

УДК 537.31:576.8

РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС МЕТОДА ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИСМП**Козлов Л.Б., Ефимов В.В., Диц Е.В., Санников А.Г., Бутков И.И.***ГБОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия»,
Тюмень, e-mail: kozlov@tyumsma.ru*

На основании показателей электрического сопротивления бактерий разработан метод предэпидемической диагностики внутрибольничных инфекций. Объектом изучения служили спорадические и госпитальные штаммы бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*) выделенные от больных, находящихся на лечении в лечебно-профилактических учреждениях г. Тюмени. В популяциях возбудителей инфекционных заболеваний выделенных в чистом виде в результате стрессового воздействия низкой температуры представилось возможным выделить изолированные колонии некультивируемых возбудителей инфекционных заболеваний. В исследуемом материале концентрация некультивируемых бактерий превышала концентрацию бактерий выделенных общепринятыми лабораторными методами микробиологических исследований. Разработан микробиологический способ получения изолированных колоний некультивируемых бактерий, а также способ индикации культивируемых бактерий в лабораторных условиях и бактерий, обладающих некультуральными свойствами на основании изучения показателей их электрического сопротивления. Предложенный способ представляется возможным использовать в качестве предэпидемической диагностики инфекционных заболеваний, связанных с оказанием медицинской помощи.

Ключевые слова: бактерии, электрическое сопротивление, некультивируемые бактерии, предэпидемическая диагностика

EXPRES METOD FOR INDICATION INFECTION ISMP**Kozlov L.B., Efimov V.V., Dic E.V., Sannikov A.G., Butkov I.I.***The Tyumen state medical academy, Tyumen, e-mail: kozlov@tyumsma.ru*

On the basis of indicators of electric resistance of bacteria the method of preepidemic diagnostics of intrahospital infections is developed. Object of studying served sporadic and hospital bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*) allocated from the patients who are being on treatment in of Tyumen. In populations of activators of infectious diseases allocated in the pure state as a result of stressful influence of low temperature it was presented possible to allocate the isolated colonies of not cultivated activators of infectious diseases. In an investigated material concentration of not cultivated bacteria exceeded concentration of bacteria of the microbiological researches allocated by the standard laboratory methods. The microbiological way of reception of the isolated colonies of not cultivated bacteria, as well as way of indication of cultivated bacteria in laboratory conditions and the bacteria possessing not cultivated properties on the basis of studying of parameters of their electric resistance is developed. The offered way is obviously possible for using as preepidemic diagnostics of the infectious diseases connected with rendering of medical aid.

Keywords: bacteria, the electric resistance, not cultivated bacteria, preepidemic diagnostic

Одной из основных причин роста заболеваемости внутрибольничными инфекциями (ВБИ) является селекция и формирование госпитальных штаммов, обладающих высокой вирулентностью и множественной лекарственной устойчивостью [4]. Известно значительное количество факторов, влияющих на генетическую и фенотипическую изменчивость микроорганизмов. Меняющиеся условия окружающей среды вызывают у бактерий состояние стресса, в результате которого меняется способность бактерий размножаться на питательных средах [10]. Под воздействием стрессовых факторов окружающей среды, влияющих на культуральные свойства бактерий, иногда даже значительное количество бактерий могут переходить в жизнеспособное некультуральное состояние [1, 2, 9]. Установлено, что значительное количество бактериальных клеток, обладающих жизнеспособными патогенными свойствами, не размножаются в лабораторных условиях [12]. Так, при использовании стандартных микробиологических методов исследова-

ний проб морской воды только 0,01-0,1% бактерий культивировались в лабораторных условиях [11].

Итак, анализ данных периодической литературы свидетельствует, что в ряде случаев под воздействием стрессовых факторов бактерии могут терять способность размножаться в лабораторных условиях на питательных средах. Возможно, это состояние можно сравнить с анабиозом, когда микробные клетки остаются жизнеспособными, но теряют способность культивироваться в лабораторных условиях.

