

S. I. Paranko, V. G. Gavrilyuk, A. I. Vinnikov
Study of respiratory processes in clinical antibiotic resistant staphylococci strains

УДК 579.61:616–078+618.21

С. И. Паранько, В. Г. Гаврилюк, Л. П. Голодок, А. И. Винников

Днепропетровский национальный университет

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ ДЫХАНИЯ У КЛИНИЧЕСКИХ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ СТАФИЛОКОККОВ

Із репродуктивного тракту жінок, котрі не виношували вагітність, виділено 54 штами стафілококів із різним рівнем стійкості до ряду антибіотиків. Проведено дослідження дихальної активності у виділених культур. Показана інтенсифікація процесів ендогенного дихання клітин стафілококів у результаті розвитку стійкості до антимікробних препаратів.

54 staphylococcus strains with different resistance levels to a number of antibiotics have been extracted from the reproductive canal of women who had a miscarriage. The respiration activity of the selected cultures has been studied. Endogenic respiration processes in staphylococcus cells intensified in consequence of the development of antimicrobial medication resistance.

Введение

Инфекции стафилококковой этиологии занимают особое место ввиду их широкого распространения в акушерско-гинекологической практике и ежегодного увеличения числа множественноустойчивых штаммов, являющихся причиной тяжелых внутрибольничных инфекций [1–3; 5; 11; 12]. Неоспоримым является тот факт, что плазмидам принадлежит главная роль в распространении лекарственной устойчивости в популяции стафилококков [8]. Присутствие плазмид антибиотикорезистентности в клетках бактерий может вызывать изменения различного характера в проявлении биологических свойств, в частности, продукции факторов патогенности и персистенции, направленности метаболических процессов и реализации клеточных регуляторных механизмов [7; 10]. Все эти изменения обуславливают возникновение острых или хронических форм инфекций, затрудняют диагностику, а следовательно, терапию и профилактику заболеваний различной этиологии [4; 6]. Между тем, данные о влиянии внехромосомных генетических элементов на обменные процессы у различных видов микро-

© С. И. Паранько, В. Г. Гаврилюк, Л. П. Голодок, А. И. Винников, 2006

140

организмов весьма противоречивы, поэтому необходимо сравнительное изучение биологических свойств антибиотикоустойчивых штаммов микроорганизмов.

Материал и методы исследований

Объектом исследования являлись клинические штаммы стафилококков, выделенных из репродуктивной системы женщин, пребывающих в стационаре с угрозой прерывания беременности. С целью исследования качественного и количественного состояния микрофлоры репродуктивного тракта беременных проведено комплексное микробиологическое исследование, которое включало микроскопию влажных мазков для ориентировочного определения микробного пейзажа и выраженности воспалительной реакции, определение *pH* содержимого влажного мазка и аминный тест, бактериологический анализ, включающий посев аэробной и анаэробной микрофлоры с последующими тестами для видовой идентификации и степени обсемененности аэробными и анаэробными бактериями. Видовую идентификацию стафилококков проводили по общепринятым методикам [9].

Чувствительность микроорганизмов к ряду антибиотиков изучали методом диффузии в среду АГВ с использованием дисков, пропитанных следующими антимикробными препаратами: пенициллин, ампициллин, оксациллин, метициллин, цефалотин, цефаклор, линкомицин, эритромицин, рокситромицин, доксициклин, канамицин, гентамицин, офлоксацин.

Определение интенсивности эндогенного дыхания клеток исследуемых штаммов стафилококков проводили полярографическим методом по изменению концентрации кислорода в среде с использованием электрода Кларка закрытого типа. Результаты регистрировали по убыванию кислорода за определенный промежуток времени в закрытой ячейке в отсутствие субстратов (эндогенное дыхание). Скорость дыхания рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{\Delta V_{O_2}}{\Delta t \times m},$$

где V – интенсивность дыхания, $нМ O_2 / мин \cdot мг$ белка; ΔV_{O_2} – количество использованного кислорода, $нМ O_2$; Δt – время, мин.; m – масса белка, мг.

Количество белка в пробе определяли методом Лоури. Все эксперименты проводили в 3–5 повторностях.

