

DOI <http://dx.doi.org/10.18551/rjoas.2016-07.01>

**АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ПОЛЕВЫХ ИЗОЛЯТОВ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЭКЗОТИЧЕСКИХ И
ДЕКОРАТИВНЫХ ВИДОВ ПТИЦ**
ANTIBIOTIC RESISTANCE OF FIELD ISOLATES OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA
ISOLATED FROM EXOTIC AND ORNAMENTAL BIRDS

Якимова Э.А., Лаишевцев А.И.*, Капустин А.В.

Yakimova E.A., Laishevtcev A.I., Kapustin A.V.

**Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной
ветеринарии имени Я.Р. Коваленко, Москва, Россия**

All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine
named after Y.R. Kovalenko, Moscow, Russia

Ленев С.В., Моторыгин А.В., Кутейникова Н.С.

Lenev S.V., Motorygin A.V., Kuteynikova N.S.

**Всероссийский государственный центр качества и стандартизации
лекарственных средств для животных и кормов, Москва, Россия**

All-Russian State Research Institute for Control Standardization and Certification
of Veterinary Preparations, Moscow, Russia

*E-mail: a-laishevtsev@bk.ru

АННОТАЦИЯ

В работе представлены результаты изучения антибиотикорезистентности полевых изолятов бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных от экзотических и декоративных видов птиц, в период 2014-2016 гг. Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности использования меропенема к качеству средства антибактериальной терапии синегнойной инфекции, ввиду абсолютной чувствительности всех изолятов к данному антибиотику. Помимо меропенема, изучаемые микроорганизмы обладали высокой чувствительностью в отношении сизомицина, тобрамицина, имипенема, азитромицина, норфлоксацина, пefлоксацина и цiproфлоксацина. Количество чувствительных изолятов к вышеперечисленным антибактериальным средствам колеблется в пределах 72,34-97,87%.

ABSTRACT

The paper presents results of a study of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* field isolates taken from exotic and ornamental birds during 2014-2016. The findings suggest that meropenem is a highly efficient antibiotic for therapy of *Pseudomonas* infection due to absolute sensitivity of isolates to the antibiotic. In addition to meropenem, revealed high sensitivity of isolates to sizomitsin, tobramycin, imipenem, azithromycin, norfloxacin, pefloxacin and ciprofloxacin. Number of isolates susceptible to the aforementioned antibacterial measures - 72,34-97,87%.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Множественная антибиотикоустойчивость, β -лактамазы, β -лактамы антибиотики, группа ферментов ESBL, металло- β -лактамазы.

KEY WORDS

Multiple antibiotic-resistant, β -lactamase, β -lactam antibiotics, ESBL enzymes, metallo- β -lactamase.

Псевдомонадная инфекция домашних декоративных птиц представляет большую опасность не только для жизни питомца, но для здоровья хозяина птицы. Возбудитель заболевания *Pseudomonas aeruginosa* не имеет определенной предрасположенности к

виду носителя, поэтому свободно может передаваться от птицы к человеку и наоборот. Степень тяжести развития и исход заболевания напрямую зависит от состояния здоровья птицы, вирулентных свойств возбудителя и своевременно принятых лечебных мер. В качестве основных лечебных мероприятий к данному заболеванию широко используется антибиотикотерапия, но при этом, наибольшая сложность, для ветеринарного врача, при подборе эффективного антибактериального препарата (АБП) возникает в тех случаях, когда возбудитель изначально имеет высокую устойчивость к большинству имеющихся средств, в частности для возбудителей рода *Pseudomonas spp.* [8, 9]. Устойчивость данных видов микроорганизмов к АБП обусловлена возможностью продуцирования ими ряда ферментов β -лактамаз. В соответствии с номенклатурой Международного биохимического общества β -лактамазы относятся к бактериальным ферментам, способные расщеплять β -лактамные антибиотики, имеющие в своей структуре циклическую амидную группу. Под действием β -лактамаз происходит гидролиз амидной группы, что приводит к подавлению антибактериального действия при применении данного препарата [10, 8]. В соответствии с актуальными научными данными β -лактамазы классифицируются в несколько крупных классов: гидролазы серинового типа - класс А, С, D и металлосодержащие гидролазы – класс В.

Класс А - бета-лактамазы расширенного спектра (*Extended spectrum β -lactamases* - *ESBL*). Данная группа ферментов, впервые описанная в 1983 году, является средством антибактериальной защиты от АБП в первую очередь для бактерий вида *Klebsiella pneumoniae*, в меньшей степени для *Pseudomonas aeruginosa*. Основными представителями ферментов группы *ESBL* являются TEM-1, TEM-2 и SHV-1, дальнейшее развитие множественной устойчивости у бактерий проявляется за счет мутационных изменений этих трех ферментов [1].

