

УДК 616.34.022

БІОТИПУВАННЯ ЕНТЕРОТОКСИГЕННИХ СТАФІЛОКОКІВ

Петросова В.І.

Ужгородський державний університет, м. Ужгород

Розробка багаточисленних тестів для ідентифікації *Staphylococcus aureus*, успішне застосування специфічних методів профілактики та терапії (стафілококовий анатоксин, антистафілококовий гама-глобулін, стафілофаги та

інше) свідчать про безсумнівні успіхи у вивченні проблеми стафілококових інфекцій.

Але на фоні успішної боротьби з більшістю інфекційних захворювань, стафілококова інфекція на сучасному рівні все ще виглядає недостатньо

вивченою і представляє труднощі для діагностики та лікування. Повсюдне збільшення спалахів внутрішньо лікарняних інфекцій, зростання числа дисбактеріозів, етіологічним фактором яких є *Staphylococcus aureus* і, що особливо важливо, *Staphylococcus epidermidis*, які в останній час – рахують одним із основних факторів гнійно-запальних ускладнень при протезуванні клапанів серця, нейрохірургічних шунтів, ортопедичних протезів, при урологічних захворюваннях неонатальній патології.

Класифікація та видова ідентифікація представників роду *Staphylococcus* все ще не має надійних диференціальних тестів, що вкрай ускладнює визначення етіологічної значущості окремих видів стафілококів у виникненні патологічних процесів. До цього часу клініцисти не дуже хвилює біологічне різноманіття стафілококів, крім того, більшість науковців вважає, що коагулазонегативні види стафілококів не мають великого значення у виникненні різноманітних патологічних процесів, що ще більш загострює актуальність даної проблеми [1, 7, 13]. Найменш розробленим залишається також питання про стафілококові ентеротоксини. Основною перешкодою до цього, в останній час, була відсутність достеменних біологічних тестів для виявлення ентеротоксинів, придатних для широкого лабораторного відтворення. На протязі ряду десятиліть наявність ентеротоксинів визначалось тільки в дослідях *in vivo*-на кошенятах, кішках, мавпах-тваринах, малопродатних для практичних лабораторій.

Крім того, більшість науковців дотримується думки, що ентеротоксигенна активність властива тільки культурам, які відносяться до *Staphylococcus aureus* [14], не багаточисельні повідомлення містять інформацію про прямо пропорційну залежність токсинутворення та множинну стійкість до антибіотичних препаратів [15, 16], а також здібність утворювати ентеротоксигенними стафілококами активні препарати стафілоцинів [3, 8, 9, 11].

Враховуючи відоме протиріччя даних, приведених в роботах вітчизняних та закордонних авторів, про корелятивний зв'язок ентеротоксигенності з деякими біологічними тестами, характерними для роду *Staphylococcus* і той факт, що в останні роки майже не проводились комплексні дослідження по вивченню ентеротоксигенних стафілококів ізольованих на території Закарпаття, ми провели визначення "диференціюючих" можливостей окремих біотестів.

При цьому враховували, що деяке число штамів *Staphylococcus aureus* може бути позбавлене коагулазної активності. Усі штами, які не відносяться до коагулазопозитивних були відокремлені нами, як представники угруповання коагулазонегативних стафілококів. Ідентифікація проводилась згідно з рекомендаціями Міжнарод-

ного комітету по таксономії стафілококів [10].

Матеріали і методи дослідження. В даній роботі представлені результати вивчення біотипування та ентеротоксигенних властивостей угруповання коагулазопозитивних і коагулазонегативних стафілококів, виділених від різних груп хворих (302 штами в гнійних хірургічних відділеннях, 327- від хворих опікового відділення, 176 - від хворих з кон'юнктивітами, 273 в урологічному відділенні, 206- від хворих пульмонологічного відділення, 379- при харчових отруєннях), із харчових продуктів (342 культури), та здорових людей (517штамів). На носійство ентеротоксигенних стафілококів, за загально-прийнятими методиками [2, 4], обстежували різні контингенти здорового населення: - медпрацівники пологового будинку, дитячої лікарні, студенти медичного факультету. В подальшому проведено визначення корелятивного зв'язку ряду біологічних ознак із здатністю продукувати ентеротоксини. Всі вивчені штами були типовими за морфологією мікробних клітин, володіли каталазною активністю та ферментували глюкозу в анаеробних умовах, що дозволило їх віднести до роду *Staphylococcus* [1, 7, 10, 13]. В досліді по визначенню ентеротоксигенної активності були використані антиентеротоксичні сироватки, які отримані нами при імунізації кролів високо очищеними препаратами ентеротоксинів [6]. Штами, досліджені на ентеротоксигенність, вирощували у целофанових мішечках у бульйоні Хоттінгера в 250 мл флаконах. Надосадову рідину досліджували на наявність ентеротоксинів за допомогою імунохімічних реакцій з моновалентними А,В,С,Д,Е антиентеротоксичними сироватками на предметних скельцях [5,6].