Результаты и их обсуждение

Обследованы 63 женщины с привычным невынашиванием плода в возрасте от 18 до 41 года, которые находились на I триместре беременности. В прошлом у этих женщин случалось два–три самоаборта, 43 % имели неспецифические воспалительные процессы влагалища, шейки матки, воспалительные заболевания мочевыделительной системы, подтвержденные клиническими и бактериологическими методами исследований. В эту группу в ходе скрининга не включены женщины, у которых были сопутствующие заболевания экстрагенитальной природы.

В результате проведенных исследований из репродуктивного тракта женщин с угрозой прерывания беременности были выделены 54 штамма стафилококков, 56 % из которых были идентифицированы как *Staphylococcus epidermidis*, 37 % – как *S. saprophyticus* и 7 % – как *S. aureus*. Из них 63 % штаммов обладали множественной устойчивостью к антимикробным препаратам. Среди вариантов, идентифицированных как *S. saprophyticus*, выделено 65 % полирезистентных культур; среди штаммов, относящихся к *S. epidermidis* – 63 %; среди коагулазоположительных изолятов *S. aureus* – 50 % с устойчивостью к ряду антибиотиков. Результаты анти-

биотикограмм, проведенных для исследования клинических штаммов стафилококков, показали, что наибольший уровень устойчивости наблюдался по отношению к бензилпенициллину (96 % выделенных штаммов), линкомицину (83 %), эритромицину (65 %), оксациллину (61 %) и метициллину (55 %) (рис. 1). Меньшее количество устойчивых вариантов выявлено по отношению к канамицину (50 %), ампициллину (46 %), доксициклину (35 %) и рокситромицину (25 %).

Наиболее эффективными препаратами в отношении исследуемых клинических культур стафилококков оказались цефалотин, цефаклор, офлоксацин и гентамицин – выявлено лишь 15 % устойчивых штаммов. Важно отметить, что среди метициллин-устойчивых культур стафилококков 73 % оказались полирезистентными более чем к 5 антибиотикам. Таким образом, формирование резистентности у исследуемых стафилококков в большей степени проявилось к классам пенициллинов и макролидов, а в наименьшей – к классу цефалоспоринов и группе фторхинолонов.

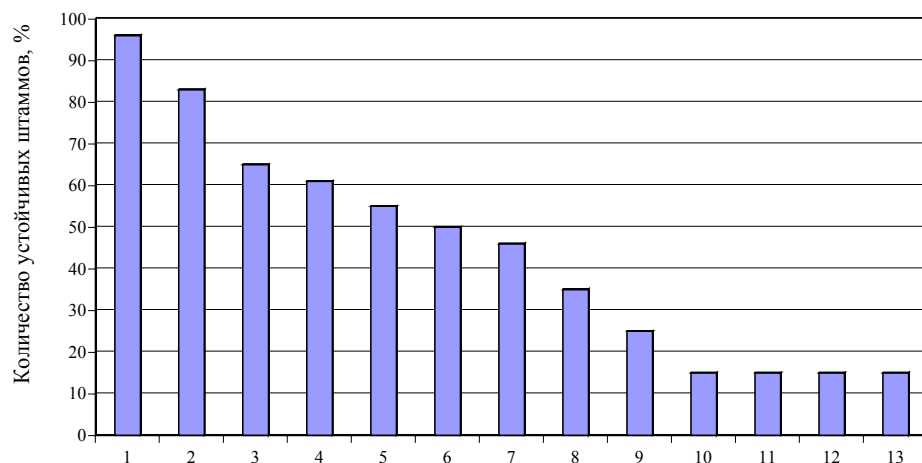


Рис. 1. Устойчивость клинических штаммов стафилококков к антибиотикам:

1 – бензилпенициллин; 2 – линкомицин; 3 – эритромицин; 4 – оксациллин; 5 – метициллин; 6 – канамицин; 7 – ампициллин; 8 – доксициклин; 9 – рокситромицин; 10 – цефалотин; 11 – цефаклор; 12 – офлоксацин; 13 – гентамицин.

