

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 616.9-022.7:576.8.097.3

ГАВРИЛОВА
Ирина Александровна

**РЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ
СИНЕГНОЙНОЙ ПАЛОЧКИ И СТАФИЛОКОККОВ
К ДЕЗИНФЕКТАНТАМ: ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ
И НАНОСТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ КЛЕТОК**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук
по специальности 03.02.03 – микробиология

Минск 2015

Работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Научный руководитель: **Титов Леонид Петрович,**
доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент Национальной академии наук Беларуси, заведующий лабораторией клинической и экспериментальной микробиологии государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»

Официальные оппоненты: **Абаев Юрий Кафарович,**
доктор медицинских наук, профессор,
главный редактор журнала «Здравоохранение», профессор кафедры детской хирургии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет»

Генералов Игорь Иванович,
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой клинической микробиологии учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Оппонирующая организация: государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Защита состоится 4 мая 2015 года в 14⁰⁰ на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.04 при учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет», 220116 г. Минск, пр-т Дзержинского, 83, ауд. № 10, e-mail: rector@bsmu.by, тел. +375 17 272-55-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан «___» _____ 2015 года

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций Д 03.18.04,
кандидат медицинских наук, доцент



А. М. Дронина

ВВЕДЕНИЕ

Химическая дезинфекция – наиболее эффективное и общедоступное средство предупреждения возникновения и распространения нозокомиальных инфекций (Шандала М.Г., 2002; Ковалишена О.В., 2008). Однако широкое применение дезинфицирующих средств (ДС) привело к возникновению ряда проблем, важнейшей из которых является распространение вариантов бактерий с устойчивостью к дезинфектантам (Russell A.D., 2002; Гудкова Е.И., 2005; Ковалишена О.В., 2008; Горбунов В.А., 2010). Кроме того, в последние годы в ряде исследований делаются предположения о существовании возможной связи между резистентностью к ДС и антибиотикам (Karatzas K., 2008; Cummins J., 2009; Алексеева И.Г., 2010). Знания о механизмах приобретенной бактериальной резистентности к биоцидам варьируют от описания молекулярно-генетических основ её формирования до отсутствия достоверных представлений и лишь констатации наличия устойчивости (Cloete T.E., 2003; Благоднарова А.С., 2011).

Выбранные в качестве объекта исследования *P. aeruginosa* и *Staphylococcus spp.* – одни из доминирующих патогенов в этиологической структуре нозокомиальных инфекций (Osmon S., 2004; Абаев Ю.К., 2007; Hidron A., 2008; Ермакова Т.С., Титов Л.П., 2011; Ханенко О.Н., Римжа М.И., 2013). Имеет место не только повсеместное распространение этих возбудителей, но и рост частоты устойчивости к противомикробным средствам (Hidron A.I., 2008).

К теоретической проблеме необходимости выяснения механизмов устойчивости бактерий к ДС добавляется и ряд методологических проблем дезинфектологии. Для оценки эффективности дезинфектанта и определения чувствительности бактерий к биоцидам используются одни и те же методы, основанные на регистрации утраты бактериями способности к культивированию после воздействия ДС (Rutala W.A., 2000, Афиногенов Г.Е., 2002; Филонов В.П., 2003; Канищев В.В., 2006). Применение этих методов не дает представления о механизмах и закономерностях формирования резистентных и/или некультивируемых вариантов бактерий.

Использование ультрамикроскопических методов исследования позволит выявить особенности устойчивых и чувствительных к биоцидам бактерий, получить новые знания о морфофункциональных изменениях клеток под влиянием ДС. Изменения бактерий под воздействием сублетальных концентраций дезинфектантов вызывают интерес, так как не только дают представление о механизмах формирования устойчивости к ДС, но и могут быть использованы как маркеры для оценки жизнеспособности микроорганизмов в процессе испытания новых средств с антимикробной активностью, а также для определения чувствительности бактерий к биоцидам.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами и темами

Диссертационное исследование выполнено в рамках задания 1.2.31 ГПНИ «Медицина и фармация», подпрограмма «Фундаментальная и прикладная медицина» (№ гос. регистрации 20113021 от 06.09.2011, срок выполнения – 1 кв. 2011 г. – 4 кв. 2013 г.); отдельные этапы работы являлись частью научного исследования в рамках плановой темы научно-исследовательской работы кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» по теме «Молекулярно-генетические основы вирулентности условно-патогенных микроорганизмов и механизмы активации клеток иммунной системы при инфекционных и аллергических заболеваниях» (№ гос. регистрации 20071044 от 16.05.2007, срок выполнения – 01.01.2007–31.12.2011).

Цель и задачи исследования

Цель исследования: установить механизмы фенотипической адаптации клинических изолятов бактерий *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus spp.* к дезинфектантам и разработать критерии оценки ультраструктурных изменений бактерий и их способности к выживанию при воздействии дезинфицирующих средств.

Задачи исследования:

1. Изучить фенотипическую резистентность эталонных и клинических штаммов *P. aeruginosa* и бактерий рода *Staphylococcus* к широко используемым дезинфектантам и антибиотикам разных классов.
2. Оценить ультраструктурные различия чувствительных и резистентных к дезинфицирующим средствам бактериальных клеток синегнойной палочки и золотистого стафилококка с применением методов электронной и атомно-силовой микроскопии.
3. Разработать экспериментальную модель для изучения механизмов формирования индуцированной устойчивости бактерий к дезинфектантам, сопровождающейся изменениями морфологии клеток.
4. Установить изменения ультраструктуры и морфометрических параметров клеток синегнойной палочки под воздействием суббиоцидных концентраций дезинфектантов с помощью атомно-силовой и электронной микроскопии.

