

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* С РАЗНОЙ СПОСОБНОСТЬЮ К СИНТЕЗУ ПИОЦИАНИНА

О.С. Жданова¹, Е.П. Красноженов¹, Э.А. Соснин^{2,3}, Л.В. Гудкова⁴, А.В. Грицута¹, И.М. Протас⁵, А.В. Ефиц¹

¹ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, Томск

²ФГБУН Институт сильноточной электроники СО РАН, Томск

³ГОУ ВПО Томский государственный университет

⁴ОГАУЗ Томская областная клиническая больница

⁵Представительство ЭРБА Лахема в РФ, Москва

Определена чувствительность штаммов *P. aeruginosa* с разной способностью к синтезу пиоцианина к применяемым антибиотикам: карбенциллину, левофлоксацину, цiproфлоксацину, цефоперазону, имипенему, меропенему, амикацину и гентамицину. Обнаружена умеренная взаимосвязь между пигментообразованием и чувствительностью к антибиотикам для большинства препаратов и тесная – для аминогликозидов.

Ключевые слова: *P. aeruginosa*, антибиотикорезистентность, пигментообразование.

ANTIBIOTIC RESISTANCE OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA STRAINS WITH DIFFERENT PIGMENT PRODUCTION ABILITY

O.S. Zhdanova¹, E.P. Krasnozhenov¹, E.A. Sosnin^{2,3}, L.V. Gudkova⁴, A.V. Gritsuta¹, I.M. Protas⁵, A.V. Efitz¹

¹Siberian State Medical University, Tomsk

²Institute of High-Current Electronics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Tomsk

³Tomsk State University

⁴Tomsk Regional Hospital

⁵Erba Lachema Representatives in Russian Federation, Moscow

The sensitivity to different clinical antibiotics of *P. aeruginosa* strains with different ability for pigment production (Carbenicillin, Levofloxacin, Ciprofloxacin, Cefoperazone, Imipenem, Meropenem, Amikacin, Gentamicin) has been determined. The moderate statistical association between chromogenesis and sensitivity to antibiotics for the majority of preparations has been found out, close correlation being noted for aminoglycosides.

Key words: *P. aeruginosa*, antibiotic resistance, chromogenesis.

Актуальной темой современной медицины остаются внутрибольничные инфекции. Ведущее место в их общей структуре занимает синегнойная инфекция, возбудителем которой является *P. aeruginosa*. В последние 10 лет прослеживается тенденция к увеличению удельного веса заболеваний, вызванных этим микроорганизмом [3, 4, 5]. Нередко они характеризуются тяжелым течением и сопровождаются высокой летальностью. Широкое применение антибиотиков приводит к формированию резистентных штаммов, что значительно затрудняет проведение этиотропной терапии [10].

Одним из дифференциально-диагностических признаков, на который обращают внимание при ми-

кробиологической диагностике синегнойной инфекции, является способность микроорганизма синтезировать водорастворимый пигмент – пиоцианин. Это вещество относится к феназиновым соединениям, продуцируемым представителями рода *Pseudomonas*, и обладает широким спектром антибиотической активности, проявляющейся в отношении грамположительных, грамотрицательных микроорганизмов и грибов [9, 15]. Пиоцианин является одним из факторов вирулентности. В литературе имеются сведения о наличии прямой корреляции между способностью синегнойной палочки к синтезу пиоцианина и степенью ее патогенности. Инфекция, вызванная беспиг-

ментными штаммами, протекает легче, и возбудитель быстро элиминирует из организма хозяина [14]. Атипичные (беспигментные) формы возбудителя затрудняют постановку диагноза, препятствуя своевременному проведению лечебных и противоэпидемических мероприятий [4, 7, 11]. *P. aeruginosa* является крайне неприхотливым микроорганизмом с широкими адаптивными возможностями и способностью быстро формировать резистентность к антибиотикам. В такой ситуации беспигментные штаммы могут играть ведущую роль в формировании внутригоспитальных экovarов.

Целью настоящей работы является определение чувствительности к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa* с разной способностью к синтезу пиоцианина и выявление оптического маркера, характеризующего чувствительность культуры к антибиотикам.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследованы 50 штаммов синегнойной палочки, выделенных от больных с различной патологией на базе Томской областной клинической больницы. Идентификацию выделенных культур проводили на основании морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических свойств. На плотных питательных средах оценивали морфологию колоний, наличие бактериофага. Биохимические свойства определяли с помощью тест-систем NEFERMtest 24 (Эрба Лахема, Чехия).

