

УДК 52.815

ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ PSEUDOMONOS AERUGINOSA

Диц Е.В.

ГБОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия» Минздрава России,
Тюмень, e-mail: kozlov@tyumsma.ru, elenadic@yandex.ru

Установлена фенотипическая изменчивость *P. aeruginosa* в организме кроликов породы «шиншилла» и во внешней среде, проявляющаяся в изменении биологических свойств бактерий (переход бактерий из культивируемых форм в некультивируемые и наоборот – из некультивируемых форм – в культивируемые) и антибиотикорезистентности к антимикробным препаратам. Диаметр задержки роста к антибиотикам у некультивируемых бактерий был на $6,8 \pm 0,9$ мм меньше по сравнению с культивируемыми бактериями. Выявлена изменчивость *P. aeruginosa*, позволяющая сохранить возбудитель инфекционного заболевания как вид. Поэтому открываются новые возможности в совершенствовании эпидемиологического надзора за возбудителями инфекционных заболеваний, а именно, проведение мониторинга за возбудителями инфекционных заболеваний в некультивируемой форме.

Ключевые слова: фенотипическая изменчивость, культивируемые и некультивируемые бактерии, антибиотикорезистентность

THE STUDY OF THE PHENOTYPIC VARIABILITY OF PSEUDOMONOS AERUGINOSA

Ditz E.V.

GBOU VPO (State Educational Institution of the Professional High Education) «Tyumen State Medical Academy» Russian Ministry of Health, Tyumen, e-mail: kozlov@tyumsma.ru, elenadic@yandex.ru

The phenotypic variability of *P. aeruginosa* in «chinchilla» rabbits' bodies in the environment was proved by changes of the bacteria's biological properties (cultivated bacteria becoming uncultivated and vice versa) and by antibiotic resistance to germicides. The diameter of the delay of uncultivated bacteria's increase to antibiotics was $6,8 \pm 0,9$ mm less comparing with cultivated bacteria. The changeableness of *P. aeruginosa* that helps to save an agent of infection as species was found. That is why there are new possibilities to improve the epidemiological surveillance for agents of infection, to be exact, to monitor agents of infection in an uncultivated form.

Keywords: phenotypic variability, cultivated and uncultivated bacteria, antibiotic resistance

В микробных популяциях под влиянием экологических факторов формируется определенное количество бактерий с признаками анабиоза, они не культивируются в лабораторных условиях [1, 9, 10, 11]. Иногда даже значительное количество бактерий может переходить в жизнеспособное некультивируемое состояние [2, 3, 4, 5]. Это свойство бактерий можно рассматривать как своеобразную форму сохранения микроорганизма как вида.

Цель исследований – изучение мониторинга фенотипической изменчивости *P. aeruginosa* в связи с возникновением ИСМП.

Задачи

1. В опытах на кроликах породы шиншилла изучить мониторинг фенотипической изменчивости *P. aeruginosa*, проявляющейся в переходе культивируемых форм бактерий в некультивируемые и наоборот в зависимости от экологических условий окружающей среды.

2. Изучить антибиотикорезистентность культивируемых и некультивируемых бактерий *P. aeruginosa*.

3. Установить эпидемиологическую значимость некультивируемых форм *P. aeruginosa* в возникновении ИСМП.

Материалы и методы исследований

Экспериментальные исследования на кроликах породы шиншилла проведены на базе вивария ФГБОУ ВПО «Государственный аграрный университет Северного Зауралья». Под наблюдением находилось 26 кроликов. Здоровых животных массой 2500–3500 грамм содержали в клетках в соответствии с требованиями санитарных правил (Утв. Главным Государственным санитарным врачом № 1045-73). В виварии поддерживали температуру воздуха $24-26^{\circ}\text{C}$ в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 и требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, выводу их из эксперимента и последующей утилизации. Для изучения фенотипической изменчивости бактерий *P. aeruginosa* были взяты здоровые кролики с нормальными физиологическими показателями [6].