Проведенные нами исследования в предыдущие годы свидетельствуют, что бактерии на своей поверхности, в зависимости от поверхностного химического состава микробных клеток, в жидкой среде имеют ионогенные группировки, влияющие на изменение показателей электрического сопротивления растворов в зависимости от вида бактерий и их концентрации [3, 6, 7, 8]. Поэтому разработка методов выделения некультивируемых бактерий из микробных популяций, вызывающих патологический

процесс в восприимчивых организмах, и изучение возможности их индикации по результатам определения показателей электрического сопротивления растворов, содержащих взвесь бактерий (возбудителей инфекционных заболеваний) является актуальным. Определение электрического сопротивления взвеси бактерий не требует материальных затрат и является экспресс-методом, основанным на электрокинетических свойствах микробных популяций. Разработка данного экспресс-метода позволит ускорить процесс эпидемиологического расследования вспышек инфекционных заболеваний, своевременно проводить противоэпидемические мероприятия при возникновении инфекций связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) [5], а также качественно и своевременно осуществлять лечебно-профилактические мероприятия у пациентов с инфекционной патологией.

Цель исследования – определить возможность использования экспресс-метода индикации бактерий по величине показателей электрического сопротивления взвеси бактерий в жидкой среде для выявления культивируемых и некультивируемых бактерий в лабораторных условиях.

Задачи исследований

1. Разработать способ выделения некультивируемых бактерий в лабораторных условиях из микробных популяций возбудителей инфекционных заболеваний.

2. Разработать принципиальную схему устройства для накопления некультивируемых бактерий в лабораторных условиях.

3. Провести анализ показателей электрического сопротивления взвесей культивируемых и некультивируемых бактерий в жидкой среде.

4. Дать сравнительную характеристику показателей электрического сопротивления в жидкой среде популяций культивируемых и некультивируемых бактерий, вызывающих в восприимчивом организме инфекционный процесс.

5. Определить возможность использования электрического сопротивления взвеси бактерий в жидкой среде для предэпидемической диагностики ИСМП.

Материал и методы исследования

Объектом изучения служили спорадические и госпитальные штаммы бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, выделенных от больных, находящихся на лечении в ЛПУ г. Тюмени. Некультивируемые бактерии в лабораторных условиях получали следующим способом: провели посев исследуемого материала на скошенный мясопептонный агар (МПА) для накопления микробной взвеси. Из культуры бактерий, выросших на МПА, по стандарту мутности в 5 единиц, соответ-

ствующей 500000 мк в 1 мл, получали взвесь бактерий, из которой готовили серийные разведения до 10^7 . Для определения количества культивируемых бактерий в лабораторных условиях, содержащихся в приготовленных серийных разведениях, проводили посев микробов на плотную селективную питательную среду для получения изолированных колоний, а затем определяли концентрацию микробной взвеси.

Серийные разведения культивируемых бактерий в разведениях до 10^7 степени выдерживали 48 часов при $+4^\circ\text{C}$, а затем определяли концентрацию бактерий по результатам посева бактерий на чашки Петри с селективной питательной средой для данного вида бактерий. Предложенный способ позволил выделить некультивируемые бактерии в лабораторных условиях (Зарегистрирована в ФГБУ ФИПС заявка на изобретение № 2011146052 от 14.11.2011 «Способ выделения некультивируемых бактерий стафилококка»). Для определения электрического сопротивления культивируемых и некультивируемых бактерий использовали устройство с параметрами измерения от 500 до 2000 кОм. Для разведения микробных взвесей использовали физиологический раствор хлорида натрия. Электрическое сопротивление данного растворителя составило $681,8 \pm 34,2$ кОм.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что в чистой культуре бактерий выделяемых в лабораторных условиях имеется значительное количество некультурабельных бактерий. В исследуемых популяциях бактерий, стандартизированных по стандарту мутности в 5 единиц, концентрация культивируемых бактерий составила 10^5 степени, а концентрация бактерий некультивируемых в лабораторных условиях составила 10^7 степени. Культивируемые и некультивируемые бактерии в лабораторных условиях обладали различными показателями электрического сопротивления и при минимальных концентрациях (10–15 микробных клеток) в зависимости от вида микроорганизма электрическое сопротивление некультивируемых бактерий превышало электрическое сопротивление культивируемых бактерий на 100–300 кОм (табл. 1, 2). Итак, на показатели электрического сопротивления некультивируемых бактерий оказывает влияние вид возбудителя инфекционного заболевания. Даже незначительное количество некультивируемых бактерий *P.aeruginosa* (1–2 микробных клетки) повышало электрическое сопротивление растворителя (физиологический раствор хлорида натрия) на 358 кОм, что дает основание для использования электрического сопротивления некультивируемых бактерий для выявления наличия их на различных объектах больничных помещений и в организме бактерионосителей, что можно использовать для проведения предэпидемической диагностики инфекционных заболеваний.