У выделенных штаммов определяли наличие факторов патогенности, для чего делали посевы чистых культур на кровяной агар – для выявления гемолитической активности и на желточный агар – для обнаружения лецитиназной активности. Протеолитическую активность оценивали по стандартной методике [8]. Чувствительность к антибиотикам выявляли по стандартному диско-диффузионному методу, основанному на оценке диаметра зоны задержки роста исследуемого микроорганизма [12].

Наличие пигмента оценивали следующим образом: культуры в течение суток выращивали на мясо-пептонном агаре с добавлением 1% глицерина и 1% глюкозы для стимуляции синтеза пигмента. Затем чашки Петри с культурой заливали стерильной дис-

тиллированной водой и культивировали еще 2-3 суток, после чего суспензию фильтровали через бактериальные фильтры. Наличие пигментов определяли в фильтрате супернатанта с помощью спектрофотометрии. Спектр поглощения регистрировали на спектрофотометре StellaNetEPP2000-C25, совмещенном с опорным источником излучения SL5 UV-VIS на основе дейтериевой и накальной ламп. Наличие пигмента в фильтрате оценивали по характерным пикам поглощения.

Статистическая обработка проводилась с использованием системы программного обеспечения анализа базы данных Statistica 6.1 и программы Excel. Для выявления различий в антибиотикорезистентности использовали точный критерий Фишера с поправкой Йейтса, для выяснения взаимосвязи между пигментообразованием и антибиотикорезистентностью был применен коэффициент ассоциации Пирсона [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все выделенные культуры были представлены мелкими граммотрицательными палочками, расположенными парно. На мясо-пептонном агаре с глицерином часть штаммов образовывали мелкие (1÷2 мм) или средние (2÷3 мм), выпуклые или плоские бесцветные полупрозрачные колонии S- или R-формы, из них 58% были инфицированы бактериофагами, что проявлялось спонтанным лизисом культуры с появлением радужной пленки или без нее. Феномен «радужного лизиса» (появление на поверхности колоний плёнки, переливающейся в отражённом свете всеми цветами радуги) обусловлен спонтанным действием бактериофага и характерен для *P. aeruginosa*. Другие штаммы образовывали крупные плоские колонии R-формы и продуцировали пигменты, окрашивающие среду в бледно-зеленый, сине-зеленый, бурый и красный цвета (рис. 1). Некоторые из них также обнаруживали признаки «радужного лизиса».

В проведенных нами тестах биохимическая активность всех штаммов выражалась в положительной реакции на оксидазу, аргинин, глюкозу, фруктозу, маннитол, ксилозу, галактозу, нитраты, нитриты, гамма-глутамилтрансферазу и цитрат Симонса. Отрицательная реакция наблюдалась на индол, уреазу, ли-



Рис. 1. Пигменты, продуцируемые *P. aeruginosa*

зин, инозитол, сахарозу, фосфатазу, β -галактозидазу, β -глюкозидазу, NAG, целлобиозу, эскулин, лактозу, мальтозу, трегалозу. Таким образом, на основании морфологических, культуральных, тинкториальных и биохимических признаков было установлено, что все фенотипы выделенных культур соответствовали виду *Pseudomonas aeruginosa* и обладали гемолитической, лецитиназной и протеолитической активностью.

При проведении спектрофотометрического анализа 16 фильтратов, окрашенных в интенсивный сине-зеленый цвет, определялись полосы поглощения с максимумами в области 251, 309-312, 367-378, 685-690 нм (рис. 2), что соответствует пикам поглощения пиоцианина, приводимым в литературе для «чистого» пиоцианина: 239, 312, 379, 690 нм [2]. Неточное совпадение пиков поглощения в нашем исследовании может быть связано с присутствием в фильтрате белковых продуктов метаболизма и тем, что штаммы, как правило, синтезируют несколько пигментов одновременно [13]. Фильтраты, полученные от беспигментных штаммов, имели пик поглощения в области 276-280 нм (таких оказалось 12), что, вероятно, связано с наличием в фильтратах белковых продуктов, которые активно поглощают излучение с длинами волн $\lambda < 300$ нм (преимущественно белки) [1]. Бактериальные фильтраты остальных штаммов окрашивали среду в бледно-зеленый, бурый и красный цвета, при этом регистрировались пики поглощения соответственно 251, 276-280 и 251, 367-378, 520 нм. Еще четыре фильтрата, которые были получены от беспигментных штаммов, не имели каких-либо пиков поглощения.