Объекты исследования: клинические изоляты синегнойной палочки (81 изолят) и стафилококков (93 изолята); типовая культура *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15412, типовая культура *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

Выбор объектов исследования обусловлен их значительной ролью в структуре возбудителей внутрибольничных инфекций и необходимостью изучения уровней и механизмов устойчивости этих бактерий к дезинфектантам.

Предмет исследования: фенотипы резистентности *P. aeruginosa* и *Staphylococcus spp.* к дезинфектантам и антибиотикам; механизмы формирования устойчивости бактерий к дезинфектантам (изменение культуральных свойств, ультраструктуры и морфометрических характеристик бактериальных клеток при воздействии различных концентраций дезинфектанта); признаки адаптации популяции бактерий и отдельных бактериальных клеток; выживаемость бактерий при действии средств химической дезинфекции.

Положения, выносимые на защиту

1. Клинические изоляты стафилококков и синегнойной палочки характеризуются значительным уровнем устойчивости к дезинфектантам, который варьирует в зависимости от источника выделения микроорганизма, его видовой принадлежности и активно действующего вещества биоцида.

2. Устойчивые к дезинфицирующим средствам изоляты стафилококков характеризуются умеренной резистентностью к антибиотикам, а дезрезистентные штаммы синегнойной палочки – высокими уровнями резистентности к антибиотикам. Взаимосвязь между множественной устойчивостью к дезинфектантам и полиантибиотикорезистентностью не выявлена. Установлена ассоциация между чувствительностью к дезинфектантам на основе четвертичных аммониевых соединений и антибиотикам – оксациллину, эритромицину и клиндамицину, а также между чувствительностью к дезинфектанту на основе альдегида и антибиотикам тетрациклину, ципрофлоксацину и рифампицину.

3. В результате многократного и длительного воздействия сублетальных концентраций дезинфектантов изначально чувствительная популяция синегнойной палочки приобретает резистентность к ним, что сопровождается изменением культуральных, морфологических и ультраструктурных свойств бактерий. Признаками фенотипической адаптации бактерий к дезинфектантам являются: округление клеток и атипичное деление, уменьшение размеров, преобладание подвижных форм бактерий, снижение извилистости клеточной стенки, выраженности периплазматического пространства, накопление включений.

4. Действие суббиоцидных концентраций дезинфектантов характеризуется критическими и субкритическими изменениями бактериальных клеток. Критический эффект дезинфектанта проявляется деструкцией поверхностных образований и генетического аппарата бактерий и, как следствие, утратой жизнеспособности. При субкритическом эффекте наблюдаются изменения ультраструктуры (изменение насыщенности цитоплазмы рибосомами,

формирование микропор в мембране), морфологических параметров (изменение размеров клеток) и наномеханических свойств (шероховатость поверхности) бактерий при частично разрушенном или неповрежденном нуклеоиде и сохранении способности к культивированию.

Личный вклад соискателя

Под руководством научного руководителя определены тема диссертационной работы, цель и задачи исследования, намечены методы и основные этапы работы. Соискатель самостоятельно проводила забор материала, выделяла и идентифицировала культуры микроорганизмов, определяла чувствительность бактерий к дезинфицирующим средствам и антибиотикам на базе лаборатории внутрибольничных инфекций научно-исследовательской части УО «Белорусский государственный медицинский университет» [1, 6, 7]. Проводила экспериментальные исследования по моделированию приобретенной резистентности бактерий к дезинфектантам, комплексную оценку модельных штаммов бактерий [2, 5, 8, 9]. При организационной и методологической помощи сотрудников лаборатории диагностики сочетанных бактериально-вирусных инфекций ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» освоены методы пробоподготовки к электронно-микроскопическим исследованиям. Автор самостоятельно модифицировала методику приготовления препаратов бактерий после воздействия дезинфектанта и принимала непосредственное участие в проведении ультрамикроскопических исследований: электронной микроскопии (вклад диссертанта – 85%) и атомно-силовой микроскопии (вклад диссертанта – 90%) [3, 4, 10]. Автором проведен анализ научных данных и обобщение полученных результатов, осуществлена их статистическая обработка, написаны все разделы диссертации, совместно с научным руководителем сформулированы выводы и практические рекомендации. На основании результатов исследования разработана инструкция на метод определения микро- и макромаркеров повреждения бактериальных клеток с целью оценки активности дезинфицирующих средств и их активно действующих веществ, утвержденная ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» [11].

Автор благодарит д-ра мед. наук, профессора Полещука Н.Н., канд. мед. наук, доцента Гудкову Е.И., канд. хим. наук Жавнерко Г.К. за организационную и методологическую помощь в проведении исследования.

