

МУТАНТЫ *BURKHOLDERIA CEPACIA* С МНОЖЕСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТЬЮ К АНТИБИОТИКАМ

Е.В. Калинин, И.К. Сеимова, О.А. Меринова, Д.В. Виктор, Л.К. Меринова

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Burkholderia cepacia, микроорганизм, изначально известный как фитопатоген, в последние годы все больше привлекает внимание как вид, способный вызывать инфекционные процессы у человека [8]. Он не только осложняет заболевания у пациентов с иммунодефицитными состояниями, но вызывает послеоперационные раневые инфекции, септицемии, инфицирование мочевыводящих путей, возникающие при использовании растворов для внутривенного введения, инструментов и оборудования для интенсивной терапии и контаминированных дезинфектантов [3]. *Cepacia*-синдром характеризуется некротизирующей пневмонией с лихорадкой, бактериемией и быстро приводит к летальному исходу [6]. Генетическая гетерогенность бактерий комплекса *B.cepacia*, обусловленная сложным строением генома [1], рассматривается в качестве отличительного свойства этого микроорганизма, позволяющего ему существовать в разных экологических нишах и быть патогеном растений и животных. *B.cepacia* обладает высокой природной резистентностью ко многим антибиотикам, при этом первично чувствительные штаммы, выделенные от больных, легко формируют устойчивость в процессе лечения [3, 6]. В связи с этим особое значение приобретает изучение резистентности *B.cepacia* к ингибиторам как явления препятствующего проведению эффективной антибактериальной терапии. Очевидно также, что раскрытие механизмов устойчивости создает необходимые предпосылки к разработке путей ее преодоления.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Получить мутанты *B.cepacia* с фенотипом множественной лекарственной резистентности и исследовать механизмы ее формирования.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы штаммы дикого типа *B.cepacia* ATCC 25416 и 8235, а также их резистентные мутанты (см. табл.). Питательные среды – *L*-агар и *L*-бульон ("Difco", США).

Минимальные подавляющие концентрации (МПК) пefлоксацина, цефтазидима и других антибиотиков определяли методом стандартных разведений на плотных питательных средах.

Для выделения резистентных клонов использовали метод направленной селекции культур на плотных средах с антибиотиками в повышающихся концентрациях (начиная от МПК). Культуры инкубиро-

вали при температуре 32 °С от двух до четырех суток.

Для оценки динамики ингибирования роста антибиотиками исследуемых штаммов, суспензии 24-часовых агаровых культур бактерий в 0,15 М NaCl, содержащие 1×10^4 м.к. в 1 мл, высевали на *L*-агар с добавлением пefлоксацина и цефтазидима. Гибель клеток микроорганизма определяли по соотношению количества колоний, выросших на среде с антибиотиком, к количеству колоний, выросших в контроле, принятому за 100%.

Продукцию внеклеточных ферментов (протеаз, липазы, лецитиназы) определяли на плотных питательных средах, содержащих необходимые субстраты [4]. Для выявления способности клеток микроорганизма сорбировать липофильный краситель, двухсуточные, инкубированные при 32 °С колонии штаммов заливали раствором судана черного "В" и через 10 минут учитывали изменение цвета колоний [11].

Таблица 1

Перечень штаммов *B.cepacia*, использованных в работе

Штаммы	Характеристика	Источник получения
ATCC 25416	дикий тип	коллекционный центр ВолгоградНИПЧИ
8235	"-"	"-"
25416 SMR1	$Cfz^R Pfx^R$	получены в данной работе
25416 SMR2	$Pfx^R Cfz^R$	"-"
8235 SMR1	$Cfz^R Pfx^R$	"-"
8235 SMR2	$Pfx^R Cfz^R$	"-"
25416 SMR3	Cfz^R	"-"
8235 SMR11	Kan^R	"-"
25416 SMR11	Kan^R	"-"
8235 SMR12	Chl^R	"-"
25416 SMR12	Chl^R	"-"
25416 SMR13	$Kan^R Chl^R$	"-"
8235 SMR13	$Kan^R Chl^R$	"-"

Примечание. Cfz^R – резистентность к цефтазидиму, Pfx^R – пefлоксацину, Kan^R – канамицину, Chl^R – хлорамфениколу.