Таблица 1
Значения показателей электрического сопротивления бактерий в зависимости от концентрации культивируемых и некультивируемых бактерий *P. Aeruginosa* (штамм спорадический № 557)

Признаки	Показатели электрического сопротивления и количество бактерий в серийных разведениях						
Показатели электрического сопротивления (в кОм)	1039,0 ± 106,1	1208,0 ± 77,1	914,0 ± 34,1	868,3 ± 26,3	862,3 ± 25,6	844,3 ± 61,8	755,0 ± 30,7
Количество некультивируемых микробных клеток	1–2	10–21	200–218	–	–	–	–
Количество культивируемых микробных клеток	0	0–1	1–11	70–111	1110	11100	111000
Разведения микробной взвеси	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹

Таблица 2
Значения показателей электрического сопротивления бактерий в зависимости от концентрации культивируемых и некультивируемых бактерий *E.coli* (штамм спорадический № 209)

Признаки	Показатели электрического сопротивления и количество бактерий в серийных разведениях						
Показатели электрического сопротивления (в кОм)	944,0 ± 75,8	860,0 ± 47,8	832,0 ± 2,7	763,7 ± 14,0	766,0 ± 21,2	675,7 ± 1,4	752,0 ± 23,9
Количество некультивируемых микробных клеток	1–3	10–32	100–323	–	–	–	–
Количество культивируемых микробных клеток	0	0–1	1–15	60–159	1590	15900	159000
Разведения микробной взвеси	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹

Проведенные исследования показали, что стрессовое воздействие низкой температуры при +4 °С в течение 48 часов на некультивируемые бактерии создает условие для перехода их в культивируемое состояние и последующее культивирование бактерий при 37 °С позволяет накопить на электродах питательных средах некультивируемые бактерии в высоких концентрациях. Для накопления некультивируемых бактерий разработано устройство «Хладотермостат для выделения некультивируемых бактерий». В ФГБУ ФИПС подана заявка на полезную модель № 2012104891/20(007394) от 13.02.2012 г. Устройство снабжено цифровым программирующим устройством, обеспечивающим выделение и накопление в лабораторных условиях некультивируемых бактерий. Принципиальная схема хладотермостата представлена на рисунке.

Предложенное устройство позволяет из популяций возбудителей инфекционных заболеваний выделять некультивируемые бактерии в лабораторных условиях, что повысит эффективность лабораторной диагностики за счет выделения некультивируемых бактерий и уменьшит количество ложноотрицательных результатов лабораторных исследований.

Выделение некультивируемых бактерий при лабораторной диагностике инфекционных заболеваний позволит в полном

объеме выявлять ИСМП, циркулирующих в лечебно-профилактических учреждениях, а также позволит в более полном объеме проводить противоэпидемическое расследование при возникновении вспышек инфекционных заболеваний и более эффективно проводить расследование эпидемических вспышек и эффективно осуществлять противоэпидемические мероприятия, а также осуществлять эффективные противоэпидемические мероприятия, направленные на источник инфекционного заболевания.

Анализ показателей электрического сопротивления взвесей культивируемых и некультивируемых бактерий в жидкой среде показал, что показатели электрического сопротивления взвесей бактерий можно использовать для экспресс-индикации бактерий в жидкой среде при небольших концентрациях бактерий: от 1 до 20 микробных клеток в 1 мл раствора. Максимальную концентрацию бактерий в жидкой среде можно определить по показателям электрического сопротивления.

Используя цифровой мультиметр (Mini digital multimeter) марки M832 проведено определение электрического сопротивления взвеси бактерий от 1 до 2000 кОм. Параметры разрешающей способности прибора: 1 кОм и точностью ± 0,8% единиц счета, при максимальном напряжении на электродах 2,8 В. При максимальном показателе

электрического сопротивления в пределах 900–1500 кОм регистрировалась максимальная концентрация живых микробных клеток в процессе культивирования бактерий на питательных средах следующих видов бактерий: *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* и *Pseudomonas*

aeruginosa. Результаты проведенных исследований оформлены в виде заявки на изобретение № 2010118749 от 13.05.2010 г. По данной заявке вынесено решение экспертизы по существу ФГБУ ФИПС о выдаче патента на изобретение по заявке от 05.10.2011 г.