Апробация результатов диссертации

Результаты работы доложены и обсуждены на: Всеукраинской научно-практической конференции «Внутрибольничные инфекции и методы определения механизмов резистентности их возбудителей к антимикробным препаратам» (Киев, 2010), научно-практической конференции молодых ученых

«Медицина ХХІ століття» (Харьков, 2010), научной секции БГМУ-2011 (Минск, 2011), областном семинаре «Актуальные вопросы профилактики инфекционных заболеваний» (Гомель, 2012), семинаре «Формирование системы мониторинга резистентности клинически значимых микроорганизмов к антибактериальным лекарственным средствам в организациях здравоохранения» (Минск, 2012), 66-й научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные проблемы современной медицины-2012», научно-практической конференции «Современные проблемы инфекционной патологии человека» (Минск, 2012), научно-практическом семинаре-тренинге «Інфекційний контроль у системі заходів щодо профілактики внутрішньолікарняних інфекцій у лікувально-профілактичних закладах» (Днепропетровск, 2012), научно-практической конференции молодых ученых «Медицина ХХІ століття» (Харьков, 2012), научной сессии БГМУ-2013 (Минск, 2013), юбилейной Республиканской научно-практической конференции, посвященной 90-летию образования кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии и 95-летию со дня рождения профессора А.П. Красильникова (Минск, 2013), Республиканской научно-практической конференции «Современные проблемы инфекционной патологии человека» (Минск, 2013), научной сессии БГМУ-2014 (Минск, 2014), научно-практическом семинаре «Резистентность бактерий к антибактериальным средствам и внедрение программы WHONET в практическом здравоохранении Республики Беларусь» (Минск, 2014), Республиканской научно-практической конференции «Современные проблемы инфекционной патологии человека» (Минск, 2014).

Опубликованность результатов диссертации. По материалам диссертационной работы опубликовано 10 печатных работ, в том числе 4 статьи в научных рецензируемых журналах общим объемом 2,64 авторского листа, 2 статьи в сборниках научных трудов и других научных изданиях, 4 публикации в сборниках материалов конференций и тезисов, 1 Инструкция по применению, утвержденная Ученым советом ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии».

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 136 страницах, включает 29 рисунков (8 страниц), 15 таблиц (7 страниц). Работа состоит из введения, аналитического обзора литературы, главы материалы и методы исследования (в т.ч. описание разработанной методики приготовления образцов бактерий после воздействия дезинфектантов для исследования с помощью атомно-силовой микроскопии), четырех глав собственных исследований, заключения, 3 приложений (21 страница), списка литературы. Библиографический список включает 248 источников, в том числе 46 русскоязычных работ и 191 зарубежную работу, 10 собственных публикаций соискателя, 1 Инструкцию по применению.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В соответствии с целью и задачами исследования была определена чувствительность клинических изолятов стафилококков (n=93) и синегнойной палочки (n=81), а также типовых культур *P. aeruginosa* и *S. aureus* к пяти дезинфектантам, зарегистрированным в Республике Беларусь – на основе пропанола, глутарового альдегида, дихлоризоциануровой кислоты, четвертичных аммониевых соединений (ЧАС), полигексаметиленгуанидина (ПГМГ). Чувствительность бактерий к ДС определяли суспензионным методом. В отношении 45 штаммов *P. aeruginosa* и 51 штамма стафилококков были проведены изучение и сравнительная оценка устойчивости к дезинфектантам и антибиотикам (АБ). Определение чувствительности к АБ проводилось с помощью автоматического бактериологического анализатора Vitek 2 Compact (анализировалась устойчивость к 10 антибактериальным препаратам).

Для решения задачи по изучению фенотипических изменений бактерий под воздействием дезинфектантов была разработана экспериментальная модель по формированию устойчивости *P. aeruginosa* к систематическим воздействиям суббиоцидных концентраций ДС. В качестве объектов модели было отобрано 20 штаммов *P. aeruginosa*, изначально чувствительных к исследуемым дезинфектантам в концентрации, рекомендуемой производителем в качестве бактерицидной (всего проведено 1400 серий опытов с применением различных концентраций).

Для оценки различий в морфологии бактериальных клеток с разным уровнем чувствительности к ДС были отобраны изоляты *S. aureus* (3 чувствительных и 7 устойчивых) и *P. aeruginosa* (5 чувствительных и 7 резистентных). Изучение ультраструктуры бактерий проведено с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) ультратонких срезов бактерий на электронном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония). Оценка морфометрических характеристик и наномеханических свойств поверхности *P. aeruginosa* с разным уровнем чувствительности к ДС проводили с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) в контактном режиме на воздухе на микроскопе Veeco («Nanoscope 3D», США).

Оценка влияния рабочей и суббиоцидных концентраций ДС на ультраструктуру и наномеханические свойства поверхности бактериальных клеток проведена на типовой культуре *P. aeruginosa* ATCC 15412. Препараты бактерий готовились по методике, оптимизированной автором [3]. Изменения морфометрических характеристик бактериальных клеток после воздействия биоцидов в различных концентрациях оценены минимум на 56 клетках *P. aeruginosa* (воздействие разведения $1/8$ рабочей концентрации), максимум

на 108 клетках бактерий-объектов исследования (контрольный образец, не подвергшийся действию ДС) с применением методов АСМ и ТЭМ. Для оценки выживаемости культуры после воздействия ДС отсевали на плотные питательные среды. Хранение культур осуществлялось в консерванте при -70°C .

Статистическая обработка данных выполнена с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Использовались параметрические и непараметрические методы анализа: для количественных переменных (количество выживших бактерий, размер бактериальных клеток, шероховатость поверхности бактерий) вычислялись среднее арифметическое значение (M) и стандартная ошибка среднего арифметического значения (m); относительные показатели (процент устойчивых и чувствительных изолятов) представлены как $P \pm m_p$. Для оценки достоверности в двух выборках применяли t-критерий Стьюдента, U-критерий Манна–Уитни. Для выявления зависимости между изучаемыми качественными признаками (наличие устойчивости к АБ и ДС) проводили корреляционный анализ Спирмена (r). Результаты всех этапов исследования признавались статистически значимыми, если уровень статистической значимости p (значение ошибки 1-го рода) не превышал 0,05 ($p < 0,05$).

