

5. Babor B. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New Engl. J. Med.* 1978; 289:659–68.
6. Beaman B., Black C., Doughty F., et al. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* 1985; 47:135–41.
7. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1971; 44:276–87.
8. Beyer W., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 1987; 161:559–66.
9. Brot N., Weissbach L., Werth J., et al. Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981; 78:2155–58.
10. Burrows T., Farrel J., Gillett W. The catalase activity of *Pasteurella pestis* and other bacteria. *Br. J. Exp. Pathol.* 1964; 45:579–88.
11. Cohen H. The use of diaminobenzidine for spectrophotometric and acrylamide gel detection of sulfite oxidase and its applicability to hydrogen peroxide-generating enzymes. *Anal. Biochem.* 1973; 53:208–22.
12. Davis B. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1964; 121:404–27.
13. Fridovich I. Oxygen radicals, hydrogen, peroxide and oxygen toxicity. In: W.A. Prior, editor. *Free radicals in biology*. New York: Academic Press; 1976. p. 239–277.
14. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science.* 1978; 201:875–80.
15. Garcia E., Nedialkov Y., Elliott J., et al. Molecular characterization of KatY (Antigen 5), a thermoregulated chromosomally encoded catalase-peroxidase of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 1999; 181(10):3114–22.
16. Gregory E., Fridovich I. Visualization of catalase in acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1974; 58:57–62.
17. Hollstein M., Brooks P., Linn S., et al. Hydroxymethyluracil DNA glycosylase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984; 81:4003–7.
18. Mandell G. Catalase, superoxide dismutase and virulence in *Staphylococcus aureus*: *in vitro* and *in vivo* studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. *J. Clin. Invest.* 1975; 55:561–66.
19. Marcheva D., Nicolova S., Veljanov D. О распространении каталазной активности у бактерий рода *Yersinia*. Докл. Болг. АН. 1988; 41(3):57–60.
20. Mead J. Free radical mechanism of lipid damage and consequences for cellular membranes. In: W.A. Prior, editor. *Free radicals in biology*. New York: Academic Press; 1976. P. 51–68.
21. Mehig R., Brubaker R. Major stable peptides of *Yersinia pestis* synthesized during the low-calcium response. *Infect. Immun.* 1993; 61(1):13–22.
22. Raymond S. Acrylamide gel electrophoresis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1964; 121:350–65.
23. Rockenmacher M. Relationship of catalase activity to virulence in *Pasteurella pestis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1949; 71:99–101.
24. Selander R., Caugant D., Ochman H., et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986; 51:873–84.
25. Vassilyadi M., Archibald F. Catalase, superoxide dismutase and production of O₂-sensitive mutants of *Bacillus coagulans*. *Can. J. Microbiol.* 1985; 31:994–99.

N.A. Vidyayeva, A.V. Gaeva, L.M. Koukleva, G.N. Odinokov, V.V. Kuttyrev

Comparative Characteristics of Antioxidative Enzymes of *Yersinia pestis* Strains of Different Subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* Strains

Russian Anti-Plague Research Institute "Micrbe", Saratov

Comparative electrophoretic investigation was carried out to study antioxidative enzymes (superoxide dismutase, catalase and peroxidase) in strains of *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. It was shown that *Yersinia* antioxidative enzymes are different from *E. coli* and *S. typhimurium* enzymes in electrophoretic motility. Their expression depends on cultivation temperature and plasmid content. Peculiarities of catalase-peroxidase expression were determined in strains of plague etiological agent of Ulejei subspecies, in strains of pseudotuberculosis etiological agent of IV serovar and in strains isolated from humans.

Key words: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, antioxidative enzymes, superoxide dismutase, catalase, peroxidase.

Поступила 12.03.08.

УДК 576.851.132:616.982.27-033

Е.В.Калинкина, Н.П.Агеева, О.А.Мерина, Д.А.Лобойко, Д.В.Викторов, Л.К.Мерина

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУТАНТОВ ПАТОГЕННЫХ *BURKHOLDERIA*, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ФТОРХИНОЛОМ И ЦЕФАЛОСПОРИНАМ

ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»

Исследованы фенотипические свойства мутантов филогенетически родственных патогенных видов *Burkholderia* (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia*), резистентных к фторхинолонам и цефалоспорином. Показано, что штаммы с маркерами Pfx^R (Ofx^R), Cfz^R приобретают перекрестную устойчивость множественного типа к антибиотикам различных классов. Резистентность штаммов изменяется под действием от блокирующего влияния ингибитора кальциевых мембранных каналов – верапамила. Мутантные штаммы отличаются по продукции внеклеточных ферментов (протеаз, лецитиназы, липазы) и вирулентностью.

Ключевые слова: *Burkholderia*, антибиотикорезистентность, мутанты, фторхинолоны, цефалоспорины, фенотипические свойства, верапамил.

Возбудители мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) и сапа (*Burkholderia mallei*), а также являющиеся оппортунистическими патогенами микроорганизмы комплекса *Burkholderia cepacia* составляют группу филогенетически родственных видов [3, 8].

Наряду с общностью и клинической значимостью, эти микроорганизмы характеризуются высокой природной резистентностью к антибактериальным

препаратам, включающим широкий спектр антибиотиков различных классов [1, 2].

Способность всех трех видов быстро повышать антибиотикорезистентность в процессе лечения ограничивает выбор эффективных лекарственных средств и создает серьезные трудности при химиотерапии заболеваний, вызываемых буркхольдериями [2, 5, 7].

Экспериментальной моделью для изучения механизмов лекарственной устойчивости этих видов могут служить штаммы с измененной чувствительностью к антибиотикам, которые в настоящее время используются для лечения. Обычно мутанты с направленно селекционированными маркерами устойчивости (или чувствительности) к определенным ингибиторам несут ряд дополнительных признаков, изучение которых позволяет определять основные закономерности развития резистентности и осуществлять выбор штаммов, необходимых для исследования ее молекулярно-генетической природы.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании фенотипов мутантных штаммов родственных видов *Burkholderia* (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia*) с измененной чувствительностью к препаратам ряда цефалоспоринов и фторхинолонов и в оценке влияния на резистентность блокатора кальциевых мембранных каналов – верапамила.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы *B. pseudomallei* 56770 и 57576, *B. mallei* Ц-5н, *B. cepacia* 25416, 8235 дикого типа и их мутанты, отобранные в результате направленной селекции клонов, резистентных к фторхинолонам (пемфоксацину, офлоксацину) и цефалоспорином (цефтазидиму). Минимальные подавляющие концентрации пемфоксацина («LEK Pharmaceutical», Словения), офлоксацина («Хехст Мэрион Руссель Лтд.», Индия), цефтазидима («Glaxooperations», Англия) и других антибиотиков отечественного производства определяли методом стандартных серийных разведений на плотных питательных средах.

Культуры выращивали на L-агаре и L-бульоне («Difco», США) при температуре 32 °С. Продукцию внеклеточных ферментов (протеаз, лецитиназы, липазы) исследовали на средах с добавками необходимых субстратов [4].

Для оценки влияния на резистентность штаммов блокатора кальциевых мембранных каналов культуры ($1 \cdot 10^2$ м.к.) высевали на плотные питательные среды с добавками антибиотиков и верапамила – 25 мкг/мл, или не содержащие его [6, 7]. Штаммы инкубировали 48 ч, после чего учитывали количество жизнеспособных клеток.

Определение вирулентных свойств проводили на модели одноклеточного организма *Paramecium caudatum*. Инфузории выращивали в сенном настое в течение недели. Взвеси 18-часовых культур микроорганизмов в концентрации $1 \cdot 10^7$ м.к./мл соединяли в равных объемах (500 мкл) с культурой парамеций на предметном стекле с лункой. Взвесь изолировали с помощью покровного стекла, фиксированного вазелиновым маслом. Время гибели простейших наблюдали при световой микроскопии препаратов, начиная от контакта с культурами бактерий до полного прекращения подвижности инфузорий. Вирулентность

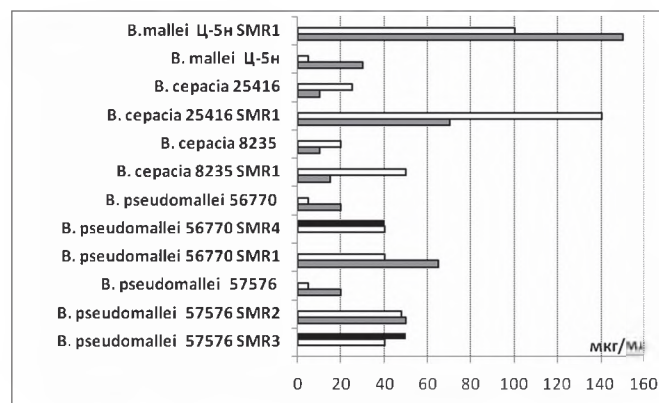


Рис. 1. Показатели антибиотикорезистентности SMR-мутантов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. cepacia*:

■ – пемфоксацин; ■ – офлоксацин; □ – цефтазидим

характеризовали по времени гибели 100 % клеток простейших.

