

# ЛЕКАРСТВЕННАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ЛЕГОЧНОЙ ПАТОЛОГИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ КОНДЕНСАТА ТАБАЧНОГО ДЫМА

УДК 615.017:616.24:613.84

Поступила 16.02.2011 г.



А.С. Шпрыков, к.м.н., доцент кафедры туберкулеза

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

**Цель исследования** — изучить влияние продуктов табачного дыма на лекарственную чувствительность типичных бактериальных возбудителей неспецифической легочной патологии: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*.

**Материалы и методы.** Проведено 786 исследований по определению лекарственной чувствительности к антибактериальным препаратам (АБП) после культивирования указанных субкультур на средах с конденсатом табачного дыма. Всего тестировалось от 7 до 9 наименований различных групп АБП диско-диффузионным методом.

**Результаты.** Отмечено уменьшение диаметра зон задержки роста вблизи дисков с антибиотиками: эритромицином, левофлоксацином, оксациллином (*S. pneumoniae*); цефотаксимом ( $p < 0,05$ ), левомицетином (*H. influenzae*); цефепимом ( $p < 0,05$ ), амоксиклавом, меропенемом, цефотаксимом (*K. pneumoniae*). Это свидетельствует о возможности формирования лекарственной устойчивости к АБП под действием продуктов табачного дыма.

**Ключевые слова:** конденсат табачного дыма, лекарственная чувствительность, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*.

## English

### Drug sensitivity of nonspecific lung pathology agents in experimental conditions of tobacco smoke condensate exposure

A.S. Shprykov, PhD, Associate Professor, the Department of Tuberculosis

Nizhny Novgorod State Medical Academy, N. Novgorod

**The aim of the investigation** is to study the effect of tobacco smoke products on drug sensitivity of typical bacterial agents of nonspecific lung pathology: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*.

**Materials and Methods.** There have been performed 786 studies to determine drug sensitivity to antibacterial agents (ABA) after the subcultures being cultured on media with tobacco smoke condensate. From 7 to 9 of various ABA have been tested using a disco-diffusion technique.

**Results.** There was observed the decrease of the diameter of zones of growth retardation near the discs with the following antibiotics: erythromycin, levofloxacin, oxacillin (*S. pneumoniae*); cefotaxime ( $p < 0,05$ ), levomycetin (*H. influenzae*); ceftazidime ( $p < 0,05$ ), amoxiclav, meropenem, cefotaxime (*K. pneumoniae*). It gives evidence of the possibility to form drug sensitivity to ABA in response to tobacco smoke products.

**Key words:** tobacco smoke condensate, drug sensitivity, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*.

Для контактов: Шпрыков Александр Сергеевич, тел. раб. 8(831)432-85-92, тел. моб. +7 905-195-81-87; e-mail: olgachpr@aport.ru.

В последнее время в литературе широко освещается проблема лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе бактериальных инфекций дыхательных путей [1, 2]. К причинам, способствующим формированию резистентности, относятся самостоятельный прием лекарств без врачебного контроля, неверно выбранные схемы и дозировки, низкое качество лекарственных препаратов и т.д. Среди факторов риска лекарственной устойчивости упоминается пожилой возраст, алкоголизм, иммунодефицит, длительное пребывание в стационаре [3, 4]. Однако влияние такой распространенной привычки, как курение табака, на лекарственную чувствительность неспецифической микрофлоры остается неизученным, хотя давно известна выраженная мутагенность продуктов табачного дыма. Так, для микобактерий туберкулеза табачная интоксикация упоминается среди факторов риска лекарственной устойчивости [5].

**Цель исследования** — изучить влияние продуктов табачного дыма на лекарственную чувствительность типичных бактериальных возбудителей неспецифической легочной патологии: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*.

**Материалы и методы.** Для экспериментов отобраны субкультуры *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, выделенные от больных внебольничными пневмониями.

Конденсат табачного дыма (КТД), являющийся международным стандартом кумулятивного действия курения [6], получали на роторном курильщике — автомате Borgwaldt RM 20/CS (Германия). Готовили десятикратные разведения КТД в убывающей концентрации, что соответствовало 5 рабочим разведениям: 1-е разведение — 10 мг/мл; 2-е — 1 мг/мл; 3-е — 0,1 мг/мл; 4-е — 0,01 мг/мл; 5-е — 0,001 мг/мл — и наносили их на питательные среды согласно разработанному способу [7].

Для контроля качества постановки антибиограмм использовали референс-штаммы: *S. pneumoniae* — ATCC 49619; *H. influenzae* — ATCC 49247; *K. pneumoniae* — ATCC 35657 BD Difco™ BBL.

С субкультурами *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, давшими наиболее обильный рост на средах с КТД, проведено по 5—6 серий опытов — всего 786 исследований по определению лекарственной чувствительности к антибактериальным препаратам (АБП). Тестировалось от 7 до 9 наименований различных групп АБП на каждую культуру. Контролем служили те же субкультуры, но выращенные без КТД.