Результаты собственных исследований

Устойчивость *Staphylococcus spp.* и *P. aeruginosa* к антибиотикам и дезинфицирующим средствам

Клинические изоляты стафилококков и синегнойной палочки характеризуются значительными уровнями устойчивости к дезсредствам из группы катионных поверхностно-активных веществ, широко применяемым в учреждениях здравоохранения (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика чувствительности / устойчивости клинических изолятов стафилококков и синегнойной палочки к дезинфектантам

Химическая группа дезинфектанта	Доля устойчивых и чувствительных к дезинфектанту штаммов ($\% \pm m_p$)			
	<i>Staphylococcus spp.</i> (n=93)		<i>P. aeruginosa</i> (n=81)	
	устойчивые	чувствительные	устойчивые	чувствительные
Спирты	3,2±1,8	96,8±1,8	1,2±1,2	98,8±1,2
Галогены	3,2±1,8	96,8±1,8	8,6±3,1	91,4±3,1
ЧАС	52,7±5,2	47,3±5,2	22,2±4,6*	77,8±4,6
Гуанидины	30,1±4,8	69,9±4,8	32,1±5,2	67,9±5,2
Альдегиды	2,2±1,5	97,9±1,5	17,3±4,2*	82,7±4,2

Примечание – * Отмечены статистически значимые различия показателя устойчивости стафилококков и синегнойной палочки к дезинфектанту ($p < 0,05$).

Удельный вес изолятов *P. aeruginosa*, устойчивых к дезинфектанту на основе альдегида, составил 17,3±4,2%, что статистически превышало ($p < 0,05$)

долю устойчивых к этому ДС штаммов стафилококков ($2,2 \pm 1,5\%$). Устойчивыми к ЧАС-содержащему ДС оказались $22,2\%$ штаммов *P. aeruginosa*, что достоверно ниже аналогичного показателя среди стафилококков ($p < 0,05$). Доля штаммов *P. aeruginosa* с резистентностью к двум и более дезинфектантам составила $19,8 \pm 4,4\%$, что недостоверно ниже, чем тот же показатель у стафилококков ($23,7 \pm 4,4\%$). Из полидезрезистентных штаммов стафилококков $68,2\%$ были выделены с объектов внешней среды стационаров. Все штаммы *P. aeruginosa* с выявленной множественной устойчивостью к ДС были выделены от пациентов.

Выявлена гетерогенность популяций стафилококков по признакам устойчивости к АБ и дезинфектантам. Доля полиантибиотикорезистентных штаммов превышала долю штаммов с множественной устойчивостью к дезинфектантам ($55,3 \pm 6,6\%$ и $23,7 \pm 4,4\%$ соответственно, $p < 0,05$). При анализе показателей чувствительности стафилококков в отношении отдельных АБ и дезинфектантов были выявлены ассоциации по этим признакам. Так, у стафилококков выявлена статистически значимая корреляционная связь средней силы между чувствительностью к дезинфектанту на основе ЧАС и к АБ эритромицину ($r = +0,58$) и клиндамицину ($r = +0,64$), слабая связь между чувствительностью к ЧАС и оксациллину ($r = +0,42$, $p < 0,05$). При сравнении чувствительности изолятов стафилококков к дезинфектанту на основе глутаральдегида и к ципрофлоксацину и тетрациклину также выявлена статистически значимая ($p < 0,05$) слабая корреляционная связь ($r = +0,43$, $r = +0,46$ соответственно) и сильная связь между чувствительностью к рифампицину и глутаральдегиду ($r = +0,81$, $p < 0,05$). При сравнении устойчивости стафилококков к ДС с активно действующим веществом ПГМГ и эритромицину выявлена обратная статистически значимая связь слабой силы ($r = -0,36$, $p < 0,05$).

Среди устойчивых к ДС *P. aeruginosa* отмечался высокий уровень устойчивости ко всем β -лактамам АБ. 100% исследованных штаммов были устойчивы к ампициллину и цефуроксиму, $94,4\%$ были устойчивы к ингибиторозащищенным пенициллинам. Минимальный процент устойчивых штаммов выявлен при изучении антибиотикорезистентности к тобрамицину. $73,7\%$ штаммов обладали чувствительностью к этому АБ. Среди изученных госпитальных штаммов синегнойной палочки взаимосвязи между признаками устойчивости к АБ и ДС не наблюдалось.

Экспериментальная модель изучения механизмов устойчивости бактерий к дезинфектантам

Закономерности формирования дезрезистентности изучались путём последовательного пассирования культур синегнойной палочки на плотных питательных средах при воздействии суббиоцидных концентраций ДС из группы ЧАС (ДС №1) и дезинфектанта на основе ПГМГ (ДС №2). Установлено, что воздействие на микроорганизм суббиоцидных концентраций

ДС способствует выживанию отдельных устойчивых клеток бактерий, при дальнейших пассажах уровни устойчивости к возрастающим концентрациям дезинфектантов увеличиваются, и формируется резистентность бактериальной популяции к данному дезинфектанту (таблица 2).