Обговорення результатів. Усього на базі баклабораторії біологічного факультету досліджено 1967 культури стафілококів, в тому числі 721 коагулазвід'ємний, виділених з різних джерел (табл.1). Згідно отриманим результатам 45,30 % бактеріальних культур, незалежно від джерела виділення та видової приналежності, продукували різні серотипи ентеротоксинів. Обстеження на носійство стафілококів здорових медпрацівників дозволило з'ясувати присутність ентеротоксигенних штамів на слизових оболонках носоглотки у 39,85 %, в той же час питома вага стафілококів, здатних продукувати ентеротоксини, ізолятів з патологічного матеріалу та мокротиння хворих складала 54,92%.

Подальші дослідження дозволили встановити співпадання фаготипів стафілококів виділених від хворих людей і медперсоналу, що можна рахувати за показник циркуляційного процесу в межах певного відділення, крім того в умовах стаціонару відтворювалися умови для широкого розповсюдження антибіотикостійких ентеротоксигенних полірезистентних стафілококів за рахунок селекційної переваги над чутливими до антибіотиків формами, що може призвести до

спалаху внутрілікарняної інфекції стафілокової етіології.

Відомо, що джерелом контамінації харчових продуктів є людина-носіє, тим більше, якщо вона хвора на різні гнійничкові процеси, особливо при локалізації їх на пальцях і долонях, що обумовлює аліментарний шлях інфікування з виникненням різноманітних розладів з боку шлунково-кишкового тракту. Аналіз результатів по визначенню рівня контамінації харчових продуктів штамами ентеротоксигенних стафілококів дозволив констатувати присутність їх у 28,60 %. Крім того, ентеротоксигенні стафілококи, як було з'ясовано нами, потрапляли у молочні продукти і від хворої худоби (гострі і хронічні мастити). Причиною харчових отруєнь стафілокової етіології були не тільки молочні продукти, але й м'ясо, яке імовірно забруднилося бактеріальною флорою за умов недотримання санітарно-гігієнічних правил забою худоби, зберігання та транспортування сировини.

У всіх виділених стафілококів, як коагулазопозитивних, так і коагулазонегативних визначали певні біологічні ознаки: продукцію гіалуронідази, лецитинази, гемолізину, теллури-редуктази, мурамідази, ТНК-ази, протеїнази, ДНК-ази, лізоциму, фосфатази, ацетилметил-карбінолу, а також ферментацію вуглеводів на напіврідких середовищах Гісса маніту в анаеробних умовах (табл. 2).

Порівняльний аналіз корелятивних зв'язків біологічних тестів з ентеротоксигенністю показав значний їх вираж та різні кількісні коливання як серед *Staphylococcus aureus*, так і серед угруповання коагулазові'ємних представників роду *Staphylococcus*. Звертав на себе увагу високий відсоток виявлення серед *Staphylococcus aureus* таких ознак як ДНК-аза, ТНК-аза, фосфатаза, теллуриредуктаза; у той час, як серед коагулазові'ємних присутність високої активності вище перерахованих тестових ознак була нехарактерним явищем.

Зрозуміло, що чим частіше зустрічається ознака серед коагулазові'ємних культур (або навпаки), тим менше даний тест придатний для міжвидової ідентифікації стафілококів, тому, необхідно було визначити критерії більш чіткої ідентифікації, враховуючи той факт, що відсутність пігменту, або плазмокоагулазної активності не може мати кардинального значення в якості ідентифікаційних тестів.

Серія наступних дослідів по вивченню біохімічної активності ізолюваних нами культур стафілококів дозволила відмітити деякі специфічні ознаки для коагулазові'ємних нездатність утилізувати манніт в анаеробних умовах (72,4%), в той час, як *Staphylococcus aureus* активно розкладали вказані вуглеводи. Звичайно, при використанні цих даних, достатньо проблематично визначити діагностичну цінність кожного окремого тесту, однак, на основі старанного

пошуку з усього різномаяття біологічних характеристик стафілококів достатньо вибрати декілька тест-ознак, які легко відновити в умовах практичних бак лабораторій, що дозволило б рекомендувати схеми типування ступеня ентеротоксигенності стафілококів, не загострюючи уваги на їх видову приналежність. Для того, щоб визначити найбільш характерні тести відносно ентеротоксигенності стафілококів, незалежно від їх видових характеристик, ми обчислили тетрагоричні зв'язки, коефіцієнт кореляції для альтернативне варіюючи даних з умовою, що середнє статистичне значення присутності кожної ознаки дорівнює 35,02 %. Таким чином, відсоток присутності ознаки нижче середньостатистичного, ми віднесли до ненадійних тестів визначення ентеротоксигенності представників роду *Staphylococcus*.