По результатам спектрофотометрического анализа все штаммы по их способности синтезировать пиоцианин были разделены на две группы. Первую составили 16 штаммов, в фильтратах от которых были обнаружены пики поглощения, характерные для пиоци-

анина. Во вторую включены 12 беспигментных штаммов, в фильтратах от которых регистрировался один пик поглощения в области 276-280 нм.

В ходе исследования определяли чувствительность выделенных штаммов *P. aeruginosa* к рекомендованным антибиотикам [12], отличающимся высокой природной антипсевдомонадной активностью к β -лактамам, фторхинолонам и аминогликозидам. Результаты оценки резистентности исследуемых штаммов к антибиотикам представлены на рис. 3.

Все беспигментные штаммы и подавляющее большинство штаммов, продуцирующих пигмент, имели резистентность к карбенициллину. При этом достоверных различий чувствительности штаммов этих групп к препарату выявлено не было. Это может быть связано с широкой распространенностью резистентности *P. aeruginosa* к карбенициллину. Этот антибиотик имеет минимальное клиническое значение для лечения синегнойной инфекции, но, тем не менее, относится к дополнительным препаратам, рекомендованным для оценки чувствительности [12].

Высокую резистентность к цефалоспорином третьего поколения проявили также беспигментные штаммы. Все представители этой группы оказались устойчивы к цефоперазону, 92% – к цефтазидиму. Столько же штаммов проявляли резистентность к карбапенемам. Среди штаммов, продуцирующих пиоцианин, резистентных к цефалоспорином оказалось менее половины (31%), а количество устойчивых к имипенему и меропенему было достоверно меньше: 25 и 19% соответственно. Более высокая чувствительность к меропенему может объясняться его большей активностью в отношении грамотрицательных микроорганизмов. Чувствительность штаммов синегнойной палочки к β -лактамам зависит от степени их псевдомонадной активности и