На следующем этапе были проведены исследования по изучению дыхательной активности выделенных штаммов стафилококков. Скорость окислительных процессов выделенных культур колебалась в пределах 30,2–117,4 нМ O_2 /мин·мг.

Определение эндогенного дыхания, т. е. окисления внутриклеточных субстратов показало, что дыхательная активность клеток множественноустойчивых вариантов была на более высоком уровне по сравнению с чувствительными к ряду антибиотиков штаммами. Для детального анализа все выделенные штаммы стафилококков условно разделены на 4 группы: к 1-й группе отнесены варианты, чувствительные к исследуемым антимикробным препаратам; ко 2-й группе – штаммы, устойчивые к 1–2 антибиотикам; к 3-й группе – с устойчивостью к 3–4 антибиотикам; к 4-й группе – с устойчивостью к 5 и более лекарственным препаратам. Интенсивность эндогенного дыхания у стафилококков 1-й группы составила в среднем $38 \pm 0,5$ нМ O_2 /мин·мг, для культур 2-й группы средний показатель составил $48 \pm 0,7$ нМ O_2 /мин·мг, у штаммов 3-й группы – $53 \pm 0,8$ нМ O_2 /мин·мг. У штаммов 4-й группы уровень дыхательной активности был наивысшим – $87 \pm 1,3$ нМ O_2 /мин·мг. Можно заключить, что формирование механизмов антибиотикоустойчивости вызывает интенсификацию энергетических процессов в микробных клетках в результате адаптации к условиям существования в присутствии антимикробных препаратов.

На следующем этапе исследований получены в результате селекции чувствительных к антибиотикам клинических штаммов стафилококков ряд вариантов, устойчивых к исследуемым антимикробным препаратам (рис. 2).

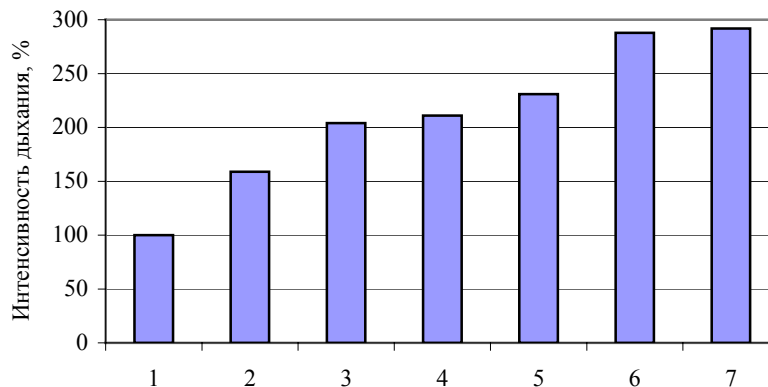


Рис. 2. Изменение скорости окислительных процессов у селекционированных вариантов стафилококков: интенсивность дыхания исходных чувствительных штаммов (1), штаммов, устойчивых к фторхинолонам (2), цефалоспорином (3), бензилпенициллину (4), эритромицину (5), аминогликозидным препаратам (6) и тетрациклину (7).

При определении интенсивности эндогенного дыхания у селекционированных вариантов наблюдалось увеличение скорости окислительных процессов. У стафилококков, устойчивых к бензилпенициллину, интенсификация процессов эндогенного дыхания составила в среднем 211 % по сравнению с чувствительными вариантами, у штаммов, устойчивых к эритромицину, – 231 %, у штаммов, устойчивых к аминогликозидным препаратам, – 288 %, у штаммов, устойчивых к цефалоспорином, – в среднем 204 %, у штаммов, устойчивых к препаратам тетрациклинового ряда, – 292 %, у штаммов, устойчивых к фторхинолонам, – в среднем 159 %.

Таким образом, существует определенная взаимосвязь процессов энергетического метаболизма в клетках стафилококков с развитием антибиотикоустойчивости к химиотерапевтическим препаратам.

Заключение

По результатам проведенных исследований можно констатировать, что в группе пациенток с привычным невынашиванием беременности штаммы стафилококков выделялись с высокой частотой, причем 63 % из них были устойчивы более чем к 5 антимикробным препаратам. Широкая циркуляция полирезистентных вариантов стафилококков, вероятно, может оказывать влияние на течение и исход беременности, а также составлять угрозу для здоровья новорожденных в процессе колонизации представителями микрофлоры матери организма ребенка во время родов и последующего грудного вскармливания.