Аналіз отриманих нами даних дозволив визначити високу питому вагу протеїназної активності (73.9 %), властивості розщеплювати трегалозу і мальтозу з кінцевим значенням рН $\leq 5,0$ (95,8%) та утворювати ацетоїн (94,02%) Коагулазонегативні ентеротоксигенні стафілококи, крім того, швидко накопичували значну кількість біомаси в присутності 0,0006 % біотину та 0,001 % пантотенової кислоти. На підставі проведених досліджень наявність вище перерахованих ознак можна рахувати тестами, які можливо пов'язані з ентеротоксигенними властивостями коагулазонегативних стафілококів.

Виявлення ентеротоксигенної активності серед угруповання коагулазонегативних стафілококів (10,2 % від загальної кількості) спонукало необхідність проведення подальшого аналізу з метою визначення їх видових характеристик. Згідно отриманих даних більшість ентеротоксигенних стафілококів була віднесена до *Staphylococcus epidermidis*- 68.3%, в той час як інші види склали незначну частку ізолятів (*Staphylococcus saprophyticus* 2,6%, *Staphylococcus warneri* 1,2%, *Staphylococcus sciuri* 1,8%, *Staphylococcus xylosus* 3,2%, *Staphylococcus cohnii* 1,7%). Частка (22,1%) коагулазонегативних культур роду *Staphylococcus* не вкладалися у схему типових ознак певних видів і тому залишилися неідентифікованими. Неідентифіковані культур і у більшості випадків були ізолювані з харчових продуктів (48,2%) та від хворих людей (26,1 %), 52,3 % яких деполімеризували ДНК, однак були інертні відносно більшості вуглеводів, та стійкі до дії новобіоцину.

Подальші дослідження у серії послідовних експериментів були спрямовані на встановлення корелятивного зв'язку між ентеротоксигенністю та біологічними характеристиками *Staphylococcus aureus*. Звертає на себе увагу висока частота співпадання ентеротоксигенної, протеїназної, фосфатазної та ДНК-азної активностей серед *Staphylococcus aureus* різного походження. Коефіцієнт корелятивного зв'язку цих ознак склав

0,59, що свідчить про значний рівень кореляції.

З метою внутриводової ідентифікації проведено біотипування коагулазопозитивних стафілококів різного походження. Аналіз отриманих результатів дозволив 91,3% ізолятів клінічного походження віднести до підвиду- *hominis*, в той час як підвиди *hominis* серед культур *Staphylococcus aureus* виділених з харчових продуктів зустрічалися у 58,3%, до підвиду *bovis* віднесено 10,6%, решту культур не вдалося остаточно ідентифікувати.

Вивчення видового складу роду *Staphylococcus* дозволило визначити серед ентеротоксигенних культур, ізолятів харчових продуктів, присутність певних екологічних варіантів. Проведене біотипування з'ясувало, що 12,6 % культур належить до виду *Staphylococcus intermedius*, відносно виду *Staphylococcus hyicus* біотипування проводили на підставі наявності псевдокоагулазної

активності, відсутності ферментації маніту та теллуриредуктази, що надало можливість отримати позитивний результат у 2,2% штамів.

На заключення необхідно констатувати, що чіткого визначення біотипу ізольованих нами культур стафілококів досягти досить тяжко, однак проведення біотипування стафілококів різних екологічних варіантів надало можливість встановити ентеротоксигенні властивості у різних видів як коагулазопозитивних, так і коагулазонегативних культур, тому біотипування, і це особливо необхідно при вивченні ізолятів з продуктів харчування тваринного походження та випадках харчових токсикоінфекцій, надасть можливість визначити не тільки екологію, а й джерело та шляхи розповсюдження ентерококсигенних культур стафілококів.

Таблиця 1

Частота поширення ентеротоксигенності серед стафілококів різного походження

Групи обстежених	Кількість штамів абс. ч.	Ентеротоксигенних культур		P
		абс. ч.	%	
Хворі	1027	564	54,92	0,05
Здорові	517	206	39,85	0,01
Харчові продукти	423	121	28,60	0,05
Всього:	1967	891	45 30	0,05