Под наблюдением находилось 2 группы животных. Одной группе животных вводили подкожно культивируемые бактерии *P. aeruginosa* и *S. aureus* в концентрациях 10^5 степени микробных клеток, а другой – некультивируемые бактерии *P. aeruginosa* и *S. aureus* в такой же концентрации.

Микробиологические исследования проводили по общепринятым методикам в соответствии с требованиями приказа МЗ РФ № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений». Идентифицировали бактерии, используя руководство Берджи [7], выделение некультивируемых бактерий проводили по методике, предложенной Л.Б. Козловым с соавт. [8]. В различные сроки инфекционного процесса кроликов вскрывали и определяли концентрацию культивируемых и некультивируемых бактерий *P. aeruginosa* в органах животных, а также определяли наличие бактерий *P. aeruginosa* в воздухе и на различных предметах вивария. Всего проведено 326 микробиологических исследований.

Для изучения микробной обсемененности внутренних органов животных использовали метод определения «бактерийного индекса» селезенки. После извлечения органа в асептических условиях его взвешивали на электронных лабораторных весах JW-1 высокого класса точности. На каждые 100 мг веса органа прибавляли 1 мл стерильного изотонического раствора NaCl и в стерильной ступке путем растирания получали основную взвесь тканей органов. Затем из основной взвеси делали ряд последовательных десятикратных разведений и 0,1 мл каждого разведения высевали на элективные, питательные среды. Через 24 часа роста бактерий при 37°C подсчитывали количество выросших колоний. Показателем «бактериального индекса» являлось среднее число выросших колоний, полученных после посева органов от нескольких животных, взятых в опыт.

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью компьютерной программы Statistika v 6.0, с использованием средней арифметической ошибки ($M \pm m$).

Результаты исследования и их обсуждение

На 8 день после инфицирования кроликов культивируемыми бактериями происходила транслокация бактерий *P. aeruginosa* в легочную ткань и печень. В легких определялись культивируемые бактерии в количестве $3,0 \pm 0,3 \cdot 10^3$, а в печени – $6,95 \pm 0,2 \cdot 10^4$ микробных клеток в 1 грамме ткани животного. В стадии реконвалесценции инфекционного заболевания в почках наблюдался переход культивируемых бактерий в некультивируемое состояние (табл. 1).

В период клинических проявлений болезни после инфицирования кроликов некультивируемыми бактериями наблюдался переход некультивируемых бактерий *P. aeruginosa* в культивируемое состояние. В печени животных на 2–6 сутки культивируемые бактерии *P. aeruginosa* определялись в количестве $7,3 \pm 1,4 \cdot 10^2$ микробных клеток в 1 грамме печени. В период реконвалесценции (на 8–21 день после заражения животных) из печени выделить культивируемые бактерии *P. aeruginosa* не удалось. В почках наблюдался переход культивируемых бактерий в некультивируемое состояние (табл. 2).

Таблица 1

Концентрация культивируемых и некультивируемых бактерий *P. aeruginosa* в почках животных в различные периоды инфекционного заболевания

Сроки обследования животных (в сутках)	Количество культивируемых бактерий	Количество некультивируемых бактерий
8	$4,6 \pm 0,1 \cdot 10^4$	0
9	$3,2 \pm 0,1 \cdot 10^3$	0
11–13	0	$24,1 \pm 12,2 \cdot 10^1$
21	0	$32,6 \pm 11,4 \cdot 10^3$

Примечание. 0 – бактерии не выделялись.

Таблица 2

Концентрация культивируемых и некультивируемых бактерий *P. aeruginosa* в почках животных в различные периоды инфекционного заболевания

Сроки обследования животных (в сутках)	Количество культивируемых бактерий	Количество некультивируемых бактерий
2	$2,0 \pm 0,3 \cdot 10^2$	0
6	$0,6 \pm 0,1 \cdot 10^2$	0
8	0	$22,3 \pm 10,7 \cdot 10^1$
21	0	$29,6 \pm 13,2 \cdot 10^2$

Примечание. 0 – бактерии не выделялись.