Результаты и обсуждение

Мутантные штаммы *Burkholderia*, использованные в работе и обозначенные как штаммы SMR-типа, имели два селектированных маркера резистентности Pfx^R (Ofx^R), Cfz^R в различной последовательности и отличались устойчивостью к пемфоксацину (офлоксацину) и цефтазидиму, превышающей уровень ее у исходных штаммов в 3–5 раз и более, в зависимости от типа резистентности и вида микроорганизма (рис. 1).

Было отмечено, что у *B. cepacia* быстрее, чем у двух других видов, формировалась устойчивость к цефтазидиму, которая сохранялась на высоком уровне, тогда как у *B. pseudomallei* и *B. mallei* наиболее стабильно проявлялся фенотип резистентности к фторхинолонам.

Определение у мутантов, резистентных к пемфоксацину, офлоксацину и цефтазидиму перекрестной устойчивости показало, что все SMR-штаммы *B. cepacia* приобретали дополнительную устойчивость к трем препаратам с различным механизмом действия (ампициллину, хлорамфениколу, тетрациклину), но практически не изменяли резистентности к антибиотикам ряда аминогликозидов. Что касается перекрестной резистентности SMR-мутантов возбудителя мелиоидоза, то у них происходило некоторое варьирование ее в зависимости от исходного штамма и первоначального маркера, однако во всех случаях наблюдалось заметное повышение устойчивости, прежде всего к хлорамфениколу и ампициллину и в меньшей степени к тетрациклину и препаратам ряда аминогликозидов. Подобным образом формировалась перекрестная устойчивость и у мутантных штаммов *B. mallei*.

Мутанты *Burkholderia*, устойчивые к фторхинолонам и цефалоспорином, обнаружившие при этом множественный характер резистентности, исследовали далее на способность к продукции некоторых внеклеточных ферментов (лецитиназы, протеазы,

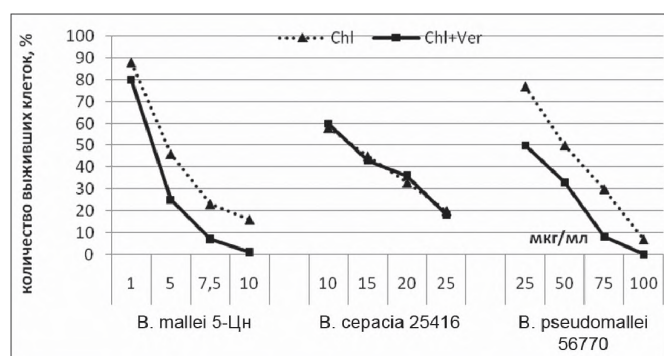


Рис. 2. Динамика изменения резистентности диких штаммов *Burkholderia* к хлорамфениколу под влиянием верапамила

липазы), используя ее как тест для косвенной оценки возможных изменений в проницаемости клеточной стенки микроорганизмов, имеющей отношение к формированию резистентности. С этой же целью определяли влияние на уровень устойчивости штаммов верапамила – блокатора кальциевых мембранных каналов [6, 7].

Изучение активности внеклеточных ферментов показало, что штаммы *B. cepacia* и *B. pseudomallei* с маркерами Pfx^R (Ofx^R) и Cfz^R отличались от исходных, прежде всего повышенной способностью к гидролизу протеинов молока, которая у *B. cepacia* 8235 SMR1 ($Pfx^R Cfz^R$) и 8235 SMR2 ($Cfz^R Pfx^R$) сопровождалась потерей твин-эстеразной активности. Исключением являлись мутанты *B. pseudomallei* 56770 SMR4 ($Ofx^R Cfz^R$); у них практически отсутствовала протеазная активность, и были существенно снижены функции как твин-эстеразы, так и лецитиназы.

Влияние верапамила оценивали по изменению устойчивости штаммов *Burkholderia* к ряду препаратов, включая препараты, использованные при получении мутантов. При этом наблюдали сходную, вне зависимости от выбранного антибиотика, динамику изменений (приводятся данные по определению устойчивости к одному из них – хлорамфениколу).

Как показано на рис. 2, верапамил в наименьшей степени оказывал воздействие на исследованный тип резистентности дикого штамма *B. cepacia* 25416. Кривые ингибирования роста клеток этим антибиотиком как без, так и в присутствии блокатора находились достаточно близко, так что расхождение в количестве колоний составляло менее 5 процентов. В отличие от этого, у диких штаммов *B. pseudomallei* 56770 и *B. mallei* Ц-5н в присутствии верапамила наблюдалось отчетливое снижение устойчивости, проявляющееся в уменьшении числа жизнеспособных клеток на 20–40 %.

Что касается полирезистентных штаммов *B. cepacia* и *B. pseudomallei*, то показатели их выживаемости при наличии в среде хлорамфеникола вместе с верапамилем могли как повышаться, так и понижаться (рис. 3). В частности, установлено, что на среде с верапамилем штаммы *B. cepacia* 25416 SMR1 и SMR116 снижают резистентность к хлорамфениколу,

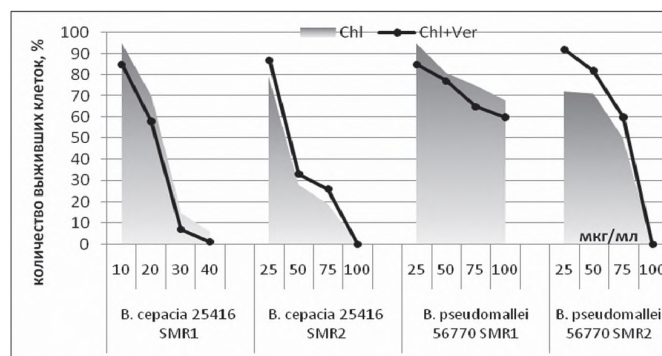


Рис. 3. Показатели резистентности SMR-мутантов *Burkholderia* в присутствии верапамила: SMR1 – $Pfx^R Cfz^R$; SMR2 – $Cfz^R Pfx^R$

тогда как штаммы 25416 SMR2 и SMR111 отчетливо повышают ее.

Сходная картина динамики выживаемости в присутствии блокирующего агента наблюдалась и у резистентных штаммов *B. pseudomallei*, а именно, некоторые из них на среде с верапамилем проявляли повышенную устойчивость, тогда как выживаемость других при его воздействии имела явную тенденцию к снижению. В отличие от них, резистентные штаммы *B. mallei* в присутствии верапамила, как правило, демонстрировали лишь снижение устойчивости.

Известно, что штаммы бактерий с повышенной резистентностью нередко характеризуются изменением (чаще снижением) вирулентных свойств. Для характеристики этого признака у полученной группы мутантов мы использовали модель одноклеточного организма *Paramecium caudatum*, позволяющую быстро тестировать множество клонов. При этом установили, что среди полирезистентных штаммов всех трех видов *Burkholderia* есть штаммы как снизившие вирулентность по сравнению с диким типом, так и штаммы, сохранившие ее на исходном уровне или несколько отличающиеся от него.

Данные по предварительной оценке вирулентности на инфузориях были подтверждены результатами определения фитопатогенности у *B. cepacia* и коррелировали с показателями вирулентности резистентных штаммов *B. pseudomallei* для белых мышей.

Таким образом, изучение фенотипов SMR-мутантов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia* с маркерами устойчивости к фторхинолонам и цефалоспорином показало, что их резистентность носит множественный характер. Возможно, что в развитии ее принимают участие белки наружной мембраны, в частности, протеины кальциевых мембранных каналов, которые, не являясь строго специфичными для транспорта антибиотиков, тем не менее оказывают влияние на динамические процессы снижения мембранной проницаемости или увеличения транспорта ингибитора вовне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пушкарева В.И., Величко В.В., Каминская А.А. *Burkholderia cepacia* в разных экологических условиях: числен-

ность и изменчивость бактериальной популяции. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 3:39–44.

2. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Бактерии комплекса *Burkholderia cepacia*: особенности диагностики, организации генома и метаболизма. Мол. генет. микробиол. вирусол. 2003; 2:7–11.

3. Coenye T., Vandamme P. Environ. Microbiol. 2003; 5:719–29.

4. Difco manual. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Detroit Michigan; 1985. 1155 p.

5. Gibson R.L., Burns J.L., Ramsey B.W. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003; 168:918–51.

6. Moore R.A., DeShazer D., Reckseidler S. Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43:465–70.

7. Moore R.A., Woods D.E. In: International Congress on Melioidosis Proceeding. Bangkok; 1998. p. 157.

8. Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., et al. Microbiol. Immunol. 1992; 36:1251–75.