Класс В - металло- β -лактамазы (*metallo- β -lactamase* – *MBL*) являются металлосодержащими гидролазами содержащие атомы цинка в активном центре. Ферменты данной группы чаще всего встречаются у бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*, реже у других неферментирующих бактерий. Наиболее значимыми среди ферментов данной группы являются IPM, VIM и NDM [4,5,7].

Класс С – цефалоспорины являются хромосомно-кодируемыми ферментами (хромосомальные бета-лактамазы), наиболее распространенными у большинства видов бактерий семейства *Enterobacteriaceae* – *Proteus mirabilis* и *Morganella Morganii*, и некоторых неферментирующих бактерий, в частности *Pseudomonas aeruginosa*.

Класс D – включает в себя отдельные OXA карбапенемазы – ферменты, наибольшая активность которых наблюдается в отношении карбапенемов. Ферменты данной группы наиболее часто встречаются у микроорганизмов вида *Acinetobacter baumannii*, реже у некоторых видов семейства *Enterobacteriaceae*.

Как уже было сказано выше механизмы формирования антибиотикорезистентности *Pseudomonas aeruginosa* обусловлена выработкой ферментов класса В – металло-бета-лактамаз и класса А – бета-лактамаз расширенного спектра. Бактерии, продуцирующие металло-бета-лактамазы, проявляют устойчивость ко всем бета-лактамным антибиотикам, в том числе карбапенемам, фторхинолонам, аминогликозидам. Монобактамы остаются эффективными в отношении *MBL*. Штаммы бактерий, продуцирующие ферменты *ESBL* являются устойчивыми к пенициллинам, цефалоспорином, аминогликозидам, фторхинолонам. Продуцирование *ESBL* не вызывает устойчивости к цефамицинам, карбапенемам, монобактамам [2,3,6].

Целью исследований является изучения антибиотикорезистентности культур микроорганизмов вида *Pseudomonas aeruginosa* выделенных от экзотических и декоративных видов птиц содержащихся в домашних условиях в период 2014-2016 гг.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование проводилось на базе ФГБНУ «Всероссийского научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии имени Я.Р.

Коваленко» и Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина. Материалом для исследования послужили 47 изолятов *Pseudomonas aeruginosa* выделенные от волнистых попугаев, розелл, неразлучников, эклектусов, жако, ар, амазонов, какаду, корелл. В качестве клинического материала послужили мазки со слизистых оболочек зева и клоаки, взятые на транспортные системы со средой Амиеса. Среди птиц, от которых были выделены изоляты бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*, были особи, проявляющие различные клинические признаки заболевания и клинически здоровые особи. Выделение возбудителя происходила в результате комплексного бактериологического исследования, идентификация культур *Pseudomonas aeruginosa* проводилась на основании культуральных, морфологических и биохимических свойств с использованием коммерческого тест-набора НЕФЕРМтест 24 и Remel NF Plus. Определение антибиотикочувствительности проводили диско-диффузным методом (ДДМ) в соответствии с МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». Интерпретация результатов определения антибиотикочувствительности проводилась в соответствии с системой *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. В ходе выполнения работы применяли микроскопические, бактериологические, статистические методы исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение чувствительности полевых культур бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa* к антибактериальным препаратам позволило нам получить результаты приведенные в таблице 1.

Абсолютная резистентность культур *P. aeruginosa* была выявлена в отношении целого ряда групп антибактериальных препаратов, в том числе: амфениколов (хлорамфеникола), линкозамидов (клиндамицина и линкомицина), макролидов (кларитромицина, рокситромицина, тилозина, олеандомицина и эритромицина), нитроимидазолов (метронидазола), полусинтетических и природных пенициллинов (амоксиклава, амоксициллина, ампициллина, нафциллина, оксациллина, и пенициллина), фторхинолонов (лемефлоксацина), цефалоспоринов (цефазолина, цефалексина, цефуроксима, цефиксима) и сульфаниламидов (ко-тримоксазола). Полученные результаты подтверждают общепринятое мнение о неэффективности данных АБП для лечения синегнойной инфекции.

