

УДК 576. 8:537.31

НАУЧНО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БАКТЕРИЙ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ГОСПИТАЛЬНЫХ ШТАММОВ

Ефимов В.В.

*ГБОУ ВПО» Тюменская государственная медицинская академия»,
Тюмень, e-mail: kozlov@tyumsma.ru*

Изучены электрокинетические свойства *Pseudomonasaeruginosa*, *Staphylococcusaureus*, *Enterobactercloacae*, *Proteusmirabilis*, *Citrobacterfreundii*, *Hafniaalvei* по результатам измерения показателей электрического сопротивления. В зависимости от вида возбудителя инфекционного заболевания электрическое сопротивление бактерий колебалось в пределах от 1 до 2000 кОм. На основании показателей электрического сопротивления проведена дифференциация госпитальных и спорадических штаммов *P.aeruginosa*, *S.aureus* и *E.cloacae*. Установлено, что электрическое сопротивление бактерий зависит от вида бактерий и их концентрации в жидкой среде. На основании показателей электрического сопротивления и эпидемиологических данных (от одного источника инфекции регистрировалось 5 и более случаев заболеваний) выделенные штаммы были отнесены к госпитальным. Госпитальные штаммы *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.cloacae* имели электрическое сопротивление в пределах 579–674, 545–642 и 452–584 кОм соответственно, а спорадические штаммы *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.cloacae* имели более высокое электрическое сопротивление: 771–934, 690–790 и 684–806 кОм. Итак, показатели электрического сопротивления бактерий можно использовать в качестве дополнительного критерия для дифференциации спорадических и госпитальных штаммов бактерий.

Ключевые слова: бактерии, электрическое сопротивление, спорадические и госпитальные штаммы

SCIENTIFICALLY-METHODOLOGICAL APPROACHES OF USE OF ELECTROKINETIC PROPERTIES OF BACTERIA FOR INDICATION HOSPITAL STRAINS

Efimov V.V.

The Tyumen state medical academy, Tyumen, e-mail: kozlov@tyumsma.ru

Studied electrokinetic properties of *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* *Proteus mirabilis*, *Hafnia alvei* by measuring electrical resistance. Depending on the type of infectious disease resistance of bacteria ranged from 1 to 2000 cOm. Based on electrical resistance held hospital and sporadic strains differentiation of *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *E. cloacae*. Found that the electrical resistance of bacteria depends on the type of bacteria and their concentration in the liquid. Based on electrical resistance and epidemiological data (from one source of infection has been logged 5 or more cases) selected strains have been attributed to the hospital. Nosocomial strains of *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. cloacae* are electrical resistance within 579–674, 642–545 and 452–584 cOm respectively, and sporadic strains of *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. cloacae* had higher electrical resistance: 771–934, 690–790 and 684–806 cOm. So, the electrical resistance of bacteria can be used as an additional criterion to differentiate between sporadic and nosocomial strains of bacteria.

Keywords: bacteria, electric resistance, sporadic and nosocomial strains

Инфекционная заболеваемость, связанная с оказанием медицинской помощи (ИСМП), актуальна для всех экономически развитых стран и является причиной нетрудоспособности различных контингентов населения, приносит значительный экономический и социальный ущерб. В стационарах России ежегодно регистрируется около 2,5 млн больных с ИСМП, а экономический ущерб ежегодно достигает 10–15 млрд рублей [7].

В последние годы рост заболеваемости ИСМП обусловлен генетической и фенотипической изменчивостью микроорганизмов. Происходит селекция и формирование госпитальных штаммов, обладающих высокой вирулентностью и множественной лекарственной устойчивостью. Основной причиной возникновения госпитальных штаммов является нерациональное проведение лечебно-профилактических мероприятий в ЛПУ. Как известно, для предупреждения

распространения ИСМП среди пациентов и персонала ЛПУ широко проводятся дезинфекционные мероприятия, которые также оказывают влияние на формирование госпитальных штаммов. Частота выделения госпитальных штаммов, устойчивых к дезинфицирующим растворам, в стационарах различного профиля колеблется от 9,5 до 25,0% в зависимости от вида используемого дезсредства [10]. Нерациональная тактика дезинфекции, неудачный подбор при ротации дезинфицирующих средств, использование средств с просроченным сроком годности являются причинами возникновения устойчивых к дезинфектантам различных штаммов микроорганизмов