Библиографические ссылки

1. Анкирская А. С. Микроэкология влагалища и профилактика акушерской патологии // Акушерство и гинекология. – 2000. – Т. 1, № 3. – С. 1–9.
2. Баев О. Р. Резидентная микрофлора генитального тракта и этиология инфекционных осложнений беременности и послеродового периода / О. Р. Баев, А. Н. Стрижаков // Акушерство и гинекология. – 1997. – № 6. – С. 3–13.

3. **Башмакова М. А.** Инфекционная и бактериальная колонизация урогениталий у беременных, влияние на течение беременности, плод и новорожденного ребенка / М. А. Башмакова, Н. Б. Кошелева // Акушерство и гинекология. – 1995. – № 1. – С. 15–18.
4. **Бухарин О. В.** Персистенция патогенных бактерий: теория и практика // ЖМЭИ. – 2000. – № 4. – С. 47–49.
5. **Демидова Е. М.** Ведение женщин с привычным невынашиванием беременности и хроническим эндометритом / Е. М. Демидова, А. С. Анкирская // Акушерство и гинекология. – 1996. – № 4. – С. 45–47.
6. **Дерябин Д. Г.** Вирулентность и персистенция стафилококков: фенотипические проявления и механизмы генетического контроля / Д. Г. Дерябин, И. А. Шагинян // ЖМЭИ. – 2000. – № 4. – С. 36–43.
7. **Крисенко О. В.** Активність ферментів циклу трикарбонових кислот у стійких та чутливих до антибіотиків штамів *Neisseria gonorrhoeae* / О. В. Крисенко, А. І. Вінніков // Мікробіологічний журнал. – 2004. – Т. 66, № 6. – С. 3–9.
8. **Кулаков В. И.** Современные принципы антибактериальной терапии в акушерстве, гинекологии и неонатологии // Акушерство и гинекология. – 2002. – № 4. – С. 3–6.
9. **Приказ** Министерства здравоохранения СССР «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений от 22.04.1985 г.
10. **Скляр Т. В.** Источники конвертируемой энергии у *Neisseria gonorrhoeae* / Т. В. Скляр, А. И. Винников // Мікробіологічний журнал. – 2004. – Т. 66, № 5. – С. 23–29.
11. **Шубитидзе А. Е.** Антибиотикочувствительность госпитальных штаммов стафилококков / А. Е. Шубитидзе, И. А. Маруашвили // Антибиотики и химиотерапия. – 1995. – № 8. – С. 25–27.
12. **Tomkins C.** The composition of vaginal flora. Normality and pathology // Women health. – 2000. – June. – P. 4–7.

Надійшла до редколегії 01.03.06.

УДК 631.4:634.9

А. Е. Пахомов, Л. В. Грачева

Днепропетровский национальный университет

ВЛИЯНИЕ РОЮЩЕЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КРОТА (*TALPA EUROPAEA*) НА ПОЧВЕННУЮ МИКРОФЛОРУ ПРИ ЗАГРЯЗНЕНИИ ПОЧВЫ КАДМИЕМ

Охарактеризовано вплив рийної діяльності крота (*Talpa europaea*) на кількість і розповсюдження ґрунтових мікроорганізмів в умовах забруднення ґрунту кадмієм. Встановлено, що рийна активність ссавців є важливим природним екологічним чинником, що сприяє відновленню та розвитку мікрофлори в умовах забруднення.

Influence of fossorial activity of European mole *Talpa europaea* on number and distribution of soil microorganisms under conditions of cadmium pollution of the soil is characterized. Mammals' fossorial activity is an important natural ecological factor that contributes to microflora rehabilitation and development under conditions of contamination.

Введение

Роющая деятельность животных как средообразующий фактор является объектом изучения для многих исследователей – зоологов, почвоведов и экологов [3–5]. Роющая активность млекопитающих является одним из наиболее распростра-

© А. Е. Пахомов, Л. В. Грачева, 2006