	α b	Sm Cm Sm Cm Tc
<u>V</u> 208	α b	Sm Cm Tc Sm Cm
<u>VI</u> 134	α b	Sm Cm Sm Cm Tc
<u>VIII</u> 321	α b	Cm Pn Cm
<u>X</u> 341	α b	Cm Sm Cm Tc
<u>X</u> 318	α b	Sm Cm Tc Cm

oli tavaliselt 2) esines erinevusi r-determinantide osas seitsmel juhul (tabel 2). Seda nähtust võib seletada kas doonori hetero-R-olekuga (ühes doonoris on 2 erinevat R-faktorit) või osa r-determinantide spontaanse eliminatsiooniga enne (doonorkultuuri heterogeensus) või pärast konjugatsioonirekombinanttüves.

Et kindlaks teha, kas ja kui suures ulatuses on erinevusi uuritavate mikroobitüvede akriflaviiniresistentsuse osas, viidi läbi ligikaudne määramine neljal erineva akriflaviini kontsentratsiooniga söötmel (LPA-1).

Akriflaviiniresistentsuse määramise tulemused näitasid, et esines suuri kõikumisi rekombinantide akriflaviinitundlikkuse osas - oli tüvesid, mis ei kasvanud ühelgi tassil või kasvasid ainult 100 µg/ml akriflaviiniga tassil ning ka neid, mis kasvasid nii 100, 200, 300 kui ka 400 µg/ml akriflaviinisöötme puhul. Selgus (joonis 5), et suhteliselt tundlike tüvesid oli 464-st 79. Nende hulka kuulus ka retsipient E.coli K12. Suhteliselt resistentseid tüvesid oli 103, ülejäänud 282 olid keskmise resistentsuse astmega (tundlikeks ja resistentseteks on loetud need rekombinanttüved, mis igas katseseerias erinesid keskmisest vähemalt ühe astme võrra, s.t. kui keskmine resistentsus oli 300 µg/ml juures, siis tundlikud olid need, mis kasvasid 100-200 µg/ml juures, resistentsed aga 400 µg/ml juures). Seega on enamus rekombinanttüvesid retsiipiendiga võrreldes muutunud natuke resistentsemaks (keskmiselt 62,8 %) või märgatavalt resistentsemaks (22,2 %). Akriflaviiniresistentsuse alusel võrreldi vastavaid rekombinanttüvesid ka teiste määratud tunnuste osas (tabel 3).

Tabelis 3 esitatud andmetest nähtub, et kolitsinogeensete doonorite rekombinantidel on tendents akriflaviiniresistentsu-

UURITAVATE REKOMBINANTTÜVEDE PÕHILISTE OMA- DUSTE SEOS NENDE AKRIFLAVIINIRESISTENTSUSE ASTMEGA

Tabel 3

Uuritavad tunnused	Akriflaviiniresistentse aste							
	Kõrgelt resistentseid	%	Tundlikke	%	Kesk-misi	%	Kokku	%
Tüvede üldhulk	103	22,2	79	17,0	282	60,8	464	100
Rekombinanttüved, mille doonor oli col ⁺	45	43	12	15,4	104	36,9	161	34,7
col ⁺ rekombinanttüvede hulk	3	2,9	4	5,1	9	3,2	16	3,4
Standardkolitsiinidele resistentsete rekombinanttüvede hulk	24	23	24	31	49	17,4	97	20,9
S- ja SR-dissotsiatsioonivormis olevad tüved	—	—	—	—	—	—	—	—
R-dissotsiatsioonivormis olevad tüved	103	100	79	100	292	100	464	100
Kontrolltüvi E.coli K-12 RF ⁻	—	—	+	—	—	—	—	—

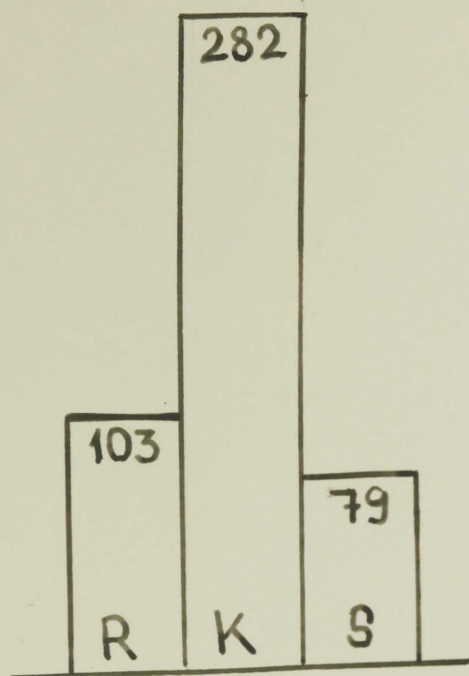
sele. Nii on resistentsetest tüvedest 43 %-l doonorid kolitsi-
nogeensed, keskmistel 36,9 %-l, samal ajal kui tundlikest tü-
vedest vaid 15,4 %-l olid doonorid col⁺ omadusega. Võib arvata,
et siin on tegemist col- ja R-faktorite vastastikuse toimega.
Rekombinantide hulgas oli col⁺ tüvesid väga vähe, kõigest 3,4%.
Nähtavasti oli col-faktori ülekande sagedus madal seepärast, et
retsiipientina kasutati E.coli K12 tüve, mis oli doonori kolit-
siinide suhtes kõrgelt tundlik.

Enamus uuritavatest tüvedest olid kolitsiintundlikud. Fre-
dericqi standardkolitsiinidele resistentseid tüvesid oli 97
(20,9 %), kusjuures resistentsus esines 1-9 standardkolitsiini
suhtes. Retsipienttüvi E.coli K12 on kolitsiintundlik kõigile
kolitsiinidele, v.a. CA57 ja P15 kolitsiinidele. Kõige sageda-
mini esines tundlikkust Fredericqi standardtüvede E.coli CA31,
CA42 ja Sh. dispar P14 kolitsiinide, s.t. E-grupi kolitsiinide
suhtes.

Tüvede S-R dissotsiatsioonivormi määramisel selgus, et kõik
rekombinandid olid R-vormis. Retsipient E.coli K12 on samuti
R-vormis. On võimalik, et pärast R-faktori omandamist tüved
muutuvad S-vormist R-vormi (Jarolmen, Kemp, 1969). Kuna meie
kasutatud retsipient E.coli K12 oli R-vormis, siis seda nähtust
me kontrollida ei saanud.

Katsetulemuste ülevaatlikumaks esitamiseks on tulemused ku-
jutatud diagrammidena (joonised 5,6,7,8). Diagrammid näitavad
resistentsete, keskmiste ja tundlike rekombinantide arvulist
jaotumist mitmesuguste tunnuste põhjal.

Eespool käsitletud tüvedest valiti edaspidiseks, täpsemaks
uurimiseks välja 39 huvitavat, põhiliselt kõige akriflaviini-
tundlikumad ja -resistentsemad R⁺ rekombinandid, et jälgida
nende R-faktorite mõju teiste retsipientbakterite akriflaviin-

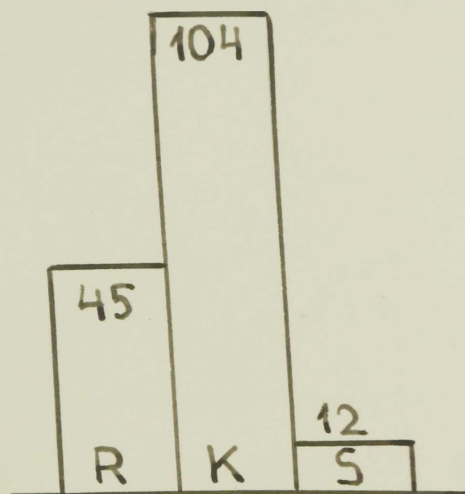


Joon.5. R^+ rekombinanttüvede jaotus akriflaviiniresistentsuse astme järgi.

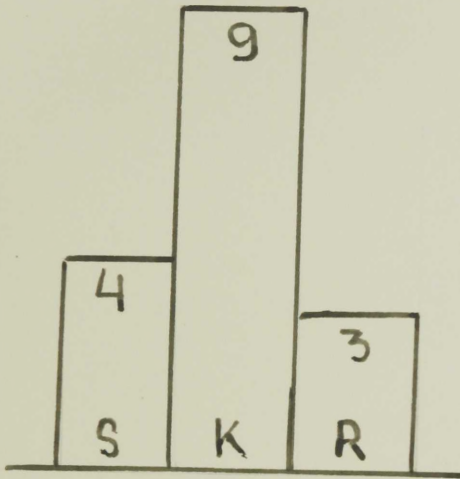
R - kõrgelt resistentsed

K - keskmised

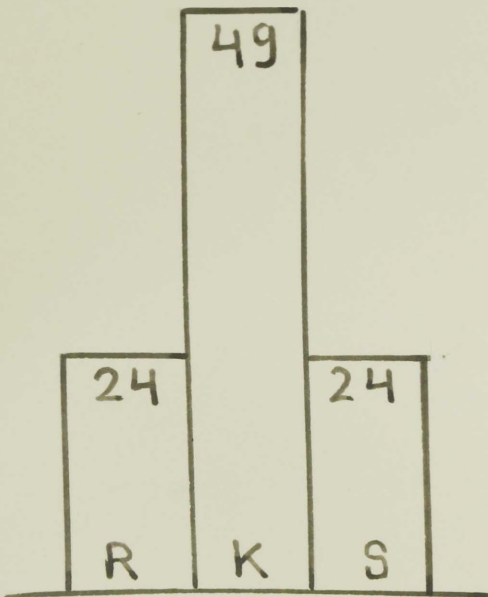
S - tundlikud



JOON.6. Kolitsinogeensete doonortüvedega R^+ rekombinanttüvede jaotus akriflaviiniresistentsuse astme järgi.



Joon.7. Kolitsinogeensete R^+ rekombinanttüvede jaotus akriklaviiniresistentsuse astme järgi.



Joon.8. Kolitsiinresistentsete R^+ rekombinanttüvede jaotus akriklaviiniresistentsuse astme järgi.

resistentsusele pärast ülekannet konjugatsiooniprotsessis ning akriflaviiniresistentsuse muutumist pärast R-faktori elimineerumist. Lisaks nendele uuriti edaspidistes katsetes veel 16 Fredericqi standardkolitsinogeenset tüve, 18 rahvusvaheliselt markeeritud tüve, 37 kohalikku tüve (saadud A. Heinarult) ning töö käigus ristamiskatsetest (konjugatsioonil) saadud rekombinante. Neist toome ära vaid enamuuritud vastavate tabelite juures eksperimentaalses osas.

12. Katsed akriflaviiniga ja R-faktorite eliminatsioon

Akriflaviiniresistentsuse täpsemaks määramiseks akriflaviini kontsentratsiooni gradiendiga tassidel valiti välja 44 huvitavamad tüve (resistentseid ja tundlikke), lisaks retsipient E.coli K12. Selle meetodiga saab kindlaks teha ka üsna väikesed erinevused mikroobitüvede akriflaviiniresistentsuse osas. Erinevate kontsentratsioonide meetodi abil võib tüved jaotada vaid gruppidesse akriflaviiniresistentsuse järgi neid täpsemalt järjestamata. Määramise tulemused näitasid, et tüved kasvasid tassidel erinevale kaugusele kuujuures tüvede reastamisel nende kasvu ulatuse järgi saadi pidev rida kõige tundlikumatest kõige resistentsemateni. 44-st rekombinandist üks ei kasvanud üldse (ka retsipient E.coli K12 ei kasvanud), 9-1 oli kasv 2 cm ulatuses, ülejäänutel rohkem. 3 rekombinanti kasvas kogu tassi ulatuses (9cm). Kuna oli tegemist 22 erineva R-faktoriga, s.t. igast ristlusest oli võetud 2 identsete R-faktoritega rekombinanti, siis võiks arvata, et nad on ka ühesuguse akriflaviiniresistentsusega. Selgus aga, et 22-st rekombinantide paarist 9-s oli üks rekombinant palju resistentsem kui teine. Kui võrreldi nende R-faktorite tüüpe ja kolitsinogeensust, siis selgus,

ÜHE JA SAMA DOONORI REKOMBINANDID, MILLE Tabel 4
AKRIFLAVIINIRESISTENTSUS ON ERINEV

Rekombi- nandid	R-faktori tüüp	Kolitsino- geensus	Col.tundlikkus ("-"-resistentne)	Kasvu ulatus akr. gradiendiga söötmet (cm)
E.coli R I α 32 E.coli R I b 32	Sm Cm Tc	col ⁻	+ +	2,5 - 0,5 2,5 + 1
E.coli R IV α 41 E.coli R IV b 41	Sm Cm Tc	col ⁻	+ +	2,5 + 0,5 (mut.) 2,5 + 2,5
E.coli R VII α 132 E.coli R VII b 132	Sm Cm Tc	col ⁺	+ -	2,5 + 0,7 2,5 + 3,5
E.coli R VII α 124 E.coli R VII b 124	Cm	col ⁺	+ +	2,5 - 1,5 2,5 + 4 (mut.)
E.coli R VIII α 362 E.coli R VIII b 362	Sm Cm Tc	col ⁻	+ -	2,5 + 2,7 -
E.coli R XI α 389 E.coli R XI b 389	Sm Cm Tc	col ⁻	+ +	2,5 2,5 + 6,5 (mut.)
E.coli R XII α 356 E.coli R XII b 356	Sm Cm Tc	col ⁻	+ +	2,5 + 3,2 (mut.) 2,5 - 0,5
E.coli R XIII α 326 E.coli R XIII b 326	Sm Cm Tc	col ⁻	+ +	2,5 + 2 2,5 - 2
E.coli R XIII α 395 E.coli R XIII b 395	Sm Cm Tc	col ⁻	+ -	2,5 + 0,5 2,5 - 0,5

* mut. - pidurdatud kasv (mutandid)

et neis erinevusi polnud. Kolmel paaril leiti erinevused ko-
litsiintundlikkuse osas: kahel rekombinantide paaril oli ko-
litsiinile resistentne akriflaviintundlikum rekombinant, ühel
rekombinantide paaril akriflaviiniresistentsem rekombinant
(tabel 4).

Et jälgida R-faktori ülekannet konjugatsiooniprotsessis
ja selle mõju vastavate mikroobide akriflaviiniresistentsuse-
le, viidi läbi rida ristamisi. Retsipientideks valiti kaks
auksotroofset (E.coli K12 P678 ja E.coli W3876) ning kaks pro-
totroofset (E.coli O111 Sv ja E.coli HfrH) standardtüve. Lisaks
nendele püüti R-faktoreid üle kanda veel Fredericqi standard-
tüvedele. Doonoritena kasutati 31 kohalikku R⁺ tüve (31 eri-
nevat R-faktorit), mille akriflaviiniresistentsuse aste oli
eelnevalt määratud. Kasutatud retsipientidest oli kõige tund-
likum E.coli K12 tüvi O111Sv, ta ei kasvanud akriflaviinisisal-
dusega söötmel üldse. Suhteliselt kõige resistentsem oli pro-
totroofne tüvi E.coli K12 HfrH. Tüved E.coli K12 P678 ja E.coli
K12 W3876 olid vahepealse akriflaviiniresistentsuse astmega.
R-faktori doonoriteks olid valitud võimalikult erineva akri-
flaviiniresistentsuse astmega mikroobitüved alates hästi tund-
likest (ei kasva üldse akriflaviinisisaldusega LPA-1) kuni
kõige resistentsemateni (kasv kogu tassi ulatuses). Doonori-
tena kasutati ka tabelis 4 toodud erineva akriflaviiniresistent-
susega rekombinantide paare. (RI32a ja b, RIV41a ja b, RVIII362a
ja b, RXII356a ja b) Kahjuks ei õnnestunud kõigi kasutatud
doonoritega saada rekombinante kuna R-faktori ülekanne toimus
konjugatsiooniprotsessis väga madala sagedusega.