Через 21 день после проведения экспериментов на кроликах в виварии проведено исследование воздуха методом аспирации с использованием пробоотборного устройства ПУ-1Б и проведены смывы с различных предметов в виварии. Результаты исследований показали, что культивируемые бактерии в помещении вивария не определялись, а концентрация некультивируемых бактерий в воздухе достигала 10^1 , а на исследуемых поверхностях вивария достигала 10^3 микробных клеток в 1 мл смыва.

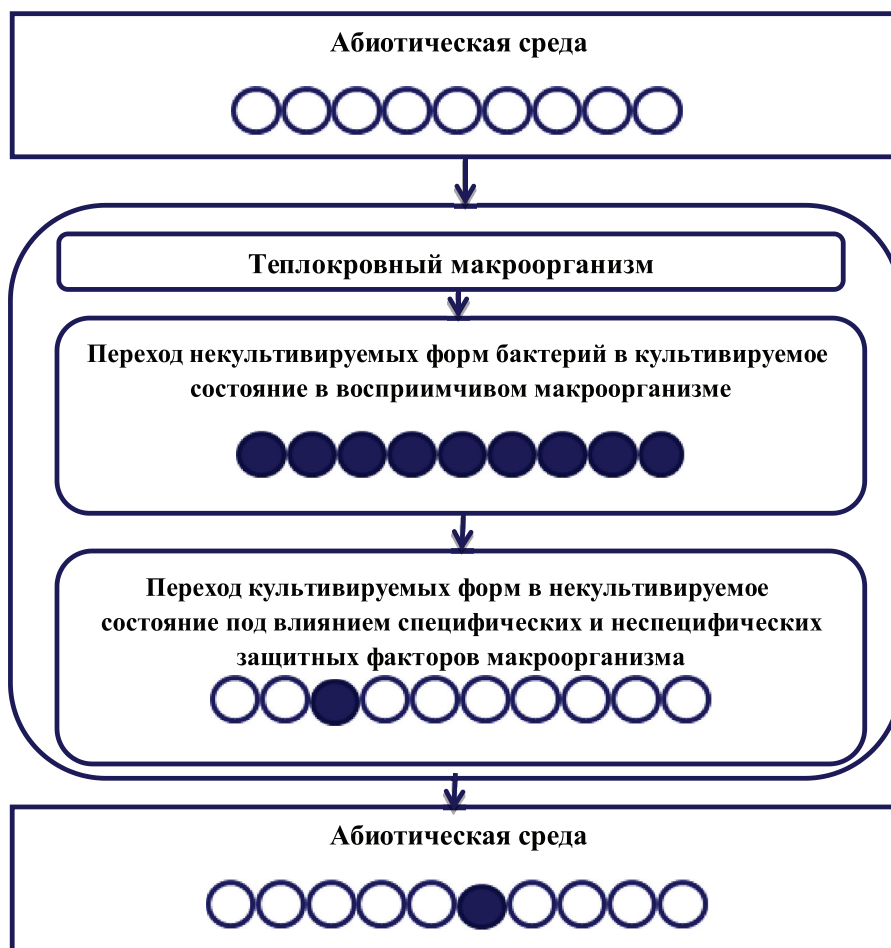
Проведенные исследования показали, что наблюдается фенотипическая изменчивость возбудителя инфекционного заболевания *P. aeruginosa*. В зависимости от экологических условий существования *P. aeruginosa* при микробиологических исследованиях определялись культивируемые и/или некультивируемые формы микроорганизма. Под влиянием защитных специфических и неспецифических факторов макроорганизма, а также при неблагоприятных условиях существования микроорганизма во внешней среде культивируемые

бактерии переходили в некультивируемое состояние, а при создании благоприятных условий для размножения в макроорганизме бактерии переходили в культивируемое состояние и вызвали развитие инфекционного процесса в организме кроликов. Выявленная фенотипическая изменчивость *P. aeruginosa* позволяет сохранить возбудитель инфекционного заболевания как вид в неблагоприятных условиях окружающей среды.