Анализ полученных нами данных свидетельствует о низкой эффективности канамицина и неомицина, в отношении изучаемого возбудителя, ввиду того, что количество чувствительных к ним изолятов равно нулю. Данный факт изначально указывается производителем, но при этом не отрицается возможность получения промежуточных значений при определении антибиотикочувствительности. Так в нашем случае для канамицина 59,57%, а для неомицина 63,83% изучаемых изолятов имели промежуточное значение при определении чувствительности, но по нижней границе. Сизомицин и тобрамицин входящие в группу аминогликозидов, в отличие от канамицина и неомицина имеют значительную активность в отношении *P. aeruginosa*, так 97,87% изолятов были чувствительны к сизомицину и 95,74% к тобрамицину, к которому оказался резистентным один изолят.

Чувствительность к группе карбапенемов, представленными имепенемом и меропенемом, у исследуемых культур имело высокие значения. К имепенему оказалось чувствительно 97,87% культур, при этом 1 изолят оказался резистентным, к меропенему были чувствительны 100% изолятов.

Как уже было указано выше, большинство препаратов из группы макролидов оказались неэффективны в отношении *P. aeruginosa*, но исключением стал азитромицин. К данному препарату чувствительность проявилась у 72,34% культур, остальные 27,66% имели умеренную чувствительность.

Исключением из группы пенициллинов стал карбенициллин к которому из 47 изолятов 1 культура оказалась чувствительна, что составляет всего 2,13%,

промежуточной чувствительностью обладали 27,66%, и абсолютная резистентность была выявлена у 70,21% культур. К полимиксину оказались чувствительны и промежуточно чувствительными 57,45% и 42,55% изолятов соответственно.

Из антибактериальных препаратов группы тетрациклинов, представленных доксициклином и тетрациклином, лишь 8 культур были чувствительны к тетрациклину, что составило 17,02%.

Таблица 1 – Результаты определения антибиотикочувствительности изолятов *Pseudomonas aeruginosa*

Группа	Антибиотик	Обозначение	Количество устойчивых штаммов	Процентное соотношение	Количество промежуточно чувствительных штаммов	Процентное соотношение	Количество чувствительных штаммов	Процентное соотношение
Аминогликозиды природные	Канамицин	K30	19	40,43	28	59,57	0	0,00
	Неомицин	N30	17	36,17	30	63,83	0	0,00
	Сизомицин	SS10	0	0,00	1	2,13	46	97,87
	Тобрамицин	TOB10	1	2,13	1	2,13	45	95,74
Амфениколы	Хлорамфеникол	C30	47	100,00	0	0,00	0	0,00
Карбапенемы	Имипенем	IMP10	1	2,13	0	0,00	46	97,87
	Меропенем	MRP10	0	0,00	0	0,00	47	100,00
Линкозамиды полусинтетические	Клиндамицин	CD10	47	100,00	0	0,00	0	0,00
Линкозамиды природные	Линкомицин	L15	47	100,00	0	0,00	0	0,00
Макролиды полусинтетические	Азитромицин	AZM15	0	0,00	13	27,66	34	72,34
	Кларитромицин	CLR15	47	100,00	0	0,00	0	0,00
	Рокситромицин	RO30	47	100,00	0	0,00	0	0,00
	Тилозин	TL15	47	100,00	0	0,00	0	0,00
Макролиды природные	Олеандомицин	OL15	47	100,00	0	0,00	0	0,00
	Эритромицин	E15	47	100,00	0	0,00	0	0,00
Нитроимидазолы	Метронидазол	MT5	47	100,00	0	0,00	0	0,00
Пенициллины полусинтетические	Амоксиклав	AMC30	47	100,00	0	0,00	0	0,00
	Амоксициллин	AMX30	47	100,00	0	0,00	0	0,00
	Ампициллин	AMP10	47	100,00	0	0,00	0	0,00
	Карбенициллин	CB100	33	70,21	13	27,66	1	2,13
	Нафциллин	NAF1	47	100,00	0	0,00	0	0,00
	Оксациллин	OX1	47	100,00	0	0,00	0	0,00
Пенициллины природные	Пенициллин	P10	47	100,00	0	0,00	0	0,00
Полимиксины	Полимиксин	PB300	0	0,00	20	42,55	27	57,45
Сульфаниламиды	Ко-тримоксазол	COT25	47	100,00	0	0,00	0	0,00
Тетрациклины	Доксициклин	DO30	39	82,98	8	17,02	0	0,00
	Тетрациклин	TE30	17	36,17	22	46,81	8	17,02
Фторхинолоны 2 поколения	Ломефлоксацин	LOM15	47	100,00	0	0,00	0	0,00
	Норфлоксацин	NX10	1	2,13	0	0,00	46	97,87
	Пефлоксацин	PEF5	0	0,00	13	27,66	34	72,34
	Ципрофлоксацин	CIP10	1	2,13	0	0,00	46	97,87
Фторхинолоны 3 поколения	Энрофлоксацин	ENR5	32	68,09	15	31,91	0	0,00
Цефалоспорины 1 поколения	Цефазолин	CZ30	47	100,00	0	0,00	0	0,00
	Цефалексин	CN30	47	100,00	0	0,00	0	0,00
Цефалоспорины 2 поколения	Цефуросим	CXM30	47	100,00	0	0,00	0	0,00
Цефалоспорины 3 поколения	Цефиксим	CFM5	47	100,00	0	0,00	0	0,00
	Цефоперазон	CPZ75	44	93,62	3	6,38	0	0,00
	Цефтриаксон	CTR30	0	0,00	38	80,85	9	19,15