Выделение белков наружной мембраны проводили методом Hancock [7], экспрессию белков исследовали методами электрофореза в полиакрила-

мидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) и иммуноблоттинга [9, 13].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Изначально штаммы *B.ceracia* ATCC 25416 и 8235 исследовали на исходную резистентность к антибиотикам различных классов. Клоны, с некоторыми отличиями, характеризовались резистентностью к большинству из них, при этом, максимальную устойчивость они проявляли к полимиксину, ампициллину и стрептомицину (10000 мкг/мл, 7500 мкг/мл и 5000 мкг/мл соответственно). Штаммы были чувствительны к цефтазидиму, пefлоксацину и, в меньшей степени к хлорамфениколу и канамицину (10 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл и 200 мкг/мл соответственно).

Для получения мутантных штаммов мы использовали препараты, отличающиеся по механизму действия на бактериальную клетку, к которым *B.ceracia* проявляла наибольшую чувствительность.

После ряда пассажей на средах поочередно с одним, затем – с другим ингибитором мы получили два набора штаммов, в одном из которых селективируемыми маркерами были Pfx^R и Cfz^R (резистентные к пefлоксацину и цефтазидиму), во втором – Kan^R и Chl^R (резистентные к канамицину и хлорамфениколу).

Определение МПК препаратов для данных штаммов показало, что их устойчивость, по сравнению с дикими штаммами, увеличилась по каждому маркеру в несколько раз, при этом максимальных значений достигла резистентность к цефтазидиму (МПК 1500 мкг/мл) и к канамицину (МПК 8000 мкг/мл).

Штаммы *B.ceracia* ATCC 25416 и 8235 с маркерами $Pfx^R Cfz^R$ приобрели дополнительную (перекрестную) устойчивость высокого уровня к ампициллину, хлорамфениколу, тетрациклину (рис. 1), и в меньшей степени – резистентность к антибиотикам ряда аминогликозидов.

Анализ полученных результатов показал, что у штаммов резистентных к канамицину возросла устойчивость к другим препаратам этого ряда – стрептомицину и гентамицину, тогда как у штаммов с маркером Chl^R резистентность к ним осталась на прежнем уровне или снизилась. В отличие от этого, появление устойчивости к тетрациклину и ампициллину не зависело от приобретенных изначально маркеров резистентности к хлорамфениколу или канамицину. МПК пefлоксацина возросла у мутантов Chl^R и осталась практически на прежнем уровне у штаммов Kan^R . Фенотип устойчивости к цефтазидиму, напротив, выявлялся у штаммов с маркером Kan^R . Исходя из этого, можно было предположить, что существует тенденция взаимосвязи развития этих типов устойчивости друг от друга в направлении: $Chl^R - Pfx^R$ и $Kan^R - Cfz^R$, повышение резистентности к одному препарату ведет к возрастанию МПК второго (рис. 2).

У штаммов резистентных к пefлоксацину и

цефтазидиму определяли динамику ингибирования роста (рис. 3).

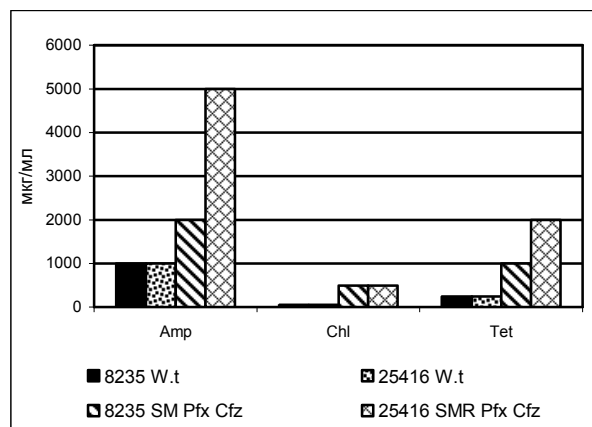


Рис. 1 Множественная лекарственная резистентность штаммов *B.ceracia*:

Обозначения: W.t. – дикий тип; SMR2 – штаммы резистентные к пefлоксацину, цефтазидиму; Amp – ампициллин; Chl – хлорамфеникол; Tet – тетрациклин

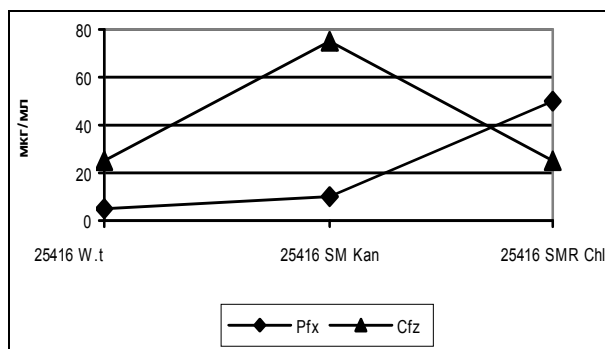


Рис. 2. Перекрестная резистентность штаммов *B.ceracia* в зависимости от селективируемого маркера:

Обозначения: W.t. – дикий тип; SMR11 – штамм резистентный к канамицину; SMR12 – штамм резистентный к хлорамфениколу; Pfx – пefлоксацин; Cfz – цефтазидим

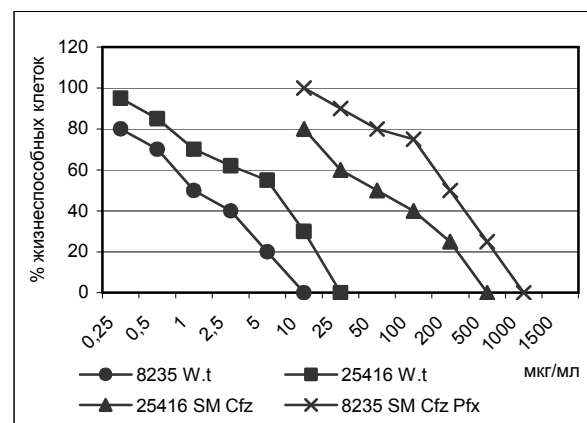


Рис. 3. Динамика подавления цефтазидимом роста исходных и резистентных штаммов *B.ceracia*:

Обозначения: как на рис. 1

Как видно из рисунка, динамика гибели клеток под действием ингибиторов имеет характер плавно

нисходящих кривых. При этом кривые гибели резистентных штаммов не изменили своей структуры, в сравнении с исходными, а лишь сдвинулись вправо, демонстрируя значительно более высокие уровни подавляющих концентраций, чем аналогичные показатели для исходных штаммов. Так, резистентность штамма *B.cepacia* 8235 SMR1 возросла в 100, а штамма *B.cepacia* 25416 SMR3 в 20 раз по сравнению с дикими штаммами. Концентрация данного антибиотика, вызывавшая гибель 70–80% клеток, составляла для мутантного штамма *B.cepacia* 8235 1000 мкг/мл; для резистентного штамма *B.cepacia* 25416 300 – 400 мкг/мл.

Показано, что множественная лекарственная устойчивость бактерий обусловлена функционированием различных молекулярных механизмов, в том числе – активного выброса из клетки антимикробных соединений и снижения общей проницаемости клеточной оболочки в результате изменения экспрессии поринов наружной мембраны (5, 10, 12). В связи с этим штаммы *B.cepacia*, резистентные и исходные, исследовали на способность к продукции некоторых внеклеточных ферментов (лецитиназы, протеазы, липазы), используя этот тест для косвенной оценки возможных изменений в проницаемости их клеточных стенок. При этом мы выявили у резистентных клонов изменение лецитиназной, твин-эстеразной и протеолитической активностей. В наибольшей степени у них изменялась активность протеолитических ферментов, снизившаяся у большинства мутантов штамма *B.cepacia* 8235, всех устойчивых клонов штамма *B.cepacia* 25416, один из которых полностью ее утратил. Способность сорбировать краситель судан черный "В", была обнаружена у штамма *B.cepacia* 8235 SMR2. По этому признаку он отличался от остальных как диких, так и резистентных, что позволяет предполагать у него снижение продукции экзополисахарида клеточной стенки [11].