Наблюдаемые изменения фенотипической изменчивости *P. aeruginosa* можно представить в виде следующей схемы (рисунок).

Изучена антибиотикорезистентность культивируемых и некультивируемых бактерий *P. aeruginosa*, выделенных от больных с различными клиническими инфекционными заболеваниями, находя-

щихся на стационарном лечении в клиниках г. Тюмени. Под наблюдением находилось 116 больных. Использовали диски со следующими антибиотиками: ампициллин, имипенем, рифампицин, цефтриаксон и гентамицин. По результатам роста на среде Мюллера – Хинтона выделенных культур *P. aeruginosa* установлено, что имеются различия в диаметрах задержки роста бактерий к различным антибиотикам у культивируемых и некультивируемых бактерий. Диаметр задержки роста к антибиотикам у некультивируемых бактерий был на $6,8 \pm 0,9$ мм меньше по сравнению с культивируемыми бактериями. Различие в антибиотикорезистентности культивируемых и некультивируемых бактерий *P. aeruginosa* также свидетельствует о фенотипической изменчивости данного вида бактерий.



Принципиальная схема фенотипической изменчивости *P. aeruginosa* в зависимости от экологии возбудителя. Условные обозначения:



– Некультивируемые бактерии *P. aeruginosa*



– Культивируемые бактерии *P. aeruginosa*

Результаты проведенных микробиологических исследований показали, что между синегнойной палочкой и золотистым стафилококком наблюдался односторонний антагонизм. Поэтому условий для репродукции *S. aureus* не наблюдалось.

Заключение

Выявленная фенотипическая изменчивость *P. aeruginosa*, позволяющая сохранить возбудитель инфекционного заболевания как вид в неблагоприятных условиях существования, открывает новые возможности в совершенствовании эпидемиологического надзора за возбудителями инфекционных заболеваний, а именно проведение мониторинга за возбудителями инфекционных заболеваний по выявлению некультивируемых форм бактерий в макроорганизме и во внешней среде. Проведение эпидемиологического надзора за возбудителями инфекционных заболеваний с учетом их фенотипической изменчивости (переход культивируемых форм бактерий в некультивируемые и наоборот) позволит совершенствовать эпидемиологический надзор за ИСПП в ЛПУ.

Список литературы

1. Грузина В.Д. Коммукативные сигналы бактерий // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – Т. 48, № 10. – С. 32–39.
2. Назаров И.П., Винник Ю.С. Интенсивная терапия критических состояний. – Т. 2. – 2-е изд. – (лекционный курс). – Омск, 2002. – 336 с.
3. Пронина Е.А. Влияние электромагнитного излучения на частоте молекулярного спектра поглощения и излучения оксид азота на изменение активности супероксиддисмутазы бактерий // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2009. – Т. 5. – № 2.
4. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальная биопленка как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина // Микробиология. – 2011. – № 3. – С. 99–109.
5. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Цитокины – возможные активаторы роста патогенных бактерий // Вестник РАМН. – 2000. – № 1. – С. 13–18.
6. Бергхоф П.К. Мелкие домашние животные. Болезни и лечение. – М.: Аквариум, 1999. – 224 с.
7. Определитель бактерий Берджи: пер. с англ. – В 2-х т. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямс. – М.: Мир, 1997. – Т. 1. – 432 с.; Т. 2 – 368 с.
8. Способ выделения некультивируемых бактерий стафилококка: пат. 2470074 Рос. Федерации МПК C12Q 1/04 / Козлов Л.Б. с соавт.; заявитель и патентообладатель Козлов Л.Б., Санников А.Г. – № 2011146052/10; заявл. 14.11.2011; опубл. 20.12.2012, Бюл. № 35.
9. Образование «некультивируемых» клеток *Micobacterium tuberculosis* и их оживление / М.О. Шлеева,

Г.В. Мукамолова, М.В. Телков [и др.] // Микробиология. – 2003. – Т. 72. – № 1. – С. 76–83.