При выявлении причин некачественного проведения текущей дезинфекции в ЛПУ г. Тюмени установлено, что 28,4% дезинфекционных растворов содержали заниженное количество дезинфицирующих веществ, 19,6% имели повышенное со-

держание активного компонента и только 51,9% дезинфицирующих средств отвечали требованиям, предъявляемым к дезрастворам, и применение таких растворов обеспечивало эффективное и качественное проведение текущей и заключительной дезинфекции. Таким образом, дезинфицирующие вещества в плане их подготовки по показателю активности плохо контролируются, при этом зачастую происходит использование заниженных концентраций препаратов. Под влиянием стрессовых факторов (антибиотики, дезинфектанты, перепады температуры и т.п.) бактерии могут переходить в жизнеспособное некультивируемое состояние в лабораторных условиях [5]. Формирование некультурабельных бактерий является одной из причин возникновения ложноотрицательных результатов исследований при проведении бактериологических исследований по стандартным методикам.

В работах Л.Б. Козлова с соавт. [2] установлено, что бактерии в жидкой среде обладают определенным электрическим сопротивлением. Теоретическое обоснование электрокинетических свойств бактерий нашло отражение в теориях: Г. Гельмгольца – Ж. Перена и М. Гуа – О. Штерна, согласно которым на поверхности биологических частиц, находящихся в жидкой среде, возникает двойной электрический слой типа конденсатора. Одна обкладка – заряженная поверхность биологической частицы, а другая – ионы, находящиеся в жидкости и несущие противоположный заряд. Двойной электрический слой биологических частиц образуется под влиянием двух противоположно действующих сил: электрического притяжения и теплового движения ионов. Электрическое притяжение обеспечивает большую концентрацию противоионов вблизи заряженной частицы, а молекулярное тепловое движение способствует их равномерному распределению во всем объеме суспендирующей среды [12].

В работах А.Д. Евтушенко [1] установлена возможность использования поверхностного электрического заряда микробных клеток для их дифференциации и концентрации. Е.В. Сперанская [11] при изучении репродуктивной активности спорадических и эпидемических штаммов шигелл установила, что 4–6-кратное увеличение электрического сопротивления в течение 1–6 часов роста бактерий в жидкой питательной среде свидетельствует о размножении в питательной среде госпитального штамма шигелл.

Итак, поверхностные структуры бактерий обладают электрокинетическими свойствами и в жидкой среде в поле посто-

янного электрического тока обладают определенным электрическим сопротивлением. В процессе репродуктивной активности бактерий меняются и показатели электрического сопротивления бактерий, что позволяет по величине электрического сопротивления бактерий в жидкой среде определять максимальную концентрацию бактерий [2].

В настоящее время в микробиологической практике для выявления циркуляции госпитальных штаммов широко используют методы идентификации микроорганизмов [3] с последующим эпидемиологическим маркированием, основанным на внутривидовой идентификации бактерий [7]. Основными недостатками применяемых методов идентификации госпитальных штаммов является длительность проведения лабораторных исследований (более 10 дней) по внутривидовой идентификации бактерий с дополнительными исследованиями по эпидемиологическому маркированию выделенных возбудителей инфекционных заболеваний.

Описан способ выявления госпитальных штаммов [8], согласно которому наличие госпитального штамма определяют по антибиотикограмме возбудителя инфекционного заболевания, выделенного от больного и с различных объектов больничных помещений. При совпадении антибиотикограмм микроорганизмов, выделенных от больного и объектов больничных помещений, выделенный штамм относят к госпитальным, если от одного источника инфекции возникло 3 и более случаев заболеваний. Недостатками предложенного метода является длительность проведения микробиологических исследований, не всегда удается выделить возбудитель инфекционного заболевания с объектов больничных помещений, дополнительным критерием является наличие вспышки инфекционного заболевания.

Анализ методов идентификации госпитальных штаммов свидетельствует об их сложности и необходимости значительных материальных затрат и времени на проведение лабораторных исследований. Практически результат лабораторных исследований от первых случаев заболеваний эпидемиологи получают в разгар эпидемической вспышки, что снижает необходимость проведения подобных лабораторных исследований. Поэтому разработка дешевых экспресс-методов индикации госпитальных штаммов микроорганизмов, основанных на физико-химических свойствах поверхностных структур микроорганизмов, является весьма актуальным.