Таблица 2 – Динамика формирования устойчивости при воздействии дезинфицирующих средств в серии пассажей на примере образцов №№ 3 и 15

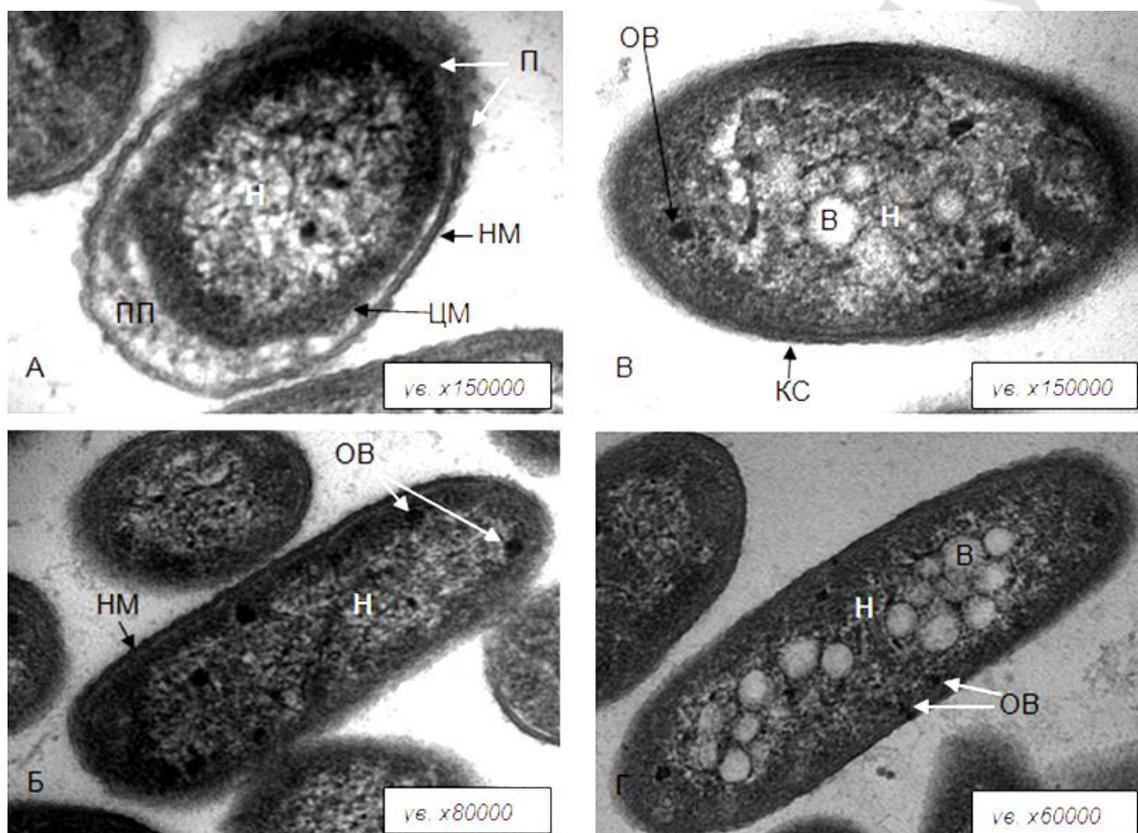
Концентрация дезинфектанта	Количество выживших бактериальных клеток при различных концентрациях дезинфектанта (КОЕ/мл)									
	Пассажи (штамм №3, ДС №1)					Пассажи (штамм №15, ДС №2)				
	1	10	15	20	25	1	10	15	20	25
Рабочая	0	0	0	$6,0 \cdot 10^3$	$4,0 \cdot 10^3$	0	0	0	0	$4,0 \cdot 10^3$
$1/2$	0	0	0	$1,7 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^3$	0	0	0	$1,7 \cdot 10^4$	$4,0 \cdot 10^3$
$1/4$	0	0	0	$2,4 \cdot 10^5$	$7,6 \cdot 10^4$	0	0	0	$2,4 \cdot 10^5$	$7,6 \cdot 10^4$
$1/8$	0	0	$2,5 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^4$	0	0	$2,5 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^4$
$1/16$	$2,3 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^5$	$>3,0 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^5$	$2,3 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^5$	$>3,0 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^5$
$1/32$	$1,9 \cdot 10^4$	$>3,0 \cdot 10^5$	$>3,0 \cdot 10^5$	$>3,0 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^4$	$>3,0 \cdot 10^5$	$>3,0 \cdot 10^5$	$>3,0 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^5$

Сроки приобретения устойчивости бактерий к ДС варьируют в зависимости от активно действующего вещества. При воздействии суббиоцидных концентраций ДС №2 отмечалось более медленное нарастание показателя дезрезистентности, чем к ДС №1 (приобретение устойчивости, соответственно, после 21 пассажа и 17 пассажей). В процессе формирования устойчивости к дезинфектанту отмечаются изменения культуральных свойств микроба. При сравнении колоний исходного и полученного в результате селекции штаммов, наблюдалось заметное уменьшение размеров колоний, они становились более влажными, слизистыми и блестящими, форма колоний и их цвет не изменились.

