

ФОРМИРОВАНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕМУ ПРЕПАРАТУ «ДЕЗАКТИН» У МИКОБАКТЕРИЙ**Завгородний А. И., Позмогова С. А.***Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», Харьков, Украина, e-mail: svetlanapozmogova@gmail.com*

*В условиях постоянного воздействия «Дезактина» на микобактерии установлено, что механизмы формирования резистентности у патогенов и сапрофитов имеют различные пути. Адаптационный ответ возбудителей туберкулёза и паратуберкулёза на неблагоприятные условия *in vitro* аналогичен процессу, происходящему *in vivo* и характеризуется трансформацией в dormantные и CWD-формы. Механизм резистентности у *M. phlei* к «Дезактину» заключается в формировании гетероморфных популяций с частичной или полной утратой кислотоустойчивости, утолщении клеточной стенки, увеличении адгезивных и гидрофобных свойств. Наибольшую устойчивость к биоциду имели *M. phlei*, из патогенных культур — MAP. После 13 последовательных пассажей критическая концентрация «Дезактина» в среде для *M. bovis* и *M. avium* возросла в 100 раз, для MAP — в 7, для *M. phlei* — 1,4 раза*

Ключевые слова: адаптация, дезинфектант, изменчивость, микобактерии, резистентность

Известно, что бактерии имеют характерный спектр и уровень естественной устойчивости к конкретной группе химических средств или конкретному дезинфицирующему средству. Наряду с естественной (природной) устойчивостью, может формироваться приобретённая резистентность, в результате которой бактерия приобретает новые или утрачивает исходные признаки. Появление и распространение устойчивых к дезинфектантам вариантов бактерий, вероятно, является следствием генетического и фенотипического механизмов резистентности и селекции устойчивых культур при длительном применении биоцидов на основе одной группы активно действующих веществ. [1, 2].

Высокая естественная резистентность микобактерий к действию природных, физических и химических факторов во многом обусловлена структурно-биохимическими особенностями микобактерий и, в первую очередь, строением и свойствами уникальной клеточной стенки, большим количеством арабиногалактана, разнообразных липидов, причём некоторые липиды (например, миколовые кислоты), характерные только для микобактерий, придают выраженную гидрофобность клеточной стенке. Кроме того, микобактерии, адаптируясь к неблагоприятным условиям, могут варьировать содержание миколовых кислот на поверхности клеток, тем самым изменяя плотность микобактериальной мембраны, вследствие чего гидрофильные молекулы дезинфектантов не способны проникать через клеточную стенку в количествах, необходимых для достижения микобактерицидного эффекта [3, 4, 5, 6].

Многочисленные исследования в области гуманной медицины (туберкулёз, саркоидоз, болезнь Крона) свидетельствуют, что проявлением адаптивного ответа, в частности на антибиотики, является реверсия вегетативных форм в состояние персистенции покоящихся некультивируемых (dormantных) клеток и CWD-форм (от англ. «cell wall deficient/defective» — бактерии с отсутствующей/дефектной клеточной стенкой) [7–13].

Тогда как работ по изучению приобретённой резистентности микобактерий к дезинфектантам представлено меньше. Большинство исследований, посвящённых вопросам дезинфекции, связаны с определением чувствительности тестовых культур микобактерий к новым препаратам и их апробации с использованием методов, не предусматривающих возможности формирования приобретённой резистентности. Бактериоцидные/бактериостатические эффекты химических средств изучают путём одноразового воздействия различных концентраций растворов и экспозиций на микобактерии тест-культур с последующим высевом на плотную питательную среду. Эта методика позволяет судить о природной устойчивости микобактерий и не совсем корректна в вопросах изучения приобретённой

резистентности, мутаций, степени повышения устойчивости мутантов, по сравнению с их исходными вариантами и т. д. При однократном, недостаточно продолжительном действии дезинфектантов на микроорганизмы мутация, приводящая к приобретённой резистентности к биоцидам, вряд ли произойдёт, но при длительном применении одного и того же препарата существует риск формирования устойчивых, не поддающихся биоцидному воздействию микроорганизмов.

Целью работы было изучение формирования резистентности у микобактерий при многократных пассажах в присутствии дезинфицирующего препарата «Дезактин», сравнение критических концентраций «Дезактина» при многократном и однократном воздействии, а также в зависимости от фазы роста посевного материала.