Был проведен анализ экспрессии белков клеточных мембран исходного штамма *B.cepacia* 25416 и его производных *B.cepacia* 25416 SMR3, *B.cepacia* 25416 SMR2. Белковый состав клеточных мембран и изменение уровня экспрессии отдельных мембранных белков оценивали методом иммуноблоттинга с применением иммуноферментного конъюгата на основе поликлональных иммуноглобулинов, специфически взаимодействующих с консервативными поверхностными белками различных видов *Burkholderia*. Антигенные профили мембранных белков исходных и антибиотикорезистентных штаммов представлены на рис. 4.

По данным иммунохимического анализа, резистентные штаммы *B.cepacia* с фенотипом $Pf\alpha^R C\beta^R$ отчетливо отличались от исходных по составу белков наружных клеточных мембран. У них отмечено значительное снижение экспрессии отдельных мембранных протеинов с молекулярными массами 18, 21, 27, 29 кДа и некоторое возрастание уровня продукции порина 39 кДа.

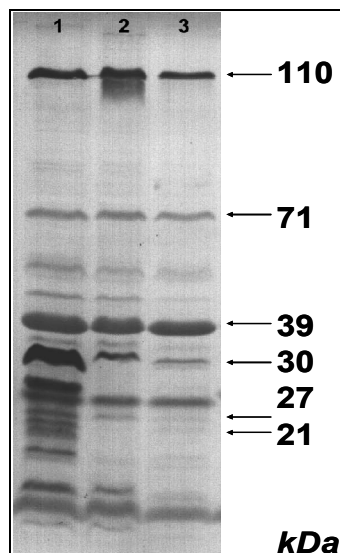


Рис. 4. Иммуноблоттинг белков наружной мембраны исходного и резистентных штаммов *B.cepacia*: 1 – 25416 W.t; 2 – 25416 SM Cfz; 3 – 25416 SM Pfx Cfz
Обозначения: как на рис. 1

При этом снижение уровня экспрессии отдельных мембранных белков более выраженным было у штамма, несущего маркеры множественной резистентности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, штаммы *B.cepacia* способны формировать множественную лекарственную устойчивость к широкому набору антимикробных препаратов с различными механизмами действия. В развитии резистентности множественного типа у этого микроорганизма принимают участие отдельные мажорные белки наружной мембраны, с которыми, по-видимому, связано изменение проницаемости клеточной оболочки для ряда ингибиторов.

ЛИТЕРАТУРА

- Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. // Мол. генет. микробиол. вирусол. – 2002. – № 2. – С. 7–11.
- Burns J.L., Wadsworth C.D., Barry J.J., et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 1996. – Vol. 40. – P. 307–313.
- Ciss M.F., Dian Y.D., Sow A.I., et al. // Dakar Med. – 1998. – Vol. 43. – P. 144–146.
- Difco manual. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Tenth edition. Difco laboratories, Detroit, Michigan 48232, USA. – 1984. – 1155 p.
- Gayet S., Chollet R., Molle G., et al. // Antimicrob. Agents Chemother. – 2003. – Vol. 47. – P. 155–159.
- Govan J.R.W., Hughes J.E., Vandame P. // J. Med. Microbiol. – 1996. – Vol. 45. – P. 395–407.
- Hancock R., Nikaido H. // J. Bacteriol. – 1978. – Vol. 136. – P. 381–390.
- Holmes A.Z., Govan J., Goldstein R. // J. Infect. Dis. – 1998. – Vol. 4. – P. 221–227.
- Laemmli U. K. // Nature. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
- Li X.Z., Nikaido H. // Drugs. – 2004. – Vol. 64. – P. 159–204.
- Liu M., Gonzalez J.E., et al. // Appl. Env. Microbiol. – 1998. – Vol. 64. – P. 4600–4602.
- Poole K. // Clin. Microbiol. Infect. – 2004. – Vol. 10. – P. 12–26.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – Vol. 76. – P. 4350–4354.