

Мультирезистентные штаммы *Pseudomonas* spp., обнаруженные на детских площадках г. Пущино

¹Измалкова Т.Ю., ¹Сазонова О.И., ^{1,2} Дымова Е.А., ^{1,2}Винникова К.С., ¹Гафаров А.Б.,
¹Соколов С.Л., ¹Кошелева И.А.

¹ ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
²ПущГЕНИ; tatiz@ibpm.pushchino.ru

К настоящему времени накоплены многочисленные факты, свидетельствующие о том, что интенсивное использование антибиотиков неизбежно приводит к возникновению и распространению устойчивых к ним штаммов бактерий. За последние 20 лет мультирезистентные штаммы практически полностью вытеснили штаммы, устойчивые только к одному антибиотику. Возникновение патогенов с множественной лекарственной устойчивостью все чаще ставит под угрозу успешное лечение бактериальных инфекций и является глобальной проблемой в области здравоохранения, решение которой требует эффективных действий. Особой опасности подвергаются дети, поскольку их иммунная система ещё до конца не сформирована. В 2001 году Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) опубликовала глобальную стратегию по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам. Устойчивость к антибиотикам возникла у почвенных бактерий как защитный механизм миллионы лет назад, поэтому распространение резистентных патогенных микроорганизмов в клинике не может рассматриваться отдельно от процессов циркуляции детерминант устойчивости к антибиотикам в природных экосистемах. Именно неклиническим микроорганизмам принадлежит основная роль в поддержании и распространении генов антибиотикорезистентности в окружающей среде путем горизонтального переноса. Особый интерес представляют почвенные штаммы псевдомонад, поскольку, обладая сами по себе низкой вирулентностью, они могут эффективно передавать детерминанты резистентности таким опасным госпитальным патогенам, как *P. aeruginosa*. Общественные детские площадки - это место прямого контакта ребёнка с окружающей средой. Цель данной работы заключалась в выяснении вопроса: являются ли детские площадки с различным типом покрытия резервуаром антибиотикорезистентных микроорганизмов и какой тип покрытия наиболее безопасен.

В данной работе были исследованы 6 детских площадок города Пущино Московской области с различными типами покрытия: песок (площадка №1), грунт с песком (площадка №4), травяное покрытие (площадки № 2 и 6) и современное покрытие для детских площадок с прессованной резиновой крошкой (площадки №3 и 5). Для изоляции антибиотикорезистентных штаммов высевы производили на полноценную среду (L-агар), содержащую один из перечисленных антибиотиков в соответствующих концентрациях: цефтазидим (40 мкг/мл), цефепим (40 мкг/мл), меропенем (40 мкг/мл), эритромицин (100 мкг/мл), тетрациклин (30 мкг/мл), канамицин (100 мкг/мл), стрептомицин (100 мкг/мл), хлорамфеникол (100 мкг/мл) и гентамицин (10 мкг/мл). Микроорганизмы резистентные ко всем использованным индивидуальным антибиотикам были обнаружены в пробах со всех детских площадок, за исключением площадки №1, где отсутствовали устойчивые к тетрациклину бактерии. Кроме того, мультирезистентные штаммы, устойчивые к трём и более антибиотикам были изолированы со всех площадок.

По результатам исследования самым чистым типом покрытия, как по общей численности культивируемых микроорганизмов (8×10^5 /г субстрата), так и по содержанию резистентных штаммов, оказался песок площадки №1. Наиболее загрязнёнными по общей численности культивируемых микроорганизмов ($1.2 - 1.9 \times 10^9$ /г субстрата) и по содержанию резистентных к антибиотикам штаммов, оказались площадки № 3 и № 5,

покрытые прессованной резиновой крошкой. Вероятно, пористое резиновое покрытие служит иммобилизирующим носителем для микроорганизмов и позволяет им формировать устойчивые к воздействию внешней среды биоплёнки.

Для дальнейшей работы были отобраны резистентные микроорганизмы, предположительно относящиеся к псевдомонадам флуоресцирующей группы, что было предварительно подтверждено путём посева на PIA (*pseudomonas isolation agar*) и на среду KingB. С использованием системы MALDI Biotyper из шестидесяти шести штаммов флуоресцирующих псевдомонад 51 идентифицированы как *P. fluorescens*, 10 – как *P. putida* и пять – как *Pseudomonas* sp. Методом REP-PCR с использованием праймера BOXA1R среди исследуемых штаммов по степени сходства были выделены 33 группы геномных отпечатков. Несмотря на то, что детские площадки города Пущино расположены на небольшом расстоянии друг от друга, обитающие на разных площадках штаммы псевдомонад флуоресцирующей группы оказались не родственны друг другу.

Поскольку в настоящее время тетрациклин является одним из наиболее широко применяемых антибиотиков в здравоохранении, сельском хозяйстве и животноводстве, а резистентные к тетрациклину бактерии распространены повсеместно, 14 устойчивых к тетрациклину штаммов псевдомонад тестировали на наличие *tet*-генов, отвечающих за различные механизмы резистентности. У 12 штаммов обнаружены гены *tetA/tetC*, контролирующие активный вывод антибиотика из клетки, у штаммов *P. fluorescens* D3A-28 и D4A-46 механизм устойчивости к тетрациклину определить не удалось.

Гены антибиотикорезистентности обычно ассоциированы с мобильными генетическими элементами: плазмидами, транспозонами и интегронами. Коллекцию тестировали методом ПЦР на наличие плазмид следующих групп несовместимости: IncP-1, IncP-7, IncP-9 и IncQ. В штаммах *Pseudomonas* sp. D3T-36 и *P. fluorescens* D4A-46 были обнаружены большие (более 100 т.п.н.) конъюгативные плазмиды устойчивости к тетрациклину P-1 и P-7 групп несовместимости, соответственно.

Если плазмиды группы несовместимости P-1 считаются одним из основных носителей генов резистентности, то ранее была известна только одна IncP-7 плазида Rms148, несущая детерминанты устойчивости к стрептомицину. Плазмид устойчивости к тетрациклину, принадлежащих к P-7 группе несовместимости, до настоящего времени обнаружено не было.