Исследования проводили диско-диффузионным методом на среде Мюллер—Хинтона с кровью для *S. pneumoniae*, на среде НТМ — для *H. influenzae*, на среде Мюллер—Хинтона — для *K. pneumoniae* [8]. При постановке антибиограмм использовали стандартный инокулюм, соответствующий по оптической плотности 0,5 ед. по Мак-Фарланду и содержащий  $1,5 \cdot 10^8$  колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 мл. Материал в объеме 1—2 мл пипеткой наносили на поверхность питательной среды, равномерно распределяли, избыток удаляли. После подсушивания наносили диски с помощью автоматического диспенсера. Измерения зон

задержки роста субкультур проводили микробиологическим штангенциркулем.

**Результаты и обсуждение.** При анализе полученных данных антибиотикочувствительности *S. pneumoniae* (табл. 1) выявлено существенное снижение диаметра зоны задержки роста субкультур, выращенных с КТД, около дисков с эритромицином (на 25%). Менее значимые изменения отмечены около дисков с левофлоксацином (на 14%), оксациллином (на 15%), а также с линкомицином (на 8%) и офлоксацином (на 5%). Последние два результата можно считать изменениями в пределах биологических колебаний величины зоны задержки роста.

Изменения в лекарственной чувствительности чаще повторялись на средах с 3-м, реже 4-м разведениями КТД. Данный факт может свидетельствовать о тенденции снижения чувствительности штамма, выращенного на питательной среде с КТД, преимущественно в наиболее эффективных концентрациях (в 3-м, а также в 4-м разведениях КТД), т.е. близких к тем, которые создаются в организме злостного курильщика (по нашей модели).

В то же время около дисков с тетрациклином и цефтриаксоном субкультуры, выращенные с максимальным содержанием КТД, дали увеличение диаметра зоны задержки роста, что может свидетельствовать о подавляющем влиянии высоких концентраций КТД на субкультуру *S. pneumoniae*.

При оценке результатов исследования антибиотикочувствительности субкультур *H. influenzae*, выращенных с КТД (табл. 2), выявлена значительная тенденция к уменьшению диаметров зон задержки роста около дисков с цефотаксимом (на 30%) и левомицетином (на 15%). Для цефотаксима различие статистически значимо:  $19,0 \pm 2,3$  мм в опыте против  $27,0 \pm 2,9$  мм в контроле ( $p < 0,05$ ). В отношении пефлоксацина, амоксициллина и гентамицина уменьшение зон задержки роста выражено слабее: соответственно на 10, 8 и 5%, что может быть в пределах допустимых биологических колебаний.

Таблица 1

**Лекарственная чувствительность субкультур *S. pneumoniae*, выросших на средах с различными разведениями конденсата табачного дыма (средние значения зон задержки роста в мм)**

Антибактериальные препараты	Разведения КТД					Контроль
	1-е	2-е	3-е	4-е	5-е	
Оксациллин 1 мкг	20	20	17	19	19	20
Эритромицин	22	22	19	20	21	25
Тетрациклин	26	25	25	24	24	24
Линкомицин	23	24	25	23	23	25
Левофлоксацин	23	21	19	20	21	22
Цефтриаксон	31	31	22	23	28	22
Офлоксацин	18	20	18	20	20	19

Примечание: чувствительность к пенициллину для *S. pneumoniae* определяется по диску с оксациллином.

Таблица 2

Лекарственная чувствительность субкультур *H. influenzae*, выросших на средах с различными разведениями конденсата табачного дыма (средние значения зон задержки роста в мм)

Антибактериальные препараты	Разведения КТД					Контроль
	1-е	2-е	3-е	4-е	5-е	
Ампициллин	22	21	21	23	21	21
Амоксиклав	24	25	23	25	24	25
Гентамицин	21	20	20	20	19	20
Цефотаксим	23	23	19	21	26	27
Тетрациклин	19	18	18	20	20	18
Пефлоксацин	20	19	18	18	18	20
Левомецетин	25	23	25	23	24	27

Таблица 3

Лекарственная чувствительность субкультур *K. pneumoniae*, выросших на средах с различными разведениями конденсата табачного дыма (средние значения зон задержки роста в мм)

Антибактериальные препараты	Разведения КТД					Контроль
	1-е	2-е	3-е	4-е	5-е	
Амоксиклав	14	14	13	12	14	15
Гентамицин	7	8	7	8	7	7
Цефуроксим	6	6	6	6	6	6
Цефотаксим	8	8	8	7	8	8
Цефепим	8	9	6	8	9	9
Пефлоксацин	14	14	13	14	14	14
Хлорамфеникол	10	10	10	10	10	10
Доксициклин	8	8	8	8	8	8
Меропенем	22	19	18	17*	21	21

\* — рост колоний *K. pneumoniae* в зоне ингибиции.

Контрольные субкультуры, выращенные без КТД, были чувствительны ко всем исследуемым АБП.