Akriflaviiniresistentsus määrati kokku 111-1 rekombinan-
dil (tabel 5), kusjuures igast ristlusest oli võetud 1-6 re-
kombinanti. Ristamisi viidi läbi 37, nendest 7 kahes korduses.
Kokku saadi rekombinante 14 erineva R-faktoriga, mis olid üle

kandunud 17-sse erinevasse retsipienti. Võrreldes R^+ rekombinantide akriflaviiniresistentsust vastavate R^- algtüvedega selgus, et 22-l juhul 37-st oli resistentsus tõusnud pärast R-faktori omandamist, 10-l juhul langenud ning 4-l juhul jäänud muutumatuks. P678R222 doonori puhul kahest vaadeldud rekombinandist üks oli muutunud retsipiendist resistentsemaks, teine tundlikumaks. Nagu tabelist 5 näha võib, on ühe ja sama tüve rekombinantide akriflaviiniresistentsus küllaltki erinev, kõik rekombinandid on ühtlase resistentsusega vaid 8-l juhul. Tüvedel, mille ristamine ning rekombinantide akriflaviiniresistentsuse määramine viidi läbi kahel korral, ei ühtinud mõlema katse tulemused teineteisega täiesti, kuigi tendents jäi samaks (v.a. tüved CA23R222 ja W3876R(Xa382)). Nii näiteks Fredericqi standardtüvi E.coli CA18 muutus pärast R222 faktori omandamist esimeses katses vaid pisut resistentsemaks akriflaviinile, teises katses aga oli resistentsuse muutus väga tugev. Sama võib täheldada ka E.coli CA42 ja E.coli CA38 juures. Seevastu rekombinandid CA23R222 ja W3876R(Xa382) andsid mõlemas katses erinevaid tulemusi.

Kui vaadelda ühe ja sama R-faktori mõju erinevate tüvede akriflaviiniresistentsusele, siis on see üsna erinev (tabel 5). Näiteks R222 faktor kandus ristamisel üle 13-le Fredericqi standardtüvele, neist 5-le kahel korral. Tulemused näitasid, et 10-l korral oli R^+ rekombinantide akriflaviiniresistentsus võrrelduna R^- algtüvega tõusnud, 7-l korral langenud, P15R222 ühel rekombinantkoloonial tõusnud, teisel langenud.

Lisaks oma ristamiskatsetest saadud rekombinantidele määrati akriflaviiniresistentsus veel 34-l rekombinandil (tabel 5 nr.-d 165-198) ja nende R^- retsipienttüvedel (E.coli tüved P678, W1845 F^- , W1655 F^+). Ka siin oli ühe ja sama R-faktori

DOONORITE, RETSIPIENTIDE JA REKOMBI-
NANTIDE AKRIFLAVIINIRESISTENTSUSTE VÕRDLUS

Tabel 5

Jrk. nr.	Rekombinanttüve tähistus	Rekombinandi nr.	Akriflaviiniresistentsus (400 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	Jrk. nr.	Rekombinanttüve tähistus	Rekombinandi nr.	Akriflaviiniresistentsus (400 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)
1.	I E.coli CA 23 R222	1	2,5 + 1,2 (mut.)	52.	II E.coli CA38 R222	1	mõned kol.
2.	E.coli CA 23 R222	2	2,5 + 1,2 (mut.)	53.	"	2	"
3.	E.coli CA 23		2,5 + 1	54.	E.coli CA38		2,5 + 0,5
4.	II E.coli CA23 R222	1	2,5 + 2	55.	E.coli CA46 R222	1	2,5 - 0,5
5.	"	2	2,5 + 2	56.	"	2	2,5 - 1
6.	"	3	2,5 + 2,5	57.	E.coli CA46		2,5 - 2
7.	"	4	2,5 + 2,5	58.	I E.coli K235 R222	1	2,5 + 3
8.	"	5	2,5 + 3	59.	"	2	2,5 + 5 (mut.)
9.	E.coli CA23		2,5 + 3	60.	E.coli K235		-
10.	I E.coli CA18 R222	2	üksikud kol.	61.	II E.coli K235 R222	1	2,5 + 6,5
11.	"	3	"	62.	"	2	-
12.	E.coli CA18		sens.	63.	"	3	2,5 + 4
13.	II E.coli CA18 R222	1	2,5 + 2,5	64.	"	4	2,5 + 4
14.	"	2	2,5 + 2,5	65.	"	5	-
15.	E.coli CA18		sens.	66.	E.coli K235		-
16.	I E.coli CA42 R222	1	2,5 (mut.) + 0,5 (mut.)	67.	E.coli CA62 R222	1	2,5 - 2
17.	"	2	"	68.	"	2	2,5 - 2
18.	E.coli CA42		sens.	69.	"	3	2,5 - 1,5
19.	II E.coli CA42 R222	1	2,5 + 6,5	70.	"	4	2,5 - 1,5
20.	"	2	"	71.	"	5	2,5 - 1
21.	"	3	"	72.	E.coli CA62		2,5 - 0,5
22.	"	4	"	73.	E.coli CSH2 R222		2,5 + 3 (mut.)
23.	"	5	"	74.	P670R (III α 356)	1	2,5 + 2,8
24.	E.coli CA42		sens.	75.	"	2	2,5 + 3,2
25.	E.coli CA58 R222	9	2,5 + 1,1	76.	"	3	2,5 + 3,2
26.	"	10	mõned kol.	77.	"	4	2,5 + 3
27.	E.coli CA58		2,5 + 1,8	78.	"	5	2,5 + 2,3
28.	Sh. sonnei P9 R222	4	2,5 + 0,3 (mut.)	79.	P678		2,5 + 0,1
29.	"	5	"	80.	W3876 R (III α 356)	1	2,5 + 2
30.	Sh. sonnei P9		2,5 + 0,1	81.	"	2	2,5 + 2,1
31.	Sh. dispar P15 R222	1	2,5 + 1 (mut.)	82.	"	3	2,5 + 5,5
32.	"	2	2,5 - 1 (mut.)	83.	W3876		2,5 - 0,2
33.	Sh. dispar P15		2,5	84.	III α 356		2,5 + 1
34.	Sh. dispar P14 R222	1	2,5 + 2,5	85.	I W3876 R (V α 67)	1	2,5 + 1,5 (mut.)
35.	"	2	"	86.	"	2	2,5 + 1,5
36.	"	3	2,5 + 1,5	87.	"	3	2,5 + 2
37.	"	4	2,5 + 1	88.	"	4	2,5 + 1
38.	"	5	"	89.	"	5	2,5 + 2,2
39.	Sh. dispar P14		"	90.	II W3876 R (V α 67)	1	2,5 + 3
40.	E.coli CA7 R222	1	2,5 - 0,7	91.	"	2	2,5 + 3
41.	"	2	2,5 - 1	92.	"	3	2,5 + 3
42.	E.coli CA7		2,5 - 0,5	93.	"	4	2,5 + 3
43.	E. freundii CA31 R222	1	2,5 - 1	94.	W3876		2,5 - 0,2
44.	"	2	2,5 + 1,5	95.	V α 67		sens.
45.	E. freundii CA31		sens.	96.	W3876 R (III α 6326)	1	2,5 + 2
46.	I E.coli CA38 R222	1	2,5 + 4	97.	"	2	2,5 + 2,7
47.	"	2	2,5 + 3	98.	"	3	2,5 + 1,7
48.	"	3	2,5 + 4	99.	"	4	2,5 + 2,5
49.	"	4	2,5 + 4	100.	"	5	2,5 + 3
50.	"	5	2,5 + 6,5 (mut.)	101.	W3876		2,5 - 0,2
51.	E.coli CA38		2,5 + 6,5	102.	III α 6326		2,5 + 2