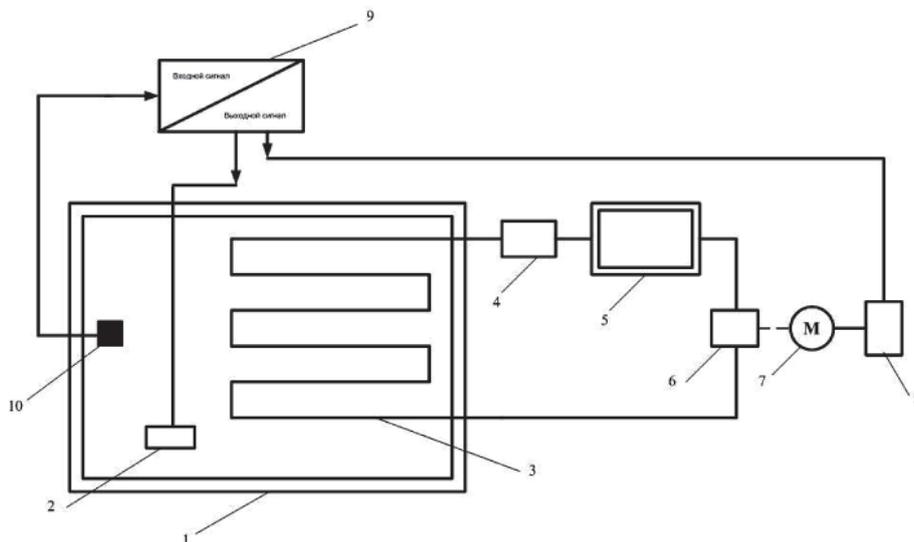


Схема устройства хладотермостата для накопления в селективной питательной среде некультивируемых бактерий.

Обозначения: 1 – рабочая камера хладотермостата; 2 – нагревательный элемент; 3 – охлаждающий змеевик; 4 – фильтр; 5 – испаритель; 6 – компрессор; 7 – приводной двигатель; 8 – пусковое защитное реле двигателя; 9 – цифровое программирующее устройство; 10 – датчик температуры

Установить корреляционной связи между нарастанием концентрации микробных клеток и увеличением или снижением показателей электрического сопротивления растворов, содержащих нарастающие концентрации бактерий не удалось.

Заклучение

На модели спорадических и госпитальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*, выделенных от больных, разработан способ и устройство для выделения и накопления некультивируемых бактерий в лабораторных условиях. Установлена возможность индикации в небольших концентрациях (1–20 микробных клеток) культивируемых и некультивируемых бактерий в лабораторных условиях с помощью экспресс-метода по определению электрического сопротивления взвеси бактерий в жидкой среде. Проведенные результаты исследований открывают новые возможности для диагностики инфекционных заболеваний, проведения эффективного специфического лечения и профилактики ИСМП, а также эпидемиологического расследования вспышек инфекционных заболеваний и предэпидемической диагностики инфекционных заболеваний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волянский Ю.Л. Некультивируемый стан аспорогенных бактерий: теоретичні аспекти проблеми та її практична значущість // Інфекційні хвороби. – 2004. – №1. – С. 5–9.
2. Головлев Е.Л. Другое состояние неспорулирующих бактерий // Микробиология. – 1998. – № 6. – С. 725–735.
3. Микробиологические аспекты электрического сопротивления бактерий / Л.Б. Козлов, А.М. Марченко, Е.В. Сперанская, В.В. Мефодьев, Ю.В. Устюжанин // Фундаментальные исследования. – 2010. – № 4. – С. 7–10.
4. Митрофанова Н.Н., Мельников В.Л., Слетов А.М. Результаты мониторинга видового состава и основных биологических характеристик микроценозов многопрофильного стационара // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион, 2009. – № 4. – С. 90–97.
5. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. – М.: Минздрав России, 2011. – 22 с.
6. Патент РФ № 2433186/10.11.2011. Бюл. № 31.
7. Патент РФ № 2324936/20.05.2008. Бюл. № 14.
8. Сперанская, Е.В. Электрическое сопротивление взвеси бактериальной культуры как индикатор эпидемических и спорадических штаммов шигелл / Е.В. Сперанская, Л.Б. Козлов, В.В. Мефодьев // Журн. микробиол. – 2008. – № 3. – С. 10–13.
9. Colwell R. R. Bacterial death revisited // Nonculturable microorganisms in the environment / – Ed. D. J. Grimes. – Washington, D.C.. ASM Press, 2000. – P. 325–342.
10. Rollins D., Colwell R. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – Vol. 52. – P. 531–538.
11. Kogure K., Simidu U., Taga N. Attemptative direct microscopic method for counting living marine bacteria // Can. J. Microbiol. – 1979. – V. 25. – P.415–420.
12. Staley J., Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats // Annu. Rev. Microbiol. – 1985. –Vol. 39 – P. 321–346.