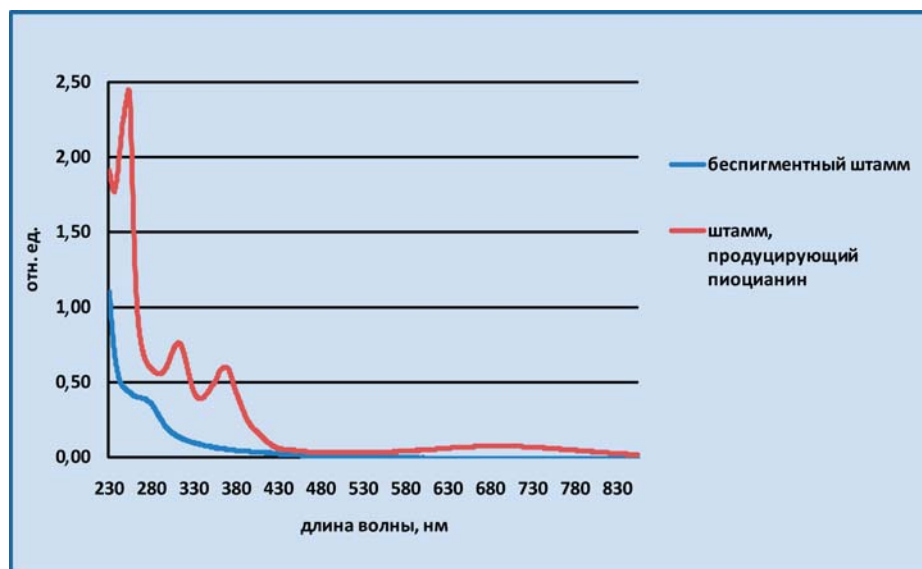


Рис. 2. Спектры поглощения фильтратов

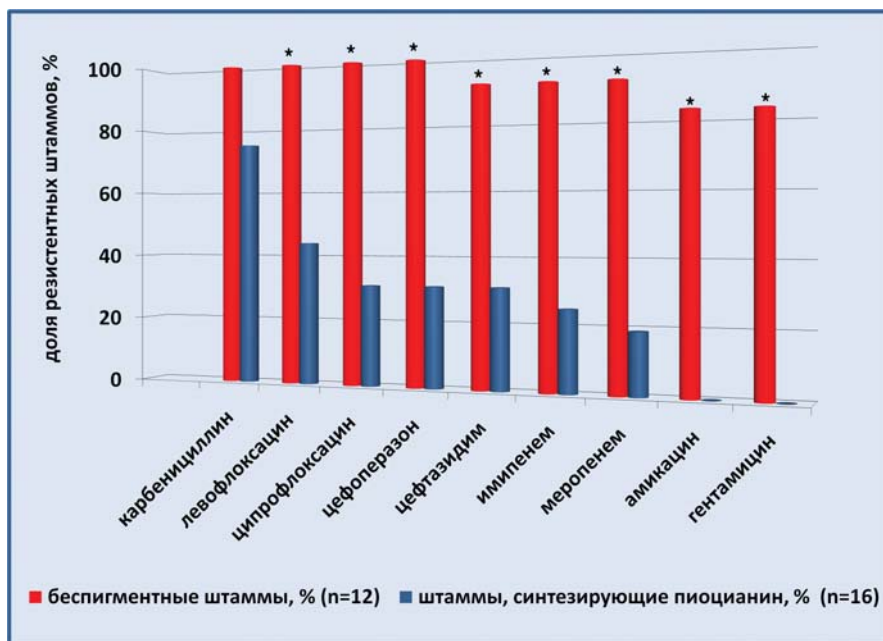


Рис. 3. Частота встречаемости штаммов *P. aeruginosa*, резистентных к антибиотикам (* $p < 0,05$)

убывает в ряду – карбапенемы, цефалоспорины третьего поколения, карбенициллин [11]. В нашем исследовании такая тенденция была общей для обеих групп штаммов. Вместе с тем наиболее ярко она проявилась в группе, состоящей из штаммов, продуцирующих пиоцианин.

Механизмы резистентности к β -лактамам наиболее часто связывают с изменением проницаемости наружной мембраны клеточной стенки, синтезом β -лактамаз, модификацией пенициллинсвязывающих белков, приводящей к снижению аффинности к β -лактамам, активным выведением антибиотиков из клетки [11, 12].

В отношении фторхинолонов (левофлоксацина и ципрофлоксацина) беспигментные штаммы *P. aeruginosa* проявили 100% устойчивость. Механизм резистентности к фторхинолонам связывают с наличием системы их активного выведения из цитоплазмы. Нередко среди грамотрицательных микроорганизмов отмечают полную перекрестную резистентность между этими препаратами [12]. Иной профиль резистентности к фторхинолонам сложился в группе пигментообразующих культур. Так, наименьшую устойчивость они проявляли к ципрофлоксацину (31%), что может быть объяснено максимальной активностью этого препарата в отношении псевдомонад [11].

Подавляющее большинство беспигментных штаммов (83%) проявляли резистентность к аминогликозидам – амикацину и гентамицину. При этом наблюдалась перекрестная устойчивость. Интересно, что среди пигментообразующих все штаммы оказались чувствительными к этим препаратам. Устойчивость к аминогликозидам у *P. aeruginosa* может быть вызвана, прежде все-

го, ферментативной инактивацией антибиотиков, снижением проницаемости наружной или цитоплазматической мембраны, значительно реже – модификацией мишени. Беспигментные штаммы, как и штаммы, продуцирующие пиоцианин, проявляли 100% чувствительность к полимиксину, что обусловлено недоступностью этого антибиотика на территории РФ [12].

Обращает на себя внимание высокая частота проявления феномена «радужного лизиса» в группе беспигментных штаммов – 58% (8 штаммов). Эти штаммы отличались устойчивостью сразу к 9 антибиотикам (ко всем, кроме полимиксина). Два штамма этой группы проявляли резистентность к 8 препаратам и были чувствительны к одному из карбапенемов, по одному штамму оказались резистентными к 7 и 6 препаратам, сохраняя чувствительность в первом случае только к аминогликозидам, а во втором – к аминогликозидам и цефтазидиму.

Из 16 штаммов, синтезирующих пигмент, «радужный лизис» обнаружен только у двух, один из которых проявлял чувствительность ко всем препаратам, за исключением карбенициллина, а второй – к карбенициллину и фторхинолонам. Среди остальных штаммов четыре оказались чувствительными ко всем антибиотикам, четыре проявляли резистентность к карбенициллину и один был промежуточным по цефтазидиму. Еще четыре штамма оказались устойчивыми к трём препаратам в разной комбинации – карбенициллину и двум фторхинолонам (два штамма), карбенициллину и цефалоспорином третьего поколения (один штамм), карбенициллину, имепенему и левофлоксацину (один штамм), и по одному штамму встречались резистент-

ные к четырем (карбенициллину, цефалоспорином третьего поколения, фторхинолонам), 5 (карбенициллину, цефалоспорином третьего поколения и карбопенемам), 6 (карбенициллину, цефалоспорином третьего поколения, карбопенемам и левофлоксацину) и 7 (карбенициллину, цефалоспорином третьего поколения, карбопенемам и фторхинолонам) антибиотикам.