Определение антибиотикочувствительности к фторхинолонам позволило определить наиболее эффективные средства. Так, к норфлоксацину и ципрофлоксацину оказались чувствительны по 97,87% изолятов, при этом в обоих случаях было выявлено по одному резистентному возбудителю. Чувствительность к пефлоксацину наблюдалась у 72,34%, а промежуточная чувствительность у 27,66%

культур. Преобладающее количество изолятов *P. aeruginosa* оказалось резистентны к энрофлоксацину - 68,09%, остальные 31,91% имели промежуточную чувствительность.

Из группы цефалоспоринов наименее эффективным оказался цефоперазон к которому 93,62% исследуемых изолятов оказались резистентны. К цефтриаксону наибольшее количество культур имели промежуточную чувствительность, что составляет - 80,85%, остальные 19,15% явились чувствительными к данному препарату.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ результатов определения антибиотикочувствительности 47-ми полевых изолятов микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных от декоративных и экзотических птиц содержащихся в домашних условиях, позволил определить, что стопроцентной чувствительностью культуры обладали в отношении к меропенему группы карбапенемов. При этом 46 из 47 изолятов также проявили высокую чувствительность и к имепенему, что составило 97,87%, но при этом 1 изолят был абсолютно резистентен к данному АБП. Помимо группы карбапенемов высокой активностью в отношении культур *P. aeruginosa* обладали аминогликозиды (сизомицин - 97,87, тобрамицин - 95,74%), фторхинолоны (норфлоксацин - 97,87%, ципрофлоксацин - 97,87%, пefлоксацин - 72,34%), макролиды (азитромицин - 72,34%), в остальных случаях количество чувствительных культур не превышало 60%.

Абсолютная резистентность возбудителя синегнойной инфекции была выявлена в отношении хлорамфеникола, клиндамицина, линкомицина, кларитромицина, рокситромицина, тилозина, олеандомицина, эритромицина, метронидазола, амоксиклава, амоксициллина, ампициллина, нафциллина, оксациллина, пенициллина, ко-тримоксазола, ломефлоксацина, цефазолина, цефалексина, цефуроксима, цефиксима, что в свою очередь является подтверждением имеющихся научных данных.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Arakawa Y. Convenient test for screening metallo- β -lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds / Y. Arakawa, N. Shibata, K. Shibayama // Journal of Clinical Microbiology 2000; 6:40-43.
2. Bush K., Jacoby G., Medeiros A. Functional classification scheme for b-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1211-33.
3. Du Bois S.K., Marriott M.S., Amyes S.G. TEM- and SHV-derived extended-spectrum b-lactamases: relationship between selection, structure and function. J Antimicrob Chemother 1995; 35:7-22.
4. Lee K. et al Evaluation of Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. // Journal of Clinical Microbiology 2003; 10:4623-4629.
5. Lee K. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing stains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species / K. Lee, Y. Chong, H. B. Shin // Clinical Microbiology and Infection 2001; 7:88-102.
6. Livermore D.M. b-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microb Reviews 1995; 8:557-84.
7. Migliavacca R. Simple microdilution test for detection of metallo- β -lactamase-producing in *Pseudomonas aeruginosa* / R. Migliavacca, J. D. Docquier, C. Mugnaioli // Journal of Clinical Microbiology 2002;.11:4388-4390.
8. Антибиотикорезистентность музейных штаммов бактерий рода *Klebsiella* spp. / Лаишевцев А.И., Ленёв С.В., Капустин А.В., Пименов Н.В., Якимова Э.А. // Ветеринария, зоотехния и биотехнология 2016;. 5:38-45.
9. Сидоренко С.В. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам / С.В. Сидоренко, В.И. Тишков // Успехи биологической химии 2004; 44:263-306.
10. Яковлев С.В. Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* к карбапенемам: уроки исследования MYSTIC // Фарматека 2007; 8/9:56-62.