Tabel 5
järg

Jrk. nr.	Rekombinanttüve tähistus	Rekombinantbinandi nr.	Akriflaviiniresistentsus (400 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)	Jrk. nr.	Rekombinanttüve tähistus	Rekombinantbinandi nr.	Akriflaviiniresistentsus (400 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$)
103.	W3876 R(<u>xii</u> b326)	1	2,5 + 2	153.	W3876 R(<u>viii</u> b156)	-	2,5 + 0,5
104.	— " —	2	2,5 + 2,7	154.	W3876 R(<u>x</u> a382)	-	2,5 + 6,5 (mut.)
105.	— " —	3	2,5 + 1,7	155.	W3876 R(<u>xii</u> b389)	-	2,5 + 4,5
106.	— " —	4	2,5 + 2,5	156.	W3876 R(<u>xvi</u> b546)	-	2,5 + 6,5 (mut.)
107.	— " —	5	2,5 + 3	157.	P678 R(<u>xvi</u> b546)	-	2,5 + 6,5
108.	W3876		2,5 - 0,2	158.	P678 R(<u>xii</u> b389)	-	2,5 + 6,5
109.	R <u>xii</u> b 326		sens.	159.	P678	-	2,5 + 6,5
110.	I W3876 R(<u>x</u> a382)	1	2,5 + 2	160.	W3876	-	2,5 + 6,5
111.	— " —	2	2,5 + 3	161.	<u>viii</u> b 156	-	2,5 + 2,5
112.	— " —	3	2,5 + 2,5	162.	<u>x</u> a 382	-	2,5 + 2,5
113.	— " —	4	2,5 + 2,5	163.	<u>xii</u> b 389	-	2,5 + 4,5
114.	W3876		2,5 - 0,2	164.	<u>xvi</u> b 546	-	2,5 + 6,5
115.	R <u>x</u> a 382		2,5	165.	J <u>vii</u> 1 R ⁻ col ⁺ aer ^c col ²	-	2,5 + 0,5 (mut.)
116.	W3876 R(<u>xiii</u> b326)	1	2,5 + 6,5 (mõn. kol)	166.	J <u>vii</u> 1 AF ^s (Sm, Su) col ⁻	-	2,5 + 0,9
117.	— " —	2	2,5 + 1 (mut.)	167.	J <u>vii</u> 1 col ⁻ R ⁻	-	2,5 + 0,9
118.	— " —	3	2,5 + 1,5 (mut.)	168.	J <u>vii</u> 1 R-vorm	-	2,5 + 0,9
119.	— " —	4	2,5 + 2 (mut.)	169.	J <u>vii</u> 1 S(Su Sm) AF col	-	2,5 + 0,9
120.	— " —	5	2,5 + 2 (mut.)	170.	J <u>vii</u> 1 Sp-S 12b col ⁻	-	2,5 + 0,9
121.	— " —	6	2,5 + 1,5 (mut.)	171.	J <u>vii</u> 1 Sp-S col ⁻ -17	-	2,5 + 0,9
122.	W3876		2,5 + 2,5 ?	172.	J <u>vii</u> 1 R ⁺ col ⁺	-	2,5 + 0,9
123.	R <u>xiii</u> b 328		sens.	173.	J <u>vii</u> 1 AF ^s col ⁺	-	2,5 + 0,8
124.	O111Sv R(WR405)	1	2,5	174.	P678 R420	-	2,5 + 0,5 (mut.)
125.	— " —	2	2,5 (mut.)	175.	P678 R405 col ⁺	-	sens.
126.	— " —	3	2,5 (mut.)	176.	W1845 F ⁻ R405	-	2,5 + 0,4
127.	— " —	4	2,5	177.	P678 R406 R	-	2,5 + 0,6
128.	— " —	5	2,5	178.	P678 R406 col ⁺	-	sens.
129.	O111Sv		sens.	179.	W1845 R406	-	2,5 + 0,6
130.	R(WR405)		2,5 + 2,5 0,4	180.	P678 R427 col ⁺	-	2,5 + 0,3 (mut.)
131.	O111Sv R(PR406)	1	2,5 + 0,5	181.	W1655 F ⁺ R427 col ⁺	-	2,5 + 0,5
132.	— " —	2	2,5 + 0,5	182.	W1655 R427 col ⁻	-	2,5 + 0,7
133.	— " —	3	2,5 + 0,5	183.	W1845 R427 col ⁺	-	2,5 + 0,6
134.	— " —	4	2,5	184.	P678 R412 col ⁺	-	2,5 (mut.)
135.	R (PR406)		2,5 + 4 0,6	185.	P678 R470 col ⁺	-	2,5 + 0,3 (mut.)
136.	O111Sv R428	1	2,5	186.	P678 R478	-	2,5 + 0,3
137.	— " —	2	2,5 + 0,5	187.	W1655 F ⁺ R462	-	2,5 - 1
138.	— " —	3	2,5 + 0,5	188.	W1655 F ⁺ R428	-	sens. 2,5 - 0,5
139.	O111Sv		sens.	189.	W1845 F ⁻ R445	-	2,5 + 1
140.	R428		2,5 - 0,5 sens	190.	W1845 F ⁻ R438	-	sens.
141.	Hfr HR458	1	2,5 + 3	191.	W1845 F ⁻ R421	-	2,5 + 0,3
142.	— " —	2	2,5 + 2,5	192.	W1845 R458	-	2,5 + 1
143.	— " —	3	2,5 + 2,5	193.	W1845 R467	-	2,5 + 0,5
144.	Hfr H		2,5 + 1,5	194.	W1845 R467 col ⁺	-	2,5 + 0,3
145.	W R458		2,5 + 2,5 +1	195.	W1845 F ⁻ R468	-	2,5 + 0,6
146.	O111Sv R458	1	2,5 - 0,5	196.	W1845 FR439	-	2,5 + 1,2
147.	— " —	2	- ?	197.	W1845 F ⁻ R456	-	mut. 2,5
148.	— " —	3	2,5 - 0,5	198.	W1845 F ⁻ R415	-	2,5 + 0,6
149.	— " —	4	2,5 - 0,5	199.	E. coli K12 P678	-	2,5 + 0,1
150.	— " —	5	2,5 - 0,5	200.	E. coli 142 W1655 F ⁺	-	2,5 + 0,6
151.	O111Sv		sens.	201.	E. coli K12 W1845 F ⁺	-	2,5 + 1,8
152.	W R458		2,5 + 2,5 +1				

* Rekombinanttüved nr.165-198 on saadud A.Heinarult

mõju erinevatele retsipientidele küllaltki erinev. Nii näiteks R405 ja R406 faktorid muutsid rekombinandid P678R405col⁺ ja P678R406col⁺ akriflaviinile tundlikeks, teiste rekombinantide akriflaviinitundlikkust mõjutasid nad vähem. R427 faktor pole rekombinantide akriflaviiniresistentsust oluliselt muutnud, v.a. rekombinant W2845R427col⁺, mis on retsiptendiga võrreldes muutunud tundlikumaks.

Huvitav on märkida, et mikroobitüve E.coli IVI1 mitmesugused rekombinandid on väga ühtlase akriflaviiniresistentsusega, kuigi osa neist on R⁻, osa R⁺ vormid ning ka kolitsini-geensus on erinev. Sellest järeldub, et vastav R- ja Col-faktor ei mõjuta tüve akriflaviiniresistentsust.

Katsest võib järeldada, et mikroobitüve akriflaviiniresistentsus ei sõltu mitte ainult R-faktori omadustest, vaid ka mikroobitüvest endast (seda näitab ka tabel 3, kus on toodud sama deonori rekombinandid, mille akriflaviiniresistentsus on erinev).

Eliminatsioonikatsete eesmärgiks oli: 1) jälgida mikroobitüvede akriflaviiniresistentsuse muutumist pärast R-faktori kaotamist, 2) kindlaks teha, kas R-faktori eliminatsioon akriflaviini mõjul toimub kergemini akriflaviiniresistentsetes või -tundlikes tüvedes ning 3) kuidas mõjub pikemaajalisem akriflaviiniga mõjutamine R-faktori eliminatsiooni sagedusele ja mikroobitüvede akriflaviiniresistentsusele.

R-faktori eliminatsioon akriflaviini mõjul toimus kõigis katsetes väga madala sagedusega (tabel 6). Tassidel, millel kasvas keskmiselt 30-300 mikroobikolooniat, oli R-faktor (või mõned r-determinandid) elimineerunud vaid 1-12 koloonial. Vaid ühel juhul - Watanabe tüvel CSH2R222 toimus SmCm determinantide eliminatsioon kõigil vaadeldud rakkudel. Seega jäi