Материалы и методы. В работе применяли хлорсодержащий дезинфицирующий препарат «Дезактин», использующийся для проведения текущей и заключительной дезинфекции в учреждениях охраны здоровья, объектах водоснабжения и канализации, а также в многопрофильных лабораториях. Действующие вещества препарата: 1,3-дихлор-5,5-диметилгидантоин, 5,5-диметилгидантоин; рекомендованная концентрация при туберкулёзе: 0,3–2,5 %-й раствор, время воздействия (экспозиция) — 30–360 минут.

Приобретённую резистентность изучали на референтных культурах возбудителей туберкулёза (*M. bovis* штам Vallee, *M. avium* штам D4ER), паратуберкулёза (*M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)), а также на сапрофитных микобактериях — *M. phlei*, путём их последовательного пассажирования на среде с увеличивающейся концентрацией (от 0,025 до 55,0 мг) препарата. Кроме того, была установлена чувствительность к «Дезактину» у культур при однократном действии препарата, путём их высева непосредственно с картофельной среды Павловского на среду с определённой концентрацией биоцида.

Влияние фазы роста на чувствительность к биоциду изучали на культурах в логарифмической (20–25-дневных — для патогенов и 3-дневных — для *M. phlei*) и стационарной (2-месячных) фазах роста. Из-за очень медленного естественного роста MAP исследования проводили только с культурой в логарифмической фазе роста (3-х месячной). До начала опыта все культуры (кроме MAP) культивировали на среде Павловского, MAP — на селективной среде с фактором роста.

Приготовление сред с «Дезактином». Среды с соответствующей концентрацией препарата готовили за 24 часа перед высевом культур. На поверхность готовой «Сухой яичной среды для культивирования микобактерий» вносили по 0,5 см³ раствора, содержащего 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,5; 2,5; 5,0; 15,0; 25,0; 35,0; 50,0; 55,0 мг «Дезактина». После внесения препарата пробирки выдерживали в горизонтальном положении при комнатной температуре для равномерного пропитывания. На следующий день проводили посев суспензии культур.

Приготовление суспензии культур микобактерий. Суспензию микобактерий готовили из адаптированных к картофельной среде Павловского культур в концентрации 1,0 мг бакмассы в 1,0 см³ 0,85 %-го раствора NaCl. Взвесь культур гомогенизировали и высевали по 0,5 см³ на четыре пробирки с «Дезактином» и одну без препарата (контроль). Две пробирки с препаратом культивировали до логарифмической фазы, две другие — до стационарной фазы роста, затем пересеивали на среду с большей концентрацией препарата. Посевы культивировали при 37,5±0,5 °С. Всего было проведено 11 последовательных пассажей *M. bovis* штам Vallee и *M. avium* штам D4ER, 12 пассажей — MAP и 13 пассажей — *M. phlei*.

Морфологию колоний (цвет, форма) и клеток (форма, размер, кислотоустойчивость) микобактерий после воздействия «Дезактина» изучали в сравнении с исходными штаммами и в мазках, окрашенных по методу Циль-Нильсена.

Результаты исследований. Полученные нами результаты расходились с результатами исследований зарубежных авторов [3, 9], в частности в том, что быстрорастущие культуры микобактерий, по сравнению с медленно растущими, являются более чувствительными к хлору, а также в том, что культуры в стационарной фазе роста менее чувствительны, в отличие от культур логарифмической фазы роста.

В наших исследованиях для патогенных культур стационарной фазы критическая концентрация препарата в среде составила 0,25 мг. При этом рост колоний выявляли намного позже как на среде с препаратом, так и на контрольной среде, тогда как для культур, пересеиваемых в логарифмической фазе роста, максимальные концентрации препарата были в

100 раз більше. Результати досліджень показали, що швидкозростаючі культури і патогенні культури в логарифмічній фазі росту швидше пристосовувалися до присутності «Дезактина» (табл.). Для *M. phlei* фаза росту не оказувала якогось-либ значення на чутливість до дезінфектанту.