Цель исследования – разработать экспресс-способ индикации госпитальных

штаммов микроорганизмов на основании изучения электрокинетических свойств микробных клеток.

Задачи исследования

1. На модели *Pseudomonasaeruginosa*, *Staphylococcusaureus* и *Enterobactercloacae* изучить репродуктивную активность госпитальных и спорадических штаммов.

2. Определить сроки их максимальной репродуктивной активности возбудителей инфекции.

3. Выявить параметры показателей электрического сопротивления исследуемых бактерий в период их максимальной репродуктивной активности.

4. Выявить степень корреляции между концентрацией микробных клеток в жидкой среде и показателями электрического сопротивления взвеси бактерий.

Материал и методы исследования

Объектом изучения служили условно-патогенные бактерии, выделенные от больных, находящихся на лечении в ЛПУ г. Тюмени. Изучена репродуктивная активность спорадических и госпитальных штаммов: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Proteusmirabilis*, *Citrobacterfreundii*, *E. cloacae*, *Hafniaalvei*. Показатели электрического сопротивления выделенных штаммов определяли при следующей разрешающей способности прибора по регистрации электрического сопротивления взвеси бактерий в жидкой среде: 1–200, 1500–2000 Ом, 1–20, 150–200, 500–2000 кОм. Исследования проводили по следующей методике: по стандарту мутности на 5 единиц готовили суспензию бактерий на физиологическом растворе хлорида натрия в количестве 500000 мк в 1 мл, затем готовили десятикратные разведения бактерий. В каждом разведении определяли количество бактерий бактериологическим методом по результатам подсчета выросших изолированных колоний на плотной питательной среде и измеряли электрическое сопротивление в пределах 300–1000 кОм при максимальном напряжении на электродах 2,8 В. Электрическое сопротивление госпитальных и спорадических штаммов *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. cloacae* учитывали в период их максимальной репродуктивной активности. Для каждого исследуемого штамма предварительно определяли срок максимальной репродуктивной активности по результатам подсчета выросших изолированных колоний на плотной питательной среде.

По материалам проведенных исследований получен патент на изобретение «Способ индикации госпитальных штаммов *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. cloacae*» (Патент RU№2433186 от 10.11.2011 г. Бюл. №31). Способ индикации исследованных спорадических и госпитальных штаммов был апробирован на базе отделения общей микробиологии ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тюменской области».

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследований показали, что показатели электрического сопротивления бактерий в жидкой среде от 1 до 2000 кОм можно использовать для определения концентрации бактерий. Проведенный регрессионный анализ показал, что имеется высокая степень корреляционной связи между максимальной концентрацией бактерий и показателями электрического сопротивления взвесей бактерий ($r = 0,8$). Вероятность ошибки не превышает 0,001.

В период максимальной репродуктивной активности спорадических и госпитальных штаммов определяли электрическое сопротивление в пределах 400–1200 кОм. Для различных видов бактерий максимальная концентрация бактерий, накопленных в чистом виде, достигала 10^9 – 10^{12} степени. Такая концентрация достаточна для проведения идентификации бактерий при выделении возбудителей инфекционных заболеваний от больных. По вышеописанной методике проведена индикация госпитальных и спорадических штаммов *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. cloacae*.

Показатели электрического сопротивления бактерий коррелировали с эпидемиологическими данными. От одного источника инфекции регистрировалось 5 и более случаев инфекционных заболеваний вызванных идентифицированным госпитальным штаммом. Госпитальные штаммы по сравнению со спорадическими определялись при меньших показателях электрического сопротивления (таблица). Для бактерий *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. cloacae* эти показатели составили 579–674, 545–642, 452–584 кОм соответственно.

Показатели электрического сопротивления госпитальных и спорадических штаммов микробных взвесей (в кОм)

Вид микроорганизма	Период максимальной репродуктивной активности бактерий, ч	Электрическое сопротивление		Достоверность результатов
		спорадических штаммов	госпитальных штаммов	
<i>p. aeruginosa</i> ,	8	852,4 ± 81,6	626,1 ± 47,5	P < 0,05
<i>S. aureus</i>	12	740,5 ± 50,9	593,1 ± 48,5	P < 0,05
<i>E. cloacae</i>	8	739,8 ± 66,0	518,0 ± 66,0	P < 0,05

Из таблицы видно, что максимальная репродуктивная активность регистрировалась у *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. cloacae* в различные сроки (8–12 часов).

Анализ показателей электрического сопротивления бактерий в различных концентрациях показал, что минимальные концентрации бактерий в пределах до 10 микробных клеток в жидкой среде можно регистрировать по показателям электрического сопротивления. Показатели электрического сопротивления растворов, содержащих от 1 до 10 микробных клеток, отличались от электрического сопротивления растворителей, не содержащих бактерий. Установить зависимость между повышением концентрации микробных клеток в жидкой среде и изменением показателей электрического сопротивления растворов не удалось. Следовательно, по показателям электрического сопротивления взвесей бактерий не представляется возможным определять концентрацию бактерий в жидкой среде. Полученные данные свидетельствуют о возможности индикации бактерий с помощью предложенного экспресс-метода на различных объектах больничных помещений, на предприятиях общественного питания и пищевой промышленности для оценки соблюдения санитарно-гигиенического режима в плане микробной обсемененности в помещениях. Определение наличия микробных клеток в дезинфекционных растворах с помощью предложенного экспресс-метода позволит своевременно осуществлять браковку дезинфекционных средств, непригодных к употреблению. Весьма перспективно изучение электрического сопротивления различных видов бактерий в вегетативном и в различных физиологических состояниях, в частности для выявления некультивируемых бактерий в лабораторных условиях. Решение данной задачи открывает новые возможности для дальнейшего использования электрокинетических свойств бактерий в диагностике инфекционных заболеваний и эпидемиологическом расследовании вспышек инфекционных заболеваний.

Заключение

Проведенные исследования показали, что показатели электрического сопротивления бактерий можно использовать в качестве дополнительного критерия для дифференциации госпитальных и спорадических штаммов, вызывающих заболевания у людей. Возбудители инфекций относят к госпитальным штаммам на основании показателей электрического сопротивления и для эпидемиологических данных о регистрации

от одного источника инфекции 5 и более случаев заболеваний, вызванных данным возбудителем. Таким образом, предложенный экспресс-метод эпидемиологического маркирования микроорганизмов по показателям электрического сопротивления микробных взвесей.

Разработанный экспресс-метод индикации госпитальных штаммов позволит в кратчайшие сроки проводить эпидемиологическое расследование вспышек инфекционных заболеваний и своевременно проводить противоэпидемические мероприятия. Выявленное свойство бактерий в жидкой среде обладать определенным электрическим сопротивлением, обусловленным поверхностной биохимической структурой микробной клетки и ее обменом с окружающей жидкой средой, может найти применение для оценки соблюдения санитарно-гигиенического режима на различных объектах и для эпидемиологического расследования вспышек инфекционных заболеваний.

Список литературы

1. Евтушенко А.Д. Применение микроэлектрофореза для дифференциации возбудителей кишечных инфекций // *Лабор. дело*. – 1971. – № 4. – С. 234–237.
2. Козлов Л.Б. Микробиологические аспекты электрического сопротивления бактерий / Л.Б. Козлов, А.Н. Марченко, Е.В. Сперанская, В.В. Мефодьев, Ю.В. Устюжанин // *Фундаментальные исследования*. – 2010. – № 4. – С. 7–10.
3. Лабинская А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – М., Медицина, 1978. – 394 с.
4. Марченко А.Н., Козлов Л.Б., Ефимов В.В. Эпидемиологические аспекты изменчивости бактерий под влиянием дезинфектантов // *Медицинская наука и образование Урала*. – 2011. – № 3. – С. 38–39.
5. Марченко А.Н., Козлов Л.Б., Мефодьев В.В. Эпидемиологические аспекты изменчивости внутрибольничных штаммов микроорганизмов под влиянием стрессовых факторов // *Инфекционные болезни: материалы II Международного конгресса по внутрибольничным инфекциям*. – М., 2011. – С. 12–13.
6. Оценка влияния некоторых дезинфектантов на формирование атипичных штаммов микроорганизмов / А.Н. Марченко, Л.Б. Козлов, В.В. Мефодьев, Е.В. Сперанская, О.П. Маркова, В.В. Ефимов // *Дезинфекционное дело*. – 2010. – № 4. – С. 42–44.
7. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. – М.: Минздрав России, 2011. – 22 с.
8. Патент RU № 2245922, от 10.02.2005. – Бюл. № 4.
9. Прямухина Н.С., Морозова О.Т. Оценка внутрибольничной инфекции и микробной колонизации новорожденных с использованием эпидемиологического маркирования штаммов причастных микроорганизмов // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. – 1996. – № 3. – С. 24.
10. Саперкин Н.В. Комплексная характеристика чувствительности возбудителей различных инфекций к хлорсодержащим дезинфицирующим средствам: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Н. Новгород, 2010. – 24 с.
11. Сперанская Е.В. Эпидемиологическая и микробиологическая характеристика шигеллезов при спорадических заболеваниях и вспышках: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Омск, 2011. – 18 с.

12. Харамоменко С.С., Ракитянская А.А. Электрофорез клеток крови в норме и патологии. – Минск: Беларусь, 1974. – 143 с.

References

1. Evtushenko A.D. Primenenie mikrojelektroforeza dlja differenciacii vzbuditelej kishhechnyh infekcij // Labor. delo. 1971. no. 4. pp. 234–237.

2. Kozlov L.B. Mikrobiologicheskie aspekty jelektricheskogo soprotivlenija bakterij / L.B. Kozlov, A.N. Marchenko, E.V. Speranskaja, V.V. Mefod'ev, Ju.V. Ustjuzhanin // Fundamentalnye issledovanija. 2010. no. 4. pp. 7–10.

3. Labinskaja A.S.. Mikrobiologija s tehnikoj mikrobiologicheskikh issledovanij. M., Medicina, 1978, 394 p.

4. Marchenko A.N., Kozlov L.B., Efimov V.V. Jepidemiologicheskie aspekty izmenchivosti bakterij pod vlijaniem dezinfektantov // Medicinskaja nauka i obrazovanie Urala. 2011. no. 3. pp. 38–39.

5. Marchenko A.N., Kozlov L.B., Mefodev V.V. Jepidemiologicheskie aspekty izmenchivosti vnutribol'ничных shtammov mikroorganizmov pod vlijaniem stressovyh faktorov // Infekcionnye bolezni. Materialy II Mezhdunarodnogo kongressa po vnutribol'ничным infekcijam. M., 2011. pp. 12–13.

6. Marchenko A.N., Kozlov L.B., Mefodev V.V., Speranskaja E.V., Markova O.P., Efimov V.V. Ocenka vlijanija nekotoryh dezinfektantov na formirovanie atipichnyh shtammov mikroorganizmov // Dezinfekcionnoedelo. 2010. no. 4. pp. 42–44.

7. Nacionalnaja koncepcija profilaktiki infekcij, svjazannyh s okazaniem medicinskoj pomowi. M.: MinzdravRossii, 2011. 22 p.

8. Patent RU № 2245922, ot 10.02.2005. Bjul. no. 4.

9. Prjamuhina N.S., Morozova O.T. Ocenka vnutribol'ничnoj infekcii i mikrobnaj kolonizacii novorozhdennyh s ispolzovaniem jepidemiologicheskogo markirovanija shtammov prichastnyh mikroorganizmov // Jepidemiologijaiinfekcionnyebolezni. 1996, no. 3. pp. 24.

10. Saperkin N.V. Kompleksnaja harakteristika chuvstvitelnosti vzbuditelej razlichnyh infekcij k hlorsoderzhawim dezinficirujuwim sredstvam. Avtoref. dis. kand. med. nauk. N. Novgorod, 2010. 24 p.

11. Speranskaja E.V. Jepidemiologicheskaja i mikrobiologicheskaja harakteristika shigellezov pri sporadicheskikh zabolevanijah i vspyshkah. Avtoref. kand. med. nauk. Omsk. 2011. 18 p.

12. Haramomenko S.S., Rakitjanskaja A.A. Jelektroforez kletok krovi v norme i patologii. Minsk: Belarus, 1974. 143p.

Рецензенты:

Шаповалов П.Я., д.м.н., профессор, зав. кафедрой гигиены с основами экологии ГБОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г. Тюмень;

Мефодьев В.В., д.м.н., профессор, академик РАЕ, профессор кафедры медико-профилактического дела ФПК и ППС ГБОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г. Тюмень.

Работа поступила в редакцию 06.06.2012.