E.V.Kalinkina, N.P.Ageeva, O.A.Merinova, D.A.Loboiko,
D.V.Viktorov, L.K.Merinova

Phenotypic Peculiarities of Pathogenic *Burkholderia* Mutants Resistant to Fluoroquinolones and Cephalosporins

Volgograd Anti-Plague Research Institute

Examined were phenotypic peculiarities of mutants of *Burkholderia* phylogenetically-related pathogenic species (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia*) resistant to fluoroquinolones and cephalosporins. It was shown that strains with Pfx^R (Ofx^R), Cfz^R markers acquire high multi-drug resistance to antibiotics of different classes. Strain resistance changes under blocking influence of verapamil – inhibitor of calcium membrane channels. Mutant strains differ in production of extracellular enzymes (proteases, lecithinase, lipase) and virulence.

Key words: *Burkholderia*, drug resistance, mutants, fluoroquinolones, cephalosporins, phenotypic peculiarities, verapamil.

Поступила 21.03.08.

УДК 616.981.452:576.809.33

Т.Н.Щуковская, С.Н.Клюева, А.Л.Кравцов, О.А.Волох, Ю.А.Алешина, В.В.Кутырев

ВЛИЯНИЕ БИОГЕННОГО АМИНА СЕРТОНИНА НА РОСТ И ПРОФИЛЬ БЕЛКОВ ЧУМНОГО МИКРОБА В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПЛОТНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Получены новые сведения о стимулирующем влиянии биогенного амина серотонина на рост чумного микроба. С применением серотонина разработан способ выделения *Yersinia pestis* бактериологическим методом из исследуемого материала, контаминированного сопутствующей микрофлорой, включая объекты внешней среды, позволяющий сократить до 24 часов сроки биологического накопления возбудителя чумы и увеличить число колониеобразующих единиц (КОЕ) чумного микроба. Выявлен ингибирующий эффект серотонина на синтез полипептида с молекулярной массой 22 кДа в условиях культивирования на агаре Хоттингера (pH 7,2) при 28 °C в течение 24 ч.

Ключевые слова: *Y. pestis*, серотонин, объекты внешней среды, рост, электрофоретический профиль белков.

В настоящее время интенсивно ведутся исследования, направленные на изучение триггерных молекулярных механизмов взаимодействия патогена с организмом хозяина, в том числе возможности использования микроорганизмами для ускорения собственного развития эндогенных биологически активных веществ (нейрогормонов) макроорганизма. Формируется новое междисциплинарное направление – микробная эндокринология, изучающая фундаментальные и прикладные аспекты нейроэндокринной регуляции взаимодействия про- и эукариот [12].

Установлено, что бактерии имеют фрагменты молекул, аналогичные связывающим сайтам некоторых естественных физиологически активных веществ организма хозяина, таких как инсулин, гонадотропин, кальмомодулин. Выявлен стимулирующий эффект стрессорных гормонов на рост патогенных штаммов *Escherichia coli*, показана зависимость транскрипции генов, кодирующих секрецию III типа и синтез флагелл, у энтерогеморрагических и энтеротоксигенных *E. coli* от эпинефрина (адреналина) и норэпинефрина (норадреналина), синтезируемых в клетках хозяина [6].

В этой связи, большой интерес представляет серотонин (5-окситриптами), принадлежащий к

группе биогенных аминов: азотистых оснований, возникающих в организме при декарбоксилировании аминокислот и обладающих чрезвычайно сильной активностью, благодаря высокой способности их к конформационным изменениям, к соединению с макромолекулами, к переносу электронов и протонов. Серотонин является нейромедиатором, медиатором воспаления и аллергических реакций, одним из компонентов сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, обладает выраженным иммуномодулирующим действием, способен комплексовать с ДНК про- и эукариот, с нуклеозидами и нуклеотидами, ингибировать процессы перекисного окисления липидов в клеточных мембранах, непосредственно взаимодействуя с перекисными радикалами [2, 4, 7, 8].

Установлено, что серотонин ускоряет рост культур *E. coli*, *Rhodospirillum rubrum*, *Candida guilliermondii*, *Streptococcus faecalis*, вызывая сокращение лаг-фазы, стимулирует формирование биопленки у *E. coli* и плодовых тел у миксобактерий [5]. Комбинация антибиотиков с психотропными препаратами – селективными ингибиторами транспорта серотонина через ионный канал, приводит к появлению чувствительности у полиантибиотикорезистентных штаммов [13].