10. Волянський Ю.Л. Некультурабельний стан аспорогенних бактерій: теоретичні аспекти проблеми та її практична значущість // Інфекційні хвороби. – 2004. – № 1. – С. 5–9.

11. Тафельштейн Э.А. Экспериментальное получение некультивируемых форм *Vibrio cholerae* eeltor и характеристика их биологических свойств / Э.А. Тафельштейн, Е.П. Голубинский, А.С. Марамович [и др.] // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004. no. 1. – С. 13–18.

References

1. Gruzina V.D. Kommunikativnye signaly bakterij / V.D. Gruzina // Antibiotiki i himioterapija. 2003. T. 48, no. 10. pp. 32–39.
2. Nazarov I.P. Intensivnaya terapija kriticheskikh sostojanij. Tom 2. 2-e izd. (lekcionnyj kurs) / I.P. Nazarov, Ju.S. Vinnik // Omsk. 2002. 336 p.
3. Pronina E.A. Vlijanie jelektromagnitnogo izlucheniya na chastote molekuljarnogo spektra pogloshheniya i izlucheniya oksid azota na izmenenie aktivnosti superoksidismutazy bakterij / Saratovskij nauchno-medicinskij zhurnal. 2009. tom 5. no. 2.
4. Romanova Ju.M. Bakterijal'naja biopljonka kak estestvennaja forma sushhestvovaniya bakterij v okruzhajushhej srede i organizme hozjaina / Ju.M. Romanova, A.L. Gincburg // Zhurn. Mikrobiol. 2011. no. 3. pp. 99–109.
5. Romanova Ju.M. Citokiny vozmozhnye aktivatory rosta patogennykh bakterij / Ju.M. Romanova A.L. Gincburg // Vestnik RAMN. 2000. no. 1. pp. 13–18.
6. Berghof P.K. Melkie domashnie zhivotnye. Bolezni i lechenie // M. Akvarium, 1999. 224 p.
7. Opredelitel' bakterij Berdzh. V 2-h t. Per. s angl. / Pod red. Dzh. Houlta, N. Kriga, P. Snita, Dzh. Stejli, S. Uill'jams. M.: Mir, 1997. T. 1. 432 p.; T. 2 368 p.
8. Sposob vydeleniya nekul'tiviruemykh bakterij stafilocokka: pat.2470074 Ros. Federacii MPK C12Q 1/04/ Kozlov L.B. s soavt.; zajavitel' i patentoobladatel' Kozlov L.B., Sannikov A.G. no.2011146052/10; zajavl. 14.11.2011; opubl. 20.12.2012, Bjul. no. 35.
9. Obrazovanie «nekul'tiviruemykh» kletok *Micobacterium tuberculosis* i ih ozhivlenie / M.O. Shleeva, G.V. Mukamolova, M.V. Telkov [i dr.] // Mikrobiologija. 2003. T. 72. no. 1. pp. 76–83.
10. Voljans'kij, Ju.L. Nekul'turabel'nij stan asporogennih bakterij: teoretichni aspekti problemi ta ii praktichna znachushhist // Infekcijni hvorobi. 2004. no. 1. pp. 5–9.
11. Tafel'shtejn, Je.A. Jeksperimental'noe poluchenie nekul'tiviruemykh form *Vibrio cholerae* eeltor i harakteristika ih biologicheskikh svojstv / Je.A. Tafel'shtejn, E.P. Golubinskij, A.S. Maramovich [i dr.] // Zhurn. mikrobiol., jepidemiol. i imunobiol. 2004. no. 1. pp. 13–18.

Рецензенты:

Мальчевский В.А., д.м.н., главный научный сотрудник отдела протекторных механизмов репродуктивных систем криосферы, ФГБУН «Тюменский научный центр» СО РАН, г. Тюмень;

Разин М.П., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой детской хирургии, Кировская государственная медицинская академия, г. Киров.

Работа поступила в редакцию 02.02.2015.