Таблиця 2

Біотипування ентеротоксигенних стафілококів різного походження

Назва біологічного тесту	Кількість позитивних проб	
	Коагулаза +	Коагулаза -
	%	%
ДНК-аза	91 16	9,36
ТНК-аза	82 62	4,35
Теллуриредуктаза	88 87	15 73
Фосфатаза	93 76	25 10
Протеїназа	93 24	73 90
Ацетоїн	93 76	94 02
Лізоцим	79,50	24 70
Лецитіназа	76,17	20 71
Гіалуронідаза	78,15	22 13
Гемолізін α,β, δ	77,94	15,14
Фібринолізин	83 87	12 15
Мальтоза	93 76	95 81
Трегалоза	96 36	95 81
Маніт	97 91	7,57
Лактоза	97 19	44 82

ЛІТЕРАТУРА

1. Акатов А.К., Зуева В.С. Стафилококки. Москва, "Медицина". – 1983. – с.30
2. Акатов А.К., Хаттеневер М.Л. Коагулазоотрицательные стафилококки, выделенные от больных.. Сообщение П.. Видовое разнообразие штаммов. //ЖМЭИ.- 1981. - №3. – с.45 – 50
3. Бухарин О.В. Биометрические аспекты персистенции бактерий. //Ж.микроб. – 1994. - № 4. – с.4 – 12
4. Гладкова К.К., Семина Н.А. Лабораторные критерии диагностики кишечных заболеваний стафилококковой этиологии у детей. //Ж.гиг., эпид., микроб., иммун.- 1994.-№1.–с. 105–112

5. Залукаева В.И., Ладаний М.М. Изучение некоторых условий получения стафилококковых энтеротоксинов/Саратов. – 1976. – с.89 – 96
6. Залукаева В.И., Смеренская А.В. с соавт. Получение иммунных сывороток против стафилококковых энтеротоксинов А и В./Стафилококки и внутрибольничная инфекция. – Сб.АН СССР. – Москва – 1978. – с.94 – 95
7. Зуева В.С., Дмитриенко О.Д. с соавт. Метициллинрезистентные стафилококки// Ж.микроб.- 1988. – т.2. - № 4. – с.100 – 106.
8. Жукова Э.В., Резаева С.Е. с соавт. Частота и этиологическая структура внутрибольничных бактериальных инфекций в детском инфекционном стационаре//Ж.микроб.- 1992. - № 6. – с.72
9. Исаченко Л.М., Жаворонков А.А., Шуьин Ф.И. Персистенция бактерий//Ж.микроб.1991. - № 1. – с.4 – 12
10. Определитель бактерий Берджи.Москва. – Мир. – 1997. – с. 555 - 559
11. Поляк М.С., Особенности применения антибиотиков у детей //Антибиотики и химиотерапия. – 1990. – т.36. № 3. – с. 38 – 40
12. Петрушина Л.И., Колоснищина Я.И. Повышение эффективности метода фаготипирования стафилококков // Вопросы питания. – 1989. - № 2. – с.51 – 53
13. Флуер С.Й. Некоторые физико-химические, структурные и функциональные характеристики стафилококковых энтеротоксинов //Ж.микроб.- 1980. - № 12. – с.10 – 15
14. Daghistani HI, Issa AA, Shehabi AA Frequency of nasal and wound isolates of *Staphylococcus aureus* associated with TSST-1 production in Jordanian population. //: FEMS Immunol Med Microbiol.- 2000. - Feb;27(2). –p.:95. --98
15. Morishita Y, Tada J, Sato A, Toi Y, Kanzaki H, Akiyama H, Arata J Possible influences of *Staphylococcus aureus* on atopic dermatitis-- the colonizing features and the effects of staphylococcal enterotoxins. //: Clin Exp Allergy. - 1999. - Aug;29(8). –p.:1110-1117
16. Verdrengh M, Kum W, Chow A, Tarkowski A The effect of site-specific monoclonal antibodies directed to toxic shock syndrome toxin-1 in experimental *Staphylococcus aureus* arthritis. //: Clin Exp Immunol. - 1999. - Nov;118(2). – p.:268-270

SUMMARY

BIOTYPING OF ENTEROTOXIGENIC STAPHYLOCOCCI

V.I. Petrosova

Is conducted biotyping enterotoxigenic of the strains *Staphylococci*, chosen from various sources. Among coagulate negative of cultures majority enterotoxigenic *Staphylococci* 68.3 % concerned to a kind *Staphylococcus epidermidis*-, while other kinds made a minor part of cultures (*Staphylococcus saprophyticus* 2,6 %, *Staphylococcus warneri* 1,2 %, *Staphylococcus sciuri* 1,8 %, *Staphylococcus xylosus* 3,2 %, *Staphylococcus cohnii* 1,7 %). A part of cultures (22,1 %), chosen in main of articles of food to identify it was not possible. The analysis of specific structure coagulase positive of the representatives of a kind *Staphylococcus* because of biotypings has allowed certify presence *Staphylococcus intermedius* in 12,6 %, *Staphylococcus hyicus* 2,2 % of the strains.