Наличие и силу связи между качественными признаками (в нашем случае пигментообразованием и антибиотикорезистентностью) отражает коэффициент ассоциации r_A [10]. Чтобы выяснить, существует ли взаимосвязь между ними и какова ее сила, нами был проведен статистический анализ связи, результаты которого представлены в таблице.

Сопоставление пигментообразования с чувствительностью к различным антибиотикам (сила ассоциации)

Антибиотик	Коэффициент ассоциации, r_A	Уровень статистической значимости, p
Карбенициллин	0,250	0,1851
Левофлоксацин	0,519	0,0061
Цефтазидим	0,531	0,0049
Имипенем	0,589	0,0018
Цефоперазон	0,623	0,001
Ципрофлоксацин	0,623	0,001
Меропенем	0,649	0,0006
Гентамицин	0,785	<0,0001
Амикацин	0,785	<0,0001

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследована способность разных штаммов синегнойной палочки к синтезу пиоцианина и определена их чувствительность к антибиотикам. Проведен анализ зависимости между антибиотикорезистентностью и пигментообразованием. Обнаружена умеренная ассоциативная связь между пигментообразованием и чувствительностью к антибиотикам для большинства препаратов, тесная взаимосвязь отмечена для аминогликозидов. Для выяснения причины такой взаимосвязи необходимы дополнительные исследования. В литературе имеется указание на то, что появление беспигментных штаммов может быть связано с влиянием антибиотиков [6]. К сожалению, в доступных источниках научной литературы мы не обнаружили исследований, посвященных детальному изучению этого вопроса. Надеемся, что наша работа в некоторой мере восполняет этот пробел.

Не вызывает сомнений, что высокая частота возникновения резистентности к антибиотикам беспигментных штаммов в отсутствие надежных способов идентификации может играть важную роль в форми-

ровании внутрибольничных штаммов синегнойной палочки. В такой ситуации становится очевидной необходимость использования диагностических систем, обеспечивающих высокую степень надежности идентификации выделенных культур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимирова Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. М.: Высш. школа, 1989. 214 с.
2. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика / пер. с англ. М.: Мир, 1991. 299 с.
3. Зубков М.Н. Неферментирующие бактерии: классификация, общая характеристика, роль в патологии человека. Идентификация *Pseudomonas spp.* и сходных микроорганизмов // Инфекц. антимикроб. тер. 2003. №1. С.170-177.
4. Илюкевич Г.В. Синегнойная инфекция: в новый век со старой проблемой // Мед. новости. 2004. №12. С.3-8.
5. Коршунова Г.С. О состоянии заболеваемости внутрибольничными инфекциями в Российской Федерации // Эпидемиол. вакцинопрофилактик. 2007. №1. С.4-5.
6. Лямин А.В. Особенности биологических свойств и факторов патогенности штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из разных источников // Аспирант. вестн. Поволжья. 2010. №3-4. С.220-223.
7. Мороз А.Ф., Анциферова Н.Г., Баскакова Н.В. Синегнойная инфекция / под ред. А.Ф. Мороз. М.: Медицина, 1988. 256 с.
8. МУК 4.2.2602-10. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков. Методические указания (утв. Роспотребнадзором 21.04.2010). М., 2010.
9. Пыж А.Э., Никандров В.Н. Вклад сине-зеленых пигментов *Pseudomonas aeruginosa* в гемолитическую активность культуральной жидкости // Журн. микробиол. 2011. №1. С.19-25.
10. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ Statistica. М.: МедиаСфера, 2002. 312 с.
11. Сидоренко С.В., Резван С.П., Стерхова Г.А., Грудина С.А. Госпитальные инфекции, вызванные *Pseudomonas aeruginosa*. Распространение и клиническое значение антибиотикорезистентности // Антибиот. химиотер. 1999. №3. С.25-34.
12. Скала Л.З., Сидоренко С.В., Нехорошева А.Г. и др. Практические аспекты современной клинической микробиологии. Тверь: Триада, 2004. 312 с.
13. Feklistova I.N., Maksimova N.P. Obtaining *Pseudomonas aeruginosa* strains capable of overproduction of phenazine antibiotics // Microbiology. 2008. V.77, No.2. P.207-212.
14. Price-Whelan A., Dietrich L.E.P., Newman D.K. Rethinking «secondary» metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics // Nat. Chem. Biol. 2006. V.2, No.2. P.71-78.
15. Veessenmeyer J.L., Hauser A.R., Lisboa T. *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: evolving translational strategies // J. Crit. Care Med. 2009. V.37, No.5. P.1777-1786.