Таблиця — Результати вивчення чутливості мікобактерій до «Дезактину»

Myc. ssp.	Многоразовое воздействие препарата (логарифмическая фаза роста)													К
	Содержание «Дезактина» в среде, мг													
	0,025	0,05	0,1	0,25	0,5	1,5	2,5	5,0	15,0	25,0	35,0	50,0	55,0	
<i>M. bovis</i>	#	#	#	#	#	#	#	# ²	#	++	-	-	-	#
<i>M. avium</i>	#	#	#	#	#	#	#	#	#	+++	-	-	-	#
<i>M. phlei</i>	++	++	++	++	++ ²	++	++	++	++	++	+	-	-	+++
<i>M. phlei</i>	#	#	#	#	#	#	#	#	# ¹	#	#	+++	-	#
Многоразовое воздействие препарата (стационарная фаза роста ⁴)														
<i>M. bovis</i>	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#
<i>M. avium</i>	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#
<i>M. phlei</i>	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	+	-	#
Одноразовое воздействие препарата (логарифмическая фаза роста)														
<i>M. bovis</i>	#	#	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#
<i>M. avium</i>	#	#	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	#
<i>M. phlei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+++
<i>M. phlei</i>	#	#	#	#	#	#	#	#	# ³	#	#	++	-	#

Примечания: К — контрольная среда; «+» — 1–10 колоний; «++» — 10–30 колоний; «+++» — 30–50 колоний; «#» — колоний больше 50; ¹ — формирование изогенного варианта оранжевого цвета R-формы (№ 1); ² — формирование изогенного варианта S-формы; ³ — формирование изогенного непигментированного варианта S-формы (№ 2); ⁴ — из-за медленного естественного роста *M. phlei* исследование не проводили.

Вероятно, вследствие замедленного метаболизма старых культур стационарной фазы процесс репликации приостановлен или находится на очень низком уровне, следовательно, формирование адаптационных наследственных изменений к неблагоприятным условиям не будет таким же интенсивным, как у активно размножающихся клеток в логарифмической фазе роста. Кроме того, установлено, что быстро растущая культура атипичных микобактерий *M. phlei* обладала наибольшей степенью естественной и приобретённой резистентности, нежели представители медленно растущих культур *M. bovis*, *M. avium* и *M. phlei*.

Из патогенных культур *M. phlei* оказались менее чувствительными к дезинфектанту, в отличие от возбудителей бычьего и птичьего туберкулёза. Критическая концентрация «Дезактина» в среде, при которой выявляли рост постепенно адаптированных *M. bovis* и *M. avium*, составляла 25,0 мг, для *M. phlei* эта концентрация была в два раза выше и составляла 50,0 мг, для *M. phlei* — 35,0 мг.

Что касается одноразового воздействия «Дезактина» на культуры, было установлено, что *M. bovis* и *M. avium* в 100 раз чувствительнее к препарату, по сравнению с их постепенно адаптированными вариантами. Максимальная концентрация препарата для этих штаммов составила 0,25 мг (для постепенно адаптированных — 25,0 мг). Из патогенных культур возбудитель паратуберкулёза был наиболее резистентным к препарату, критическая концентрация, при которой наблюдали рост неадаптированных колоний *M. phlei*, составила 5,0 мг, количество колоний при этом не превышало 2–5. По нашему мнению, высокую устойчивость *M. phlei* к «Дезактину» обеспечивали структурные особенности клеточной стенки, поскольку этот вид микобактерий, в отличие от других видов, характеризуется самым большим содержанием миколовых кислот и очень толстой клеточной стенкой.

При сравнении морфологии колоний *M. avium* после многократного и одноразового действия «Дезактина» с исходным штаммом каких-либо изменений не наблюдали, в отличие от *M. bovis* и *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. В процессе последовательных пересевов в присутствии «Дезактина» у *M. bovis* и *M. phlei* наблюдали трансформацию R-колоний в S-форму. В результате S-диссоциации у *M. bovis* резко снижались адгезивные свойства клеток, а у *M. phlei* —

увеличивались, что отразилось на способности бактерий по-разному эмульгироваться в физиологическом растворе. Однако главная родовая характеристика — кислотоустойчивость — у всех патогенных микобактерий сохранялась. С увеличением концентрации «Дезактина» происходило истончение и постепенное разрушение клеточной стенки, что отражалось на интенсивности окрашивания клеток из ярко красного в более бледные цвета, а в конечном итоге формировались слабо окрашивающиеся или неокрашивающиеся структуры с дефектной или отсутствующей клеточной стенкой. При микроскопии соскобов, где отсутствовал видимый рост патогенов, кроме небольшого количества кислотоустойчивых палочек, были выявлены изменённые формы: CWD-формы в виде сфероидов, скоплений кислотоустойчивых кокковых форм, зёрен и аморфной массы. При последующих пассажах изменённых форм на среде без биоцида роста колоний не наблюдали, но при микроскопии выявляли медленно увеличивающееся количество классических бациллярных форм. Таким образом, переход к состоянию покоя, при котором из-за крайне низкого метаболизма сильно замедляется или прекращается репликация клеток, можно рассматривать как часть адаптивного ответа на «Дезактин».

Полученные результаты исследований свидетельствуют, что в основе адаптации патогенных микобактерий к неблагоприятным условиям *in vitro* лежат механизмы, аналогичные процессам, происходящим *in vivo*, проявляющимся генетическими мутациями и фенотипическими изменениями, ведущими к формированию CWD- и некультивируемых покоящихся форм.

В отношении представителя атипичных микобактерий *M. phlei* установлено, что эти сапрофитные микобактерии обладали очень высокой природной устойчивостью к «Дезактину» и быстрой адаптацией к неблагоприятным условиям культивирования. Так, под нарастающим воздействием препарата, начиная с концентрации в среде 15,0 мг и выше, а также при одноразовом воздействии препарата в тех же концентрациях у данного штамма наблюдали диссоциацию с формированием гетероморфных популяций клеток. Гетерогенные варианты *M. phlei* характеризовались морфологическими изменениями колоний и клеток (цвет и форма, толщина клеточной стенки, кислотоустойчивость). У изогенной популяции № 1, формирующейся при постепенной адаптации к биоциду, наблюдали изменение цвета колоний от светло-жёлтого до ярко-оранжевого. При микроскопии выявляли лиловые (сиреневые) кокки и разной длины толстые палочки, а также полностью утратившие кислотоустойчивость ярко-синие бочонко-подобные клетки с очень толстой клеточной стенкой. Причём у этого варианта резко увеличились адгезивные свойства и гидрофобность. Кислотостойких палочек с типичной для этого вида микобактерий морфологией клеток не выявляли. У изогенного варианта № 2, сформировавшегося после одноразового воздействия препарата в той же концентрации, что и вариант № 1, наблюдали полную утрату пигментации колоний, изменение R-формы колоний на S-форму, при микроскопии выявляли кислотостойкие (красные) и не кислотостойкие (синие) палочки и кокки с очень толстой стенкой. Следует отметить, что изменения, возникшие в результате воздействия «Дезактина», не были необратимыми. Так, после двух-четырёх пассажей на среде без дезинфицирующего препарата изменённые варианты постепенно восстанавливали свои изначальные характеристики, причём непигментированный изовариант № 2 восстановился быстрее (через 2 пассажа). Это, вероятно, связано с тем, что более стойкие изменения изоварианта № 1 с полной утратой кислотоустойчивости сформировались в результате накопления и закрепления мутаций на протяжении нескольких генераций (13 пассажей), тогда как после одноразового воздействия «Дезактина» спонтанная трансформация изоварианта № 2 затронула лишь часть популяции клеток.

Итак, наблюдаемый гетероморфный рост *M. phlei* и резкое утолщение клеточной стенки является отражением адаптивной изменчивости, следовательно, высокой приспособляемости сапрофитных бактерий в зависимости от условий их существования.

Результаты исследований позволяют сделать заключение, что процессы приспособления патогенных и сапрофитных МБ к негативному воздействию окружающей среды имеют разные пути, которые, по нашему мнению, обусловлены эволюционно сложившейся нишей их существования, а именно, одни являются внутриклеточными паразитами, а другие — экологическими микобактериями.

Выводы. Постоянное воздействие одного и того же дезинфектанта формирует резистентные формы микобактерий. Механизм резистенции возбудителей туберкулёза и паратуберкулёза к «Дезактину» характеризуется деформацией и постепенной утратой клеточной стенки, трансформацией в дормантные и CWD-формы; у сапрофитных микобактерий (*M. phlei*) — утолщением клеточной стенки, увеличением адгезивных и гидрофобных свойств, формированием гетероморфных популяций с частичной или полной утратой кислотоустойчивости.

Список литературы

1. Вишневский Б. И. Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулёза. *Медицинский альянс*. 2017. № 1. С. 29–32.
2. Котова А. Л., Ракишева А. С. Резистентность микобактерий туберкулёза к дезинфицирующим веществам. *Вестник КазНМУ*. 2014. № 1. С. 254–256.
3. Steed K. A., Falkinham J. O. Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006. Vol. 72, No. 6. P. 4007–4011.
4. Falkinham J. O. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J. Appl. Microbiol.* 2009. Vol. 107, No. 2. P. 356–367.
5. Лучинин Д. Н., Ротов К. А., Спиридонов В. А., Викторов Д. В. Основные механизмы резистентности микроорганизмов к антисептикам и дезинфектантам. *Дезинфекционное дело*. 2014. № 1. С. 24–30.
6. Oriani A. S., Sierra F., Baldini M. D. Effect of chlorine on *Mycobacterium gordonae* and *Mycobacterium chubuense* in planktonic and biofilm state. *Int. J. Mycobacteriol.* 2018. Vol. 7, No. 2. P. 122–127.
7. Wayne L. G. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1994. Vol. 13. P. 908–914.
8. Wayne L. G., Hayes L. G. An *in vitro* model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of non-replicating persistence. *Infect. Immun.* 1996. Vol. 64, No. 6. P. 2062–2069.
9. Lim A., Eleuterio M., Hutter B. [et al.]. Oxygen depletion-induced dormancy in *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* 1999. Vol. 181. P. 2252–2256.
10. Domingue, G. Demystifying pleomorphic forms in persistence and expression of disease. *Discovery Medicine*. 2010. Vol. 10, No. 52. P. 234–246.
11. Hulten K., El-Zimaity H., Karttunen T. [et al.]. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's diseased tissues by *in situ* hybridization. *American Journal of Gastroenterology*. 2001. Vol. 96, No. 5. P. 1529–1535.
12. El-Zaatari F., Naser S., Markesich D. [et al.]. Identification of *Mycobacterium avium* complex in sarcoidosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996. Vol. 34, No. 9. P. 2240–2245.
13. Onwuamaegbu M., Belcher R., Soare C. Cell wall-deficient bacteria as a cause of infections: a review of the clinical significance. *Journal of International Medical Research*. 2005. Vol. 33, No. 1. P. 1–20.

FORMATION OF RESISTANCE TO THE DISINFECTANT DRUG “DEZAKTIN” IN MYCOBACTERIA

Zavgorodniy A. I., Pozmogova S. A.

National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, Ukraine

*The purpose of the work was to study the resistance formation in mycobacteria at multiple passages in the presence of the disinfectant “Dezaktin”, to compare the critical concentrations of “Dezaktin” at repeated and single exposure, as well as depending on the phase of growth of the seed. Under the conditions of the constant effect of “Dezaktin” on mycobacteria, it has been established that the mechanisms of resistance formation in pathogens and saprophytes have different paths. The adaptive response of pathogens of tuberculosis and paratuberculosis to adverse conditions *in vitro* is similar to the process that occurs *in vivo* and was characterized by transformation into dormant and CWD-forms. The mechanism of resistance in *M. phlei* to “Dezaktin” consisted in the formation of heteromorphic populations with a partial or complete loss of acid resistance, thickening of the cell wall, and an increase in adhesive and hydrophobic properties. *M. phlei* had the highest biocide resistance, and MAP among pathogenic cultures. After 13 consecutive passages, the critical concentration of “Dezaktin” in the medium for *M. bovis* and *M. avium* increased 100 times, for MAP — 7, for *M. phlei* — 1.4 times. The research results allow us to conclude that the processes of adaptation of pathogenic and saprophytic mycobacteria to the negative effects of the environment have different paths, which, in our opinion, is due to the evolutionary niche of their existence, namely, the first group are intracellular parasites, and others are environmental mycobacteria*

Keywords: adaptation, disinfectant, variability, mycobacteria, resistance