Уменьшение зон задержки роста наблюдалось в первую очередь у субкультур с 3-го, и в меньшей степени — с 4-го разведения КТД. Учитывая 6-кратную повторность опыта, можно отметить некоторую тенденцию к снижению чувствительности субкультур к АБП после воздействия КТД в 3-м, 4-м и реже — во 2-м и 5-м разведениях.

Исследуемая культура *K. pneumoniae* вырабатывает β-лактамазы расширенного спектра, что определяет ее устойчивость ко всем β-лактамам антибиотикам, кроме карбапенемов. Полученные результаты по 6 сериям экспериментов (табл. 3) позволили установить снижение чувствительности к ряду антибиотиков культур, выросших на средах с 4-м и 3-м разведениями КТД.

Как следует из таблицы, максимальное уменьшение диаметров зон задержки роста субкультур отмечено к цефепиму (33%,  $p < 0,05$ ), амоксиклаву (20%) и меропенему (19%). Менее значительное уменьшение таких зон к цефотаксиму (13%) и пефлоксацину (7%) можно считать на уровне биологических колебаний величин.

В опытах с *K. pneumoniae*, в отличие от других возбудителей, наиболее часто изменение диаметра зон задержки роста наблюдалось у субкультур, выросших на средах с 4-м, а не с 3-м разведением КТД.

Около диска с меропенемом (4-е разведение) внутри зон ингибиции во всех опытах констатирована вторая зона роста в виде изолированных колоний. Несмотря на двойную зону ингибиции, культура с учетом даже внутреннего диаметра (зоны задержки) укладывалась в категорию чувствительных (17 мм — среднее значение по 5 опытам). Изучение изолированных колоний во второй зоне ингибиции подтвердило наличие в ней *K. pneumoniae* (по морфологическим и биохимическим признакам) и дает основание предполагать диссоциацию субкультур под воздействием КТД.

Отмеченное нами в ряде случаев уменьшение диаметра зон задержки роста микроорганизмов после культивирования на средах с КТД свидетельствует о снижении лекарственной чувствительности к АБП в условиях эксперимента для всех трех возбудителей: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*. Важен факт, что первые два из вышеназванных возбудителей признаются в литературе этиологическим микробным фактором, наиболее часто вызывающим пневмонию у злостных табакокурльщиков [2].

Причина снижения чувствительности и, следовательно, повышения устойчивости субкультур в опытах с КТД заключается, вероятно, в мутагенном действии табачного дыма. Известно из литературы [9], что в табачном дыме содержится более 50 явных мутагенов и канцерогенов, которые могут при определенных условиях вызывать появление точечных мутаций, в том числе и в генах, с которыми связана лекарственная устойчивость микроорганизмов, в частности в плазмидах — подвижных генетических элементах, способных к быстрой передаче генетической информации. Длительность воздействия этого раздражителя составляет годы и десятилетия. Весьма возможно, хотя и необязательно, в нашем эксперименте создаются условия, напоминающие «тест мутагенности Эймса», когда на микробную клетку на ограниченной площади действует относительно высокая концентрация раздражителя (табачного конденсата).

Необходимо уделить особое внимание факту диссоциации культуры вблизи диска с меропенемом. В этом тесте отмечается двойное последовательное воздействие на культуру КТД и АБП, диффундирующего из диска в питательную среду, что приводит к изменению фенотипа возбудителя.

**Заключение.** Отмеченное уменьшение зон задержки роста *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, хотя в ряде случаев и не выходит за пределы чувствительности к антибактериальным препаратам, свидетельствует о снижении уровня чувствительности и возможности формирования лекарственной устойчивости к вышеназванным препаратам под влиянием продуктов табачного дыма. Таким образом, курение табака, в первую очередь злостное, следует признать одним из факторов риска лекарственной резистентности бактериальных возбудителей легочной патологии.

Литература

1. Сидоренко С.В. Резистентность микроорганизмов и антимикробная терапия. РМЖ 1998; 6(11): 717—725.
2. Респираторная медицина. Руководство под ред. акад. РАМН А.Г. Чучалина. Том 1. М: ГЭОТАР-Медиа; 2007; 800 с.
3. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Страчунский Л.С. и др. Внебольничная пневмония у взрослых. Практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. М; 2006; 76 с.
4. Дворецкий Л.И. Место макролидов в лечении обострений хронического бронхита. Справочник поликлинического врача 2004; 6: 3—6.
5. Kolappan C., Gopi P.G. Tobacco smoking and pulmonary tuberculosis. Thorax 2002; 57: 964—966.
6. Dube M.F., Green C.R. Methods of collection of smoke for analytical purposes. Recent Adv Tob Sci 1982; 8: 42—102.
7. Шпрыков А.С., Лазовская А.Л., Жаднов В.З. Способ подготовки воздействия табачного дыма на туберкулезный возбудитель. Патент №2083001 РФ. 1997.
8. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 4.2.1890-04 от 2004 г.
9. Zevin S., Benowitz N.L. Drug interactions with tobacco smoking: an update. Clin Pharmacokinet 1999; 6: 425—438.