UURITAVATE R⁺ TÜVEDE r-DETERMINAN- TIDE ELIMINATSIOON

Tabel 6

Jrk. nr.	Mikroobitüvi	Akr. res. aste*	R-faktori tüüp	Koli- sino- geensus	Pärast 24 t inkubeerimist akriflaviniisisaldusega LPPs			Pärast 10-kordset passaaži akriflaviniisisaldusega LPPs		
					Uuritud kooniate arv	Elimineeritud kooniate arv	Elim. R-faktori r-determi- nandid	Uuritud kooniate arv	Elimineeritud kooniate arv	Elim. R-faktori r-determi- nandid
1.	P678R(<u>XI</u> b389)	r✓	Sm Cm Tc	col ⁻	180	—	—	300	—	—
2.	W3876R(<u>XVI</u> b546)	r✓	—	col ⁺	30	—	—	311	—	—
3.	P678R(<u>XVI</u> b546)	r	—	col ⁺	84	—	—	297	—	—
4.	W3876R(<u>XI</u> b389)	r✓	—	col ⁻	94	—	—	37	3	Sm Cm
5.	W3876R(<u>VIII</u> b156)	s✓	—	col ⁺	180	3	Sm Cm Tc	98	12	5Cm; 5Sm Cm; 1Tc; 1Sm
6.	W3876R(<u>IX</u> a382)	r✓	—	col ⁻	128	—	—	219	—	—
7.	R <u>II</u> b389	r✓	—	col ⁻	44	—	—	250	10	Sm Cm
8.	R <u>XVI</u> b546	r✓	—	col ⁺	100	—	—	230	—	—
9.	R <u>VII</u> b156	s✓	—	col ⁺	240	—	—	241	—	—
10.	R <u>IX</u> a382	s✓	—	col ⁻	30	—	—	144	3	2Sm; 1Tc Cm
11.	R <u>XIII</u> a328	r	—	col ⁻	105	—	—	182	—	—
12.	R <u>VI</u> b124	r	Cm	col ⁺	21	1	Cm	228	10 ^{***}	Sm
13.	R <u>III</u> a48	s	Sm Cm Tc	col ⁻	182	—	—	45	—	—
14.	R <u>III</u> b48	s	—	col ⁻	215	—	—	290	—	—
15.	R <u>VI</u> a124	s	Cm	col ⁺	222	—	—	125	—	—
16.	R <u>XII</u> b326	s	Sm Cm Tc	col ⁻	48	—	—	342	—	—
17.	R <u>VIII</u> b362	s	—	col ⁻	116	—	—	50	—	—
18.	R <u>VIII</u> a362	s✓	—	col ⁻	190	—	—	226	—	—
19.	W3876R(<u>XIII</u> b328)(1)	s✓	Sm Cm Tc	col ⁻	224	—	—	170	—	—
20.	CA42 R222 (2)	r✓	Sm Cm Tc Su	col ⁺	300	—	—	112	6	Sm Cm
21.	CA42 R222 (1)	r✓	—	col ⁺	302	—	—	290	5	Sm Cm
22.	CA18 R222 (2)	s✓	—	col ⁺	204	—	—	233	—	—
23.	CA18 R222 (3)	s✓	—	col ⁺	98	3	Sm Cm	72	—	—
24.	R <u>V</u> a67	s	Sm Cm Tc	col ⁻	52	3	2CmTc; 1Sm Cm	93	—	—
25.	R <u>IX</u> a382	s✓	—	col ⁻	150	—	—	39	—	—
26.	R <u>XII</u> a356	r✓	—	col ⁻	149	—	—	105	1	Sm Cm
27.	R <u>XIII</u> b328	s✓	—	col ⁻	142	—	—	121	—	—
28.	CSH2 R222	r✓	Sm Cm Tc Su	col ⁻	300	300	Sm Cm	232	—	—
29.	P678R(<u>XII</u> a356)(3)	r✓	Sm Cm Tc	col ⁻	147	—	—	83	—	—
30.	W3876R(<u>III</u> a356)(3)	r✓	—	col ⁻	126	—	—	41	—	—
31.	W3876R(<u>XII</u> a356)(1)	r✓	—	col ⁻	230	—	—	70	—	—
32.	W3876R(<u>XIII</u> b356)(3)	r✓	—	col ⁻	145	—	—	212	—	—
33.	W3876R(<u>XIII</u> b356)(4)	r✓	—	col ⁻	56	—	—	59	—	—
34.	W3876R(<u>IX</u> a382)(1)	r✓	—	col ⁻	320	—	—	160	—	—
35.	W3876R(<u>IX</u> a382)(2)	r✓	—	col ⁻	228	12	Cm	131	—	—
36.	W3876R(<u>V</u> a67)(5)	r✓	—	col ⁻	89	—	—	83	—	—
37.	W3876R(<u>V</u> a67)(3)	r✓	—	col ⁻	41	5	4Cm; 1Sm Cm	67	1	Cm
38.	W3876R(<u>XIII</u> b328)(3)	r✓	—	col ⁻	61	—	—	88	—	—
39.*	W3876R(<u>XIII</u> b328)(2)	s✓	—	col ⁻	—	—	—	156	—	—
40.	CA18 R222 (2)	s✓	Sm Cm Tc Su	col ⁺	—	—	—	51	—	—
41.	R <u>IX</u> a382	s✓	Sm Cm Tc	col ⁻	—	—	—	97	—	—
42.	R <u>XIII</u> b328	s✓	—	col ⁻	—	—	—	230	10	Sm Tc Cm
43.	P678R(<u>III</u> a356)(3)	r✓	—	col ⁻	—	—	—	160	10	Sm Cm Tc
44.	W3876R(<u>III</u> a356)(3)	r✓	—	col ⁻	—	—	—	211	—	—
45.	W3876R(<u>XII</u> a356)(1)	r✓	—	col ⁻	—	—	—	106	—	—
46.	W3876R(<u>XIII</u> b356)(3)	r✓	—	col ⁻	—	—	—	232	—	—
47.	W3876R(<u>III</u> b356)(4)	r✓	—	col ⁻	—	—	—	250	—	—
48.	W3876R(<u>IX</u> a382)(1)	r✓	—	col ⁻	—	—	—	42	7	Tc

* r - resistentne, s - tundlik

** - sulgudes olev number näitab, millist rekombinantkooniat on uuritud

*** Sm-determinant on juurde tulnud

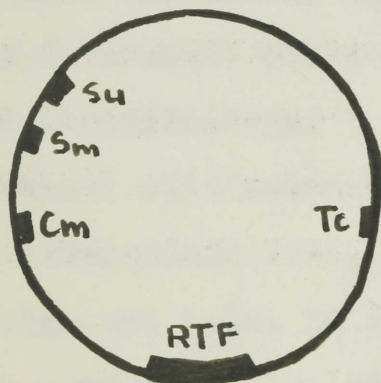
**** Tüved nr. 39-48 on uuritud 2 kuu möödudes pärast passaaži

eliminatsiooni sagedus üldiselt R-faktori spontaanse eliminatsiooni tasemele. Watanabe ja Fukasawa (1961) järgi võib R⁺ kultuuridest alati leida spontaanselt R-faktori kaotanud tundlike rakke. Nende andmetel võib selliseid rakke olla umbes 1%. Mitsuhashi (1969) arvates polegi kõik R-faktorid elimineeritavad akridiinidega. Elimineeruvad ainult teatud tüüpi R-faktorid. Meynelli jt. (1968) katsetes aga ei elimineerunud R-faktorid üldse akridiinide toimel. Võib arvata, et eliminatsioon akriflaviini toimel oleneb konkreetsest R-faktorist, esinedes igal juhul harva.

Meie katsetes saadi R-faktori eliminatsioon 13-l erineval R⁺ tüvel, neist kahel - W3876R(Xa382) ja CA42R222 - saadi eliminatsioon kahel erineval subkultuuril (rekombinantkolooniad). Eliminatsioonikatsed viidi läbi kolmel korral: pärast 24-tunnist mõjutamist akriflaviiniga (20 µg/ml akriflaviini LPP-s), pärast kümnet passaaži akriflaviinisisaldusega (20 µg/ml) LPP-s ning mõnedel (10) tüvedel ka kahe kuu möödudes, et vaadata, kas spontaanse eliminatsiooni sagedus mikroobikultuuride vananedes tõuseb (vastavate tüvede puljongkultuure säilitati toatemperatuuril). Kõikidel uuritavatel mikroobitüvedel oli R-faktori tüüp sarnane, sisaldades Sm, Cm ja Tc-resistentsusdeterminante, v.a. tüvi RV1a,b124, mis oli Cm-resistentne. R-faktori täielik elimineerumine toimus vaid neljal korral, kokku 24-l mikroobikolonial (tabel 6). Enamikul juhtudel elimineerusid üksikud r-determinandid või kaks r-determinanti kolmest. Kõige sagedamini saadi SmCm-determinantide paari eliminatsioon, harvemini elimineerus Tc-determinant. Huvitav on märkida, et rekombinandil E.coliRV1b124, mis varem omas Cm-resistentsust, ilmes pärast passaaže akriflaviinisisaldusega LPP-s Sm-resis-

tentsus (kontrolliti 10 kolooniat). Võimalik, et siin on tegemist kromosoomse resistentsuse avaldumisega. Selle kohta, et elimineerub vaid osa R-faktori r-determinantidest, on andmeid ka kirjanduses (Kètyi, Vertenyi, 1967). Mõned autorid (näit. Watanabe ja Fukasawa, 1961) on aga alati saanud kõigi r-determinantide eliminatsiooni.

On teada, et konjugatsioonil kanduvad plasmiidsed geenid sageli üle aheldunult (Clowes, 1972). ning ka eliminatsioon (nii spontaanne kui indutseeritud) toimub samadel geenidel korraga. Seda seostatakse vastavate geenide (markerite) asukohaga plasmiidis (näit. R-faktoris). Näiteks on kindlaks tehtud R222 faktori r-determinantide ja RTF asetus: Sm, Cm ja Su determinandid on lähestikku, Tc determinant aga eraldi asetunud (joonis 9). Meie katsetes elimineerusid kõige sagedamini Sm-Cm determinandid. Võiks arvata, et nad asetsevad R-faktoril lähestikku.



Joonis 9. R222 faktori geneetiline kaart

Ka Grubb'i ja O'Reilly (1971) järgi asuvad Sm ja Tc markerid üksteisest eraldi, sest nad ei kandunud transduktsioonil kunagi koos üle. Sellest järeldati, et nad võivad asuda isegi eri plasmiidides.

Vastupidiselt nendele tulemustele täheldasid Kasuga ja

Mitsuhashi (1969) *S.aureus*'e tüvedel Sm ja Tc markerite samaaegset ülekannet transduktsioonil 84-93 % juhtudest. Sellest nad järeldavad, et markerid asetsevad lähestikku.

Mis puutub eliminatsiooni sagedusse, siis ei muutunud see pärast passaaži akriflaviinisisaldusega söötmes oluliselt esimese katseseeriaga võrreldes. Kirjanduses esineb aga andmeid selle kohta, et akriflaviiniga mõjutades selekteeruvad R^+ kultuurist välja R^- segregandid (Yoshikawa, Sewag, 1967). Meie katsete tulemustega see seisukoht ei ühti, sest R^- segregantide hulk pärast passaaži akriflaviinisisaldusega söötmes ei suurenenud.

Kirjandusest on teada, et aja jooksul *E.coli* K12 tüvedel R-faktorid suures osas ($\approx 90\%$) elimineeruvad spontaanselt (Watanabe, 1971). Meie poolt vaadeldud kümnel R^+ rekombinanttüvel eliminatsiooni sagedus kahe kuu jooksul ei tõusnud. Võib-olla saab seda nähtust seletada R-faktori integreerumisega bakteri kromosoomil (Nakamura, 1968). Mitsuashi (1961) soovitab R-faktorite autonoomse oleku tõendina kasutada just nende elimineerumist akridiinidega.

Kui vaadelda R-faktori elimineerumist akriflaviinitundlikest ja -resistentsetest mikroobitüvedest, siis siin eliminatsiooni sageduses olulisi erinevusi pole. Ka on nende tüvede arv, millel eliminatsioon on toimunud liiga väike selleks, et saada sellest pilti antud küsimuses.

Kõigilt rekombinanttüvedel, millel uuriti R-faktori eliminatsiooni, määrati akriflaviiniresistentsus akriflaviini kontsentratsiooni gradientmeetodil nii enne kui ka pärast passaaži. Elimineerunud r-determinantidega mikroobikolooniatest valiti välja iga tüve puhul 1-9 kolooniat ning määrati ka neil akriflaviiniresistentsus (tabel 7).

AKRIFLAVIINIRESISTENTSUS TÜVEDEL, MILLEL ON TOIMUNUD n -DETERMINANTIDE ELIMINATSIOON

Tabel 7

Jrk. nr.	Rekombinanttüve tüpehistus; R-faktori tüüp ja kolitsinogeensus	Rekombinandi nr.	Akr.resistentsus enne 10 passaaži	Akr.resistentsus pärast 10 passaaži	Akr.resistentsus R ⁻ -mutantidel pärast eliminatsiooni		
1.	W3876 R(\bar{x} α 382) Sm Cm Tc col ⁻	2	2,5+3	2,5+6	2,5-1 2,5-0,7 2,5-0,5	2,5-0,5 2,5+1 2,5	2,5 2,5+0,5 2,5+0,5
2.	W3876 R(\bar{x} α 382) Sm Cm Tc col ⁻	1	2,5+2	2,5+6(mut)	2,5+6 2,5+6 2,5+6	2,5+6 2,5+6 2,5+6	2,5+4
3.	W3876 R(\bar{y} α 67) Sm Cm Tc col ⁻	3	I 2,5+2 II 2,5+2	2,5+2 2,5+3,5	2,5+1,5 mõni kol. 2,5	2,5 2,5	2,5+3,5
4.	CA18 R222 Sm Cm Tc Su col ⁺	3	üksikud kol.	2,5+1	2,5+1 " "		
5.	R α lgtüvi E.coli CA18		sens.				
6.	CSH2 R222 Sm Cm Tc Su col ⁻		2,5+3(mut)	2,5-0,5	2,5+0,5 2,5+1,2 2,5+1		
7.	W3876 R(\bar{x} β 389) Sm Cm Tc col ⁻		2,5+6(mut)	2,5+6	2,5+6 "		
8.	W3876 R(\bar{v} β 156) Sm Cm Tc col ⁺		2,5+0,6	2,5+0,9(mut)	2,5+2,5 2,5+4,3 2,5+3,5	2,5+3 2,5+3,2 2,5+6	2,5+4
9.	R α lgtüvi E.coli W3876		2,5-0,2				
10.	R \bar{x} β 389 Sm Cm Tc col ⁻		2,5+4,5	2,5+6		sens. sens.	
11.	R \bar{v} β 124 Cm col ⁺		2,5+2,9	2,5+4,5(mut)		sens.	
14.	CA42 R222 Sm Cm Tc Su col ⁺	1	2,5+0,5(mut)	2,5+4(mut)	2,5+2 " "	2,5+1 2,5+1,5 2,5+2,5	
13.	CA42 R222 Sm Cm Tc Su col ⁺	2	2,5+0,5(mut)	2,5+3	2,5+1,5 2,5+2 2,5	2,5+2,5 "	
12.	R \bar{x} α 382 Sm Cm Tc col ⁻		2,5+2,0	2,5+6(mut)	2,5+5 (mut) 2,5+3,5 (mut.)		
15.	R α lgtüvi E.coli CA42		sens.				
16.	R \bar{x} α 356 Sm Cm Tc col ⁻		2,5+0,9	2,5+6		2,5+1,5	
17.	R \bar{x} β 320 Sm Cm Tc col ⁻		2,5-1(mut) 0,5	2,5+1(mut)	2,5+1 2,5+2 2,5+3 (kõigil pidurdatud kasv)	2,5+3 2,5+3 2,5+3	2,5+2 2,5+2
18.	R α lgtüvi E.coli K12		2,5-0,6				
19.	P678 R(\bar{x} α 356) Sm Cm Tc col ⁻	3	2,5+3,2	2,5+6	2,5+2 2,5+6 2,5-1	2,5+3 2,5+6 2,5+3	2,5+6 2,5+6
20.	R α lgtüvi E.coli K12 P678		2,5+0,1				

Võrreldes rekombinanttüvede akriflaviiniresistentsust enne ja pärast passaaži akriflaviinisisaldusega söötmes selgub, et 13-1 juhul 16-st on tüve akriflaviiniresistentsus tõusnud, 2-1 jäänud samale tasemele. Vaid ühel juhul - Watanabe tüvel CSH2R222 - on akriflaviiniresistentsus pärast passaaži langenud. On loomulik, et mingi mutageeniga mõjutades selekteeruvad bakterikultuurist välja need rakud, mis on resistentsena antud mutageenile. Jääb arusaamatuks, miks CSH2R222 muutus tundlikumaks. Kuna teada on vaid ühe katse tulemus, siis ei või siin kindlaid järeldusi selle kohta teha.

Kirjanduses leidub ka vastupidiseid tulemusi meie omadele. Grubb'i ja O'Reilly (1971) andmetel *S. aureus*'e kasvatamisel akriflaviinisisaldusega söötmes ravim tundlike (Sm^S ja Tc^S) mutantide tekke sagedus ei muutunud, samal ajal kui Pn^S rakkude arv tunduvalt suurenes.

Tabelis 7 on toodud andmed ka eliminatsioonil saadud R^- segregantide akriflaviiniresistentsuse kohta. Uuritud 68 R^- kolooniast 38-1 oli akriflaviiniresistentsus pärast r-determinantide kaotamist langenud, 14-1 jäänud samale tasemele ja 16-1 tõusnud. Toodud andmetest võib järeldada, et uuritud tüvedel R^+ -vormidel on tendents akriflaviiniresistentsusele. Yoshikawa (1971) järgi on olemas ka selline võimalus, et R-faktori olemasolu bakterirakus tõstab mutatsioonide tekke kiirust, mis muudavad bakteri resistentseks teatud ainete (akriflaviin, kanamütsiin, nalidiksiinhape) suhtes. Mutatsioonid, mis kõrgeenenud resistentsust põhjustavad, asuvad ise bakteri kromosoomis, mitte R-faktoris.

R-faktor võib bakteri akriflaviiniresistentsust mõjutada ka kaudselt, tsütoplasmatilise repressori kaudu. On teada, et fi^+R faktor represserib bakteri F-kiukaste sünteesi. Kuna

paljud ained (eriti detergendid) mõjuvad just bakteri membraanile, siis kiukeste esinemisest või puudumisest sõltub detergendi ligipääsetavus bakteri membraanile (Salisbury, Hedges, Datta, 1972). Kiukesed võimaldavad parema kontakti bakteri ja vastava aine (miks mitte ka akriflaviini) vahel.

Kuna meil oli tegemist mitmete erinevate tüvedega ja R-faktoritega, siis tuleb akriflaviiniresistentsuse ja selle muutmise uurimisel arvestada ka neid erinevusi (Watanabe, 1963; Baudens ja Chabbert, 1967).

C. KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED

Käesolevas töös uuriti 464 E.coli K12R⁺ rekombinanttüve, mis olid omandanud R-faktori 224-lt erinevalt Shigella sonnei doonortüvelt. Määrati nende rekombinanttüvede R-faktori tüüp, kolitsinogeensus, kolitsiintundlikkus, S-R-dissotsiatsioonivorm ning akriflaviiniresistentsuse aste. Lisaks nendele tüvedele uuriti akriflaviiniresistentsuse osas veel 16 Fredericqi standardtüve, 18 rahvusvaheliselt markeeritud tüve ning 37 kohaliku tüve.

Töö ülesandeks oli uurida R-faktorite võimalikku seost mikroobitüvede akriflaviiniresistentsusega ning R-faktorite elimineerumist akriflaviini toimel.

Katsetulemuste põhjal võib teha järgmised järeldused:

1. Erinevate R-faktoritega E.coli K12 tüvede akriflaviiniresistentsuse aste on väga erinev.
2. Teatud juhtudel esineb seos doonori kolitsinogeensus ja rekombinandi akriflaviinitundlikkuse vahel. Rekombinantidel, mille doonor on kolitsinogeenne, on tendents akriflaviiniresistentsusele.
3. R-faktori r-determinantide ja mikroobitüve akriflaviiniresistentsuse vahel seost ei ole.
4. Pärast R-faktori omandamist muutub suurem osa R⁻ mikroobitüvedest akriflaviini suhtes resistentsemaks.
5. R-faktorite eliminatsiooni sagedus akriflaviini toimel on väga madal, jäädes spontaanse eliminatsiooni sageduse tasemele.
6. Pärast R-faktori või osa r-determinantide kaotamist muutub enamuse R⁻ segregantidest akriflaviinile tundlikumaks võrreldes R⁺ algtüvega. Osa R⁻ segregante muutus akriflaviinile resistent-

semaks või jäi muutumatuks.

7. R⁺ tüvede passeerimine akriflaviinisisaldusega puljongis ei tõstnud R-faktorite eliminatsiooni sagedust, kuid tõstis mikroobikultuuride akriflaviiniresistentsust.

Резюме

В настоящей работе исследовались 464 рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*, которые получили R-факторы от 224 различных штаммов-доноров *Shigella sonnei*. У всех рекомбинантов определялись тип R-фактора, колициногенность, колициночувствительность, форма диссоциации и степень резистентности к акрифлавинолу.

Кроме этих рекомбинантных штаммов, изучалась резистентность к акрифлавинолу еще у 16 стандартных штаммов Фредерика, 18 маркированных штаммов и 37 местных диких штаммов.

Задачей настоящей работы являлось изучение возможной связи между R-факторами и резистентностью к акрифлавинолу и элиминации R-факторов у штаммов микробов.

На основании результатов опытов сделаны следующие выводы:

1. Степень резистентности к акрифлавинолу у штаммов с разными R-факторами очень различна.

2. В некоторых случаях наблюдается связь между колициногенностью донора и резистентностью к акрифлавинолу рекомбинанта. У рекомбинантов, донор которых был колициногенный, наблюдалась тенденция на резистентность к акрифлавинолу.

3. Между типом R-фактора и резистентностью к акрифлавинолу у штаммов микробов связи не наблюдалось.

4. После приобретения R-фактора большинство R⁺ штаммов становятся более резистентными к акрифлавинолу.

5. Частота элиминации R-факторов под влиянием акрифлавинола очень низкая (равна частоте спонтанной элиминации).

6. По сравнению с R⁺ начальным штаммом большинство сегрегантов после потери R-фактора или некоторых R-детерминантов становятся чувствительными к акрифлавинолу. Некоторые R⁻ сегреганты становились более резистентными или не изменялись вообще.

7. Пассажи R⁺ штаммов в бульоне с добавлением акрифлавинола не повышали частоту элиминации R-факторов, но увеличивали резистентность к акрифлавинолу у микробных культур.

K I R J A N D U S

Anderson E.S., 1965.

Origin of transferable drug-resistance factors in the Enterobacteriaceae. Brit. Med. J., 2, 1289-1291.

Baudens J.G., Chabbert Y.A., 1967.

Analyse des facteurs de resistance transferables isolees en France. Ann. Inst. Pasteur, 112, 565.

Boivin A., Mesrobianu L., Megheru G., Megheru A., 1936.

Sur les rapports existant entre l'aspect des colonies donnees par les colibacilles et la presence en l'absence d'antigene somatique "complect" dans les bacteries. C.r. Acad. Biol., 121, 169-173.

Chaloupecky V., Zahradnik F., 1972.

R-factor transmission under lowered surface tension. Zentralbl. für Bact., Parasit., Infektions - krankh. und Hygiene, 219, 3, 248-250.

Clowes R.C., 1972.

Molecular structure of bacterial plasmids. Bact. Rev., 36, 3, 361-405.

Clowes R.C., Moody E.E.M., Pitchard R.H., 1965.

The elimination of extrachromosomal elements in thymineless strains of E.coli K12. Genet. Res., 6, 147-152.

Cohen S., Miller C., 1970.

Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria. Molecular nature of R-factors isolated from *Proteus mirabilis* and *E. coli*. *J.Mol.Biol.*, 50, 3, 671-687.

Cooper P., 1971.

Interaction of a col-factor with a resistance factor and with the fertility factor F in *E.coli*K12. *Gen. Res.* 17, 2, 214-221.

Davis B.D., Mingioli E.S., 1950.

Mutants of *E.coli* requiring methionine or vitamin B12. *J. Bact.*, 60, 17-28.

Derylo M., Lorkiewicz Z., 1970.

Elimination of colicinogenic factor I. *Acta microbiol. pol.*, 12, 4, 165-168.

Fredericq P., 1948.

Actions antibiotiques reciproques chez *Enterobacteriaceae*. *Rev. Belge Path. Med. Expl.*, 19, 1, 1-107.

Fredericq P., Krčmery V., Kettner M., 1971.

Transferable colicinogenic factors as mobilizing agents for extrachromosomal streptomycin resistance. *Zeitschrift für allg. Mikrobiol.*, 11, 1, 12-16.

Gratia A., 1925.

Sur un remarquable d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Compt. Rend.Coc.Biol.*, 93, 1040-1041.

Grindley J.N., Grindley N.D.F., Anderson E.S., 1970.

Acridine treatment of F^+ and Hfr strains of *Escherichia coli* K12 carrying a neomycin-kanamycin resistance determinant. *Genet. Res.*, 15, 3, 327-334.

Grubb W. B., O'Reilly R.J., 1971.

Joint transduction of separate extrachromosomal drug resistance determinants in *Staphylococcus aureus* E169. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 42, 3, 375-383.

Heinaru A., 1970.

R-faktorid kolitsinogeensetel ja mittekolitsinogeensetel enterobakteritel. Dissertats. biol. kand. tead. kraadi taotl. Tartu.

Hirota Y., 1960.

The effect of acridine dyes on mating type factors in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 46, 57-64.

Jarolmen H., Kemp G., 1969.

R-factor transmission in vivo. *J. Bact.*, 99, 487-490

Kabins S., Panse M., Cohen S., 1971.

Role of R-factor and bacterial host in sulfonamide resistance mediated by R-factor in *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 123, 2, 158-168.

Kasuga T., Hashimoto H., Mitsunashi S., 1968.

Drug resistance of *Staphylococci*. VII. Genetic determinants responsible for the resistance to tetracycline, streptomycin, sulfanilamide and penicillin. *J. Bacteriol.* 95, 5, 1764-1766.

Kasuga T., Mitsuhashi S., 1968.

Drug resistance of Staphylococci.VIII:Genetic properties of resistance to tetracycline in Staphylococcus aureus E 161. Japan.J.Microbiol.,12, 3, 269-273.

Ketyi I., Vertenyi A., 1967.

Segregation of R-factor in Shigella after acridine orange treatment. Acta Microbiol. Acad. Sci.Hung., 14, 181-187.

Lawn A.M., Meynell E., Coe M., 1971.

Mixed infections with bacterial sex factors: sex pili of pure and mixed phenotype. Ann.Inst.Pasteur, 120, 1, 3-8.

Meynell E., Datta N., 1966.

The relation of resistance transfer factors to the F-factor (sex factor) of Escherichia coli K12. Genet. Res.,7, 134-140.

Meynell E., Meynell G.G., Datta N., 1968.

M

Phylogenetic relationships of drug-resistance factors and other transmissible plasmids. Bact. Rev.,32,51-83.

Mitsuhashi S.,1965.

Transmissible drug-resistance factor R with special reference to replication. The Gunma J.of Med.Sciences. XIV, 4, 245-257.

Mitsuhashi S., 1969.

The R-factors. J.Inf.Dis.,129, 89-100.

Mitsuhashi S., Harada K., Kameda M., 1961.

Elimination of transmissible drug resistance by treatment with acriflavine. Nature, 189, 947.

Mitsuhashi S., Harada K., Suzuki M., 1969.

Formation of recombinants between nontransmissible drug-resistance determinants and transfer-factors. J. Bacteriol., 97, 3, 1520-1521.

Moody E.E.M., 1970.

Recombination between R-factors and a colicinogenic factor. Microbiol. Genet. Bull., 32, 8-9.

Moody E., Clowes R., 1965.

Mutational immunity to a colicin. J. Gen. Microbiol., 39, 3, 11.

Moody E.E.M., Runge R., 1972.

The integration of autonomous transmissible plasmids into the chromosome of *Escherichia coli* K12. Genet. Res. 19, 2, 181-186.

Nakamura H., 1965.

Gene-controlled resistance to acriflavine and other basic dyes in *E. coli*. J. Bacteriol., 90, 1, 8-14.

Nakamura H., 1968.

Genetic determination of resistance to acriflavine, phenethyl alcohol, and sodium dodecyl sulfate in *E. coli*. J. Bact., 96, 987-996.

Nakamura H., Suganuma A., 1972.

Membrane mutation associated with sensitivity to acriflavine in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 110, 1, 329-335.

Nomura M., 1967.

Colicins and related bacteriocins. Ann. Rev. Microbiol., 21, 257-284.

Novick R.P., 1969.

Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bact.Rev.*,
2, 210-262.

Ozeki H., 1968.

Methods for the study of colicine and colicinogeny.
Methods Virol., 4, 565-592.

Pearce L.E., Meynell E., 1968.

Mutation to high-level streptomycin-resistance in
 R_3^+ bacteria. *J.Gen.Microbiol.*, 50, 173-176.

Pearce L.E., Meynell E., 1968.

Specific chromosomal affinity of a resistance fac-
tor. *J.Gen.Microbiol.*, 50, 159-172.

Salisbury V., Hedges R.W., Datta N., 1972.

Two modes of curing transmissible bacterial plas-
mids. *J.Gen.Microbiol.*, 70, 3, 443-452.

Siccardi A.G., 1966.

Colicin resistance associated with resistance fac-
tors in *Escherichia coli* K12. *Genet.Res.*, 8, 211-228.

Silver R.P., Cohen S.N., 1972.

Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria.
(Isolation and characterization of R-factor mutants
exhibiting temperature-sensitive repression of fer-
tility. *J.Bacteriol.*, 110, 3, 1082-1088.

Smith D.H., 1967.

R-factors mediate resistance to mercury, nickel
and cobalt. *Science*, 156, 3778, 1114-1116.

Tarbijate elektriseadeldiste eksploatatsiooni eeskirjad.

Tarbijate elektriseadeldiste ohutuseeskirjad. Tln. 1972.

Tomoeda M., Inuzuka M., Kubo H., 1968.

Effective elimination of drug resistance and sex factors in *E. coli* by sodium dodecyl sulfate. *J. Bact.*, 95, 1078.

Vernon E.G., Sweeny H.M., Cohen S., 1970.

Evidence for genetic interaction between plasmid and chromosomal penicillinase linkage groups in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, 103, 3, 826-829.

Vondraškova M., Starka J., 1966.

Множественно резистентные штаммы *E. coli* выделенные из мочеполового тракта.

Ж. гигиены, эпидемиол., микробиол. и иммунобиол. 10, 166-169.

Watanabe T., 1963.

Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bact. Rev.*, 27, 87-88.

Watanabe T., 1971.

Transferable antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: relationship to the problems of treatment and control of coliform enteritis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 176, 371-384.

Watanabe T., Fukasawa T., 1960.

Resistance transfer factor, an episome in Enterobacteriaceae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3, 660-665.

Watanabe T., Fukasawa T., 1961.

Episome-mediated transfer of drug resistance in

Enterobacteriaceae. 1. Transfer of resistance factors by conjugation. J. Bact. , 81, 669-678.

Wiedemann B., Knothe H., Fisher J., De Bary K., 1970.

Die Hemmung der R-faktor-Übertragung in vivo.

Arzneimittel-Forsch., 20, 8, 1147-1149.

Yamagata H., Uchida H., 1969.

Effect of acridine orange on sex factor multiplication in E. coli. J. Mol. Biol., 46, 1, 73-84.

Yoshikawa M., 1971.

Drug sensitivity and mutability to drug resistance associated with the presence of an R-factor.

Genet. Res., 17, 3, 1-7.

Yoshikawa M., Sewag M.G., 1967.

Sensitivity of Escherichia coli to atarbine conferred by R-factor and its potential clinical significance. J. Bact., 93, 245-253.

Yoshikawa M., 1971.

Selective enrichment of R⁻ segregants as the main mechanism of curing the R-factor by acridine dyes. Genet. Res., 17, 1, 9-16.

Астанов А.А., 1969.

Нетрансферабельные эписомы множественной лекарственной устойчивости. Генетика, 5, 114-121.

Анисимов П.И., Синичкина А.А., 1969.

Элементы сцепления признаков при конъюгационной передаче эписомного R-фактора. Проблемы особо опасных инфекций., 3, 80-83.

Бельский В.В., 1972.

Изучение популяций микробов-носителей R-факторов в организме человека и животного. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии., 1972, № II, 57-61.

Бельский В.В., 1969?

Распространение эписомного фактора множественной лекарственной устойчивости (R-фактор) среди клинических штаммов возбудителей дизентерии. Антибиотики, 14, 1022-1026.

Глатман Л.И., 1972.

Ингибиторный анализ передачи R-факторов у E. coli при конъюгации. Автореферат. Москва, 1972.

Кудлай Д.Г., Чубуков В.Ф., Оганесян М.Г., 1972.

Генетика лекарственной устойчивости бактерий. М, Москва.

Кудлай Д.Г., Лиходед В.Г., 1966.

Бактериоциногенез. Л., изд-во "Медицина".

Кудлай Д.Т., 1969.

Эписомы и инфекционная наследственность бактерий. М, Москва.

Клаус Р., Хейс У., 1970.

Сборник методик по генетике микроорганизмов. М, Москва.

Клаус Р., Хейс У., 1970.

Сборник методик по генетике микроорганизмов.

М., Москва.

Лиходед В.Г., Падалко Т.Б., 1965.

Влияние акрифлавина на частоту передачи коли-

циногенного фактора у Salmonella typhimurium

Микробиология. 34, 6, 1041-1048.

Падалко Т.Б., 1967.

Действие акридиновых красителей на колицино-
генные бактерии.

Автореферат дис. канд. мед. н., М.

Правила по эксплуатации и технике безопасности при работе
на автоклавах. М. 1971.

Правила по технике безопасности и производственной сани-
тарии при работе в химических лабораториях высших и сред-
них специальных учебных заведений. М. 1965.

Сойфер В.М., 1969.

Молекулярные механизмы мутагенеза.

" Наука " , Москва.

Санитарные нормы проектирования промышленных предпри-
ятий. М. 1972.

Танака Т., 1970.

Передача колициногенности между штаммами Shi-
gella sonnei. Nagasaki Med. J.

1970., 45, № 10, 539-546.