Ультрамикроскопические различия в строении *P. aeruginosa* и *S. aureus*, чувствительных и устойчивых к дезинфицирующим средствам

При изучении ультратонких срезов *P. aeruginosa*, чувствительных к биоцидам, внешние слои клетки просматриваются на всём протяжении. Клеточная стенка структурирована и состоит из наружной мембраны, связанной с подлежащим слоем пептидогликана (рисунок 1А). Наружная мембрана извилиста и представляет собой трёхслойную структуру: два электронно-плотных слоя разделены слоем меньшей электронной плотности. В наружной мембране просматриваются поры. Периплазматическое пространство выражено, у части клеток неравномерно расширено и заполнено гомогенной массой средней электронной плотности. В цитоплазматической мембране визуализируются наружный и внутренний осмифильные слои, между которыми расположен промежуточный слой средней электронной плотности. Область нуклеоида диспергирована, определяются тонкие фибриллы

хроматина. Цитоплазма клеток насыщена рибосомами. У 40% изученных клеток в цитоплазме наблюдалось наличие округлых включений с ультрамикроскопическими характеристиками волутиновых гранул, которые после окраски цитратом свинца визуализировались как округлые гомогенные тельца размером 0,05–0,2 мкм высокой электронной плотности, с чёткими краями, без видимой мембранной оболочки (рисунок 1Б).



НМ – наружная мембрана, П – поры, ПП – периплазматическое пространство, КС – клеточная стенка, ЦМ – цитоплазматическая мембрана, Н – нуклеоид, ОВ – осмифильные включения, В – вакуолеподобные структуры

Рисунок 1 – Ультратонкий срез клетки *P. aeruginosa*, чувствительной (А, Б) и резистентной (В, Г) к дезинфицирующим средствам

У резистентных к ДС *P. aeruginosa* внешние слои клеточной стенки уплотнены, тесно прилегают друг к другу. Наружная мембрана плотная, поры не выявлены, обнаруживаются везикулы наружной мембраны. Периплазматическое пространство одинаковой ширины, у части клеток не выявляется. Цитоплазматическая мембрана также уплотнена, отдельные слои не визуализируются (рисунок 1В). В области нуклеоида обнаруживаются плотные суперспирализованные фибриллы хроматина, у части изученных клеток область нуклеоида разрежена. По периферии цитоплазмы большинства резистентных бактерий регистрировались округлые осмифильные включения, а также электронно-прозрачные вакуолеподобные структуры в области нуклеоида, окруженные однослойной оболочкой (рисунок 1Г).

Оценка различий в строении клеток золотистого стафилококка с различным уровнем чувствительности к испытуемым ДС позволила заключить, что резистентность клинических изолятов связана с наличием внеклеточного капсулоподобного слоя. Различия на уровне цитоплазматических органелл (рибосомального аппарата, нуклеоида, мезосом) не обнаружены.

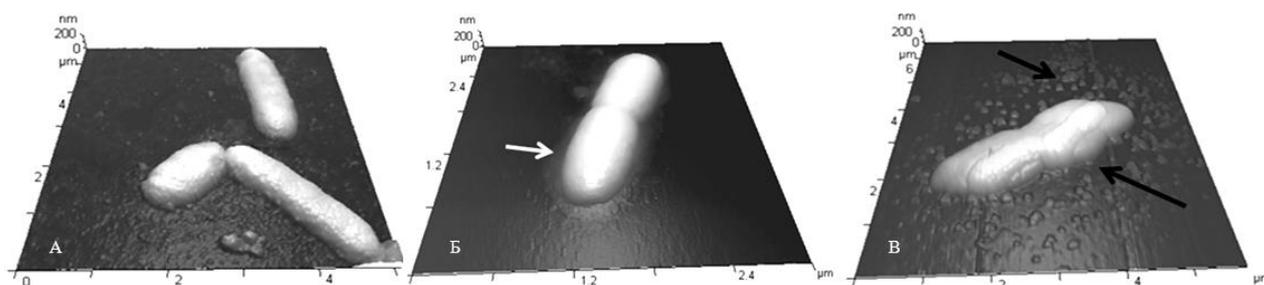
АСМ показывает наличие фенотипических различий между исходными чувствительными клетками синегнойной палочки и клетками с индуцированной резистентностью к ДС. В измененной при пассировании популяции отмечаются полиморфность и уменьшение размеров клеток, преобладание бактерий, имеющих жгутики. Средняя длина чувствительных бактерий достоверно превышала длину резистентных клеток (1,84–2,01 мкм и 1,46–1,59 мкм соответственно, $p < 0,05$). На АСМ-сканах, сделанных после десятого пассажа, отмечено атипичное деление клеток *P. aeruginosa* с образованием инвагинаций цитоплазматической мембраны в двух местах.

Морфофункциональные изменения клеток синегнойной палочки под влиянием различных концентраций дезинфицирующих средств

Ультрамикроскопическое изучение изменений морфологии бактерий синегнойной палочки при воздействии различных концентраций дезинфектанта на основе ПГМГ показало, что химическое вещество имеет несколько степеней действия. Применение дезинфектанта в рабочей концентрации вызывает тотальное разрушение клетки, в том числе с разрывом клеточной стенки. При действии суббиоцидных концентраций проявляются критические и субкритические эффекты действия дезинфектанта. Для критического действия ДС (в эксперименте – при действии $1/2-1/4$ от рабочей концентрации и ДС в рабочей концентрации) на бактериальную клетку характерна полная деструкция генетического аппарата и, как следствие, утрата бактериями жизнеспособности. При субкритическом воздействии наблюдается частичное / полное сохранение нуклеоида с сохранением способности культивироваться на питательных средах и возможной репарацией генома (разведения $1/8-1/16$). Кроме того, при ТЭМ ультратонких срезов было установлено, что действие ДС проявляется, прежде всего, в нарушении поверхностных образований бактерий. Это нарушение может носить тотальный характер (разрыв клеточной стенки) либо локальный характер и выражаться в появлении вздутий и микроповреждений в отдельных локусах клеточной стенки. Наличие микропор подтверждает фиксация красителя в цитоплазме клетки. Однако даже при сохранении клеточной стенки, наблюдаются изменения рибосомального аппарата и нуклеоида.

Использование АСМ позволило визуализировать и изучить изменения наноструктурных параметров при действии биоцида в разных концентрациях (рисунок 2). Морфология отдельных бактерий, не подвергшихся действию ДС

(контрольный образец), соответствовала типичной морфологии *P. aeruginosa*. При воздействии ДС в рабочей концентрации бактериальные клетки выглядели поврежденными, с сильно структурированной поверхностью, вокруг отдельных клеток и их скоплений регистрировались глобулярные образования, являющиеся, очевидно, детритом разрушенных бактериальных клеток. После воздействия ДС в разведении $1/4$ рабочей концентрации истечения клеточного содержимого во внешнюю среду не было выявлено. При воздействии $1/16$ рабочей концентрации ДС деструкции поверхностных слоев клеток не наблюдалось.



А – не подвергшиеся действию дезинфектанта; Б – воздействие ДС в суббицидной концентрации $1/4$ (стрелкой указано капсульное вещество); В – воздействие дезинфектанта в рабочей концентрации (поверхностные слои структурированы, стрелками указаны компоненты разрушенных бактериальных клеток)

Рисунок 2 – Трехмерные модели бактериальных клеток типовой культуры синегнойной палочки

Статистический анализ морфометрии и оценка наномеханических свойств поверхности клеток *P. aeruginosa* в контрольном и опытных образцах выявили существенные изменения данных параметров при воздействии дезинфектанта (таблица 3).

Таблица 3 – Размеры и шероховатость поверхности бактериальных клеток при воздействии различных концентраций ДС

Группы	Концентрация дезинфектанта	Морфологические параметры бактериальных клеток			Шероховатость (R) поверхности	
		длина (мкм)	ширина (мкм)	высота (нм)	Ra, нм	Rmax, нм
Опыт	Рабочая	2,73±0,21↑*	1,42±0,12↑	261,2±12,8	12,4±1,4↑	60,6 ↑
	$1/2$	2,08±0,13	0,97±0,09↑	257,5±19,0	8,9±0,3↑	27,8
	$1/4$	2,33±0,25	1,73±0,05	324,0±47,4	4,3±0,3↓	21,6 ↓
	$1/8$	1,94±0,11	0,67±0,06	318,7±17,5	4,4±0,2↓	26,9
	$1/16$	1,95±0,27	1,81±0,08	211,1±12,6↓	5,3±0,3	29,4
Контроль	–	1,91±0,16	0,71±0,04	280,3±11,3	5,9±0,2	28,8

Примечание – * Стрелками помечены статистически достоверное увеличение (↑) или уменьшение (↓) параметра по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

При этом наблюдалось достоверное увеличение продольных и поперечных размеров клеток синегнойной палочки после воздействия ДС в рабочей концентрации (длина клеток в исходном образце в среднем $1,91 \pm 0,16$ мкм, после обработки ДС в рекомендуемой концентрации средняя длина бактерий составляла $2,73 \pm 0,21$ мкм; $p < 0,05$). После воздействия дезинфектанта в разведении $1/2$ от рабочей концентрации наблюдалось статистически достоверное увеличение ширины клеток (на 33,6%) и уменьшение высоты бактерий при воздействии минимальной испытываемой сублетальной концентрации в 1,33 раза по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Важным проявлением повреждающего действия биоцида на поверхностные структуры бактериальной клетки явилось существенное изменение шероховатости клеточной стенки в опытных образцах по сравнению с контрольными. При этом обусловленное воздействием дезинфектанта нарушение трехмерной пространственной организации пептидогликана заключалось в более чем двукратном увеличении шероховатости клеток *P. aeruginosa* (до $12,4 \pm 1,4$ нм, против $5,9 \pm 0,2$ нм в контроле, $p < 0,01$). При снижении концентрации наблюдалось менее выраженное увеличение шероховатости, а при воздействии ДС в концентрации ниже $1/4$ показатели шероховатости были меньше, чем в контрольном образце, что можно объяснить как действием осмотического давления, так и синтезом капсульных полисахаридов в присутствии субоптимальных концентраций ДС.

На основании полученных результатов были установлены объективные критерии гибели бактериальных клеток под влиянием ДС: а) «излитие» клеточного содержимого, б) значительная структурированность поверхности клеточной стенки (двукратное увеличение шероховатости поверхности бактерий), в) изменение морфологических параметров («уплощение» клеток, увеличение длины клеток, увеличение ширины клеток более чем в два раза). Полученная информация и методические подходы рекомендуются для использования при разработке ДС, для изучения специфического эффекта и оценки повреждающего действия на бактериальные клетки [11].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Установлено, что госпитальные изоляты стафилококков и *P. aeruginosa* характеризуются значительными уровнями и частотой устойчивости к ряду дезинфектантов. Признак устойчивости к ДС характеризуется разнородностью не только в зависимости от активно действующего химического вещества дезинфектанта и видовой принадлежности микроорганизма, но и зависит также от источника выделения возбудителя внутрибольничной инфекции.

Наиболее высокий уровень резистентности среди стафилококков был выявлен к ДС на основе ЧАС (52,7% исследованных штаммов). Среди исследованных изолятов *P. aeruginosa* 32,1% были устойчивы к дезинфектанту из группы полигуанидинов. Наибольшей активностью в отношении стафилококков обладали хлорсодержащий и альдегидсодержащий дезинфектанты и дезинфектант на основе пропанола (96,8–97,9% чувствительных штаммов). Наибольшей активностью против синегнойной палочки отличался дезинфектант на основе пропанола (98,8% чувствительных штаммов). Удельный вес изолятов *P. aeruginosa*, устойчивых к дезинфектанту на основе альдегида, составил 17,3%, что статистически превышало ($p < 0,05$) долю устойчивых к этому ДС штаммов стафилококков (2,2%). Устойчивыми к ЧАС-содержащему ДС оказались 22,2% штаммов *P. aeruginosa*, что достоверно ниже аналогичного показателя среди стафилококков ($p < 0,05$). Доля штаммов *P. aeruginosa* с резистентностью к двум и более ДС составила 19,8%, что недостоверно ниже, чем тот же показатель у стафилококков (23,7%). Из штаммов *S. aureus* с множественной резистентностью к ДС 68,2% составили штаммы, выделенные при смывах с объектов внешней среды стационаров. Все штаммы синегнойной палочки с выявленной множественной устойчивостью к дезинфектантам были выделены от пациентов стационаров [1, 7].

2. Установлено отсутствие взаимосвязи между устойчивостью к ДС и полиантибиотикорезистентностью у изученных штаммов стафилококков ($n=51$) и *P. aeruginosa* ($n=45$). При анализе показателей чувствительности стафилококков в отношении отдельных антибиотиков и дезинфектантов были выявлены ассоциации по этим признакам. Так, у стафилококков выявлена статистически значимая ($p < 0,05$) корреляционная связь между чувствительностью к дезинфектанту на основе ЧАС и оксациллину ($r=+0,42$), эритромицину ($r=+0,58$) и клиндамицину ($r=+0,64$). При сравнении изолятов стафилококков, чувствительных к дезинфектанту на основе глутаральдегида и к ципрофлоксацину, тетрациклину и рифампицину также выявлена статистически значимая корреляционная связь ($r=+0,43$ $r=+0,46$ и $r=+0,81$ соответственно). Среди клинических изолятов синегнойной палочки взаимосвязи между признаками устойчивости к АБ и ДС не наблюдалось [6].

3. Разработана экспериментальная модель формирования индуцированной устойчивости *P. aeruginosa* к дезсредствам. Впервые в эксперименте доказана возможность формирования дезрезистентных вариантов бактерий из изначально чувствительных клинических изолятов *P. aeruginosa* при систематическом воздействии субингибиторных концентраций ДС. Установлено, что воздействие суббицидных концентраций дезинфектанта способствует выживанию отдельных устойчивых клеток бактерий, при дальнейших пассажах уровни устойчивости возрастают, и формируется резистентность бактериальной

популяции к этому ДС. При формировании устойчивости к дезинфектанту отмечаются изменения культуральных свойств микроба (изменение питательных потребностей, уменьшение размеров колоний, усиление слизееобразования) [5, 8].

4. Проведено комплексное изучение ультраструктуры бактериальных клеток синегнойной палочки и стафилококка с различным уровнем чувствительности к средствам химической дезинфекции ультрамикроскопическими методами исследования. Атомно-силовая и электронная микроскопии показывают наличие фенотипических различий между исходными чувствительными клетками *P. aeruginosa* и клетками культуры с индуцированной дезрезистентностью, полученной в результате эксперимента. Имеется вариабельность в морфологии и структурной организации клеток. В результате воздействия стрессовых факторов (ДС) клетки округляются, становятся меньше по размеру, преобладают подвижные формы бактерий, наблюдается атипичное деление [3, 5, 9].

У бактерий с разным уровнем чувствительности к биоцидам регистрируются морфологические различия как поверхностных слоёв бактериальной клетки (уменьшение извилистости клеточной стенки, выраженности периплазматического пространства, формирование везикул наружной мембраны), так и цитоплазматических включений. Значительное количество устойчивых к дезинфектантам клеток содержало электронно-прозрачные гранулы с характерными признаками включений поли- β -оксибутирата [2, 9].

5. Предложена методика приготовления образцов бактерий после воздействия биоцидов для исследований с применением ультрамикроскопических методов. Показана возможность использования АСМ и ТЭМ для оценки жизнеспособности бактериальной клетки и визуализации действия дезинфектанта. Впервые показано, что воздействие суббиоцидных концентраций ДС позволяет выявить критическую и субкритическую степени действия дезинфектантов. Критическое действие ДС на клетку характеризуется полной деструкцией генетического аппарата и, как следствие, утратой бактерией жизнеспособности (в эксперименте – при действии ДС в рабочей концентрации и разведениях в 2–4 раза). При субкритическом воздействии наблюдается частичное / полное сохранение нуклеоида с возможной репарацией генома и сохранением способности к культивированию на питательных средах (концентрации $1/8$ – $1/16$) [3, 4, 10, 11].

6. Установлены биологические маркеры жизнеспособности клеток, выявляемые при атомно-силовой микроскопии. Свидетельством гибели клеток являются: «излитие» клеточного содержимого; увеличение продольных и/или поперечных размеров бактериальных клеток на 35% и более в опытных

образцах по сравнению с контрольным; снижение высоты бактериальных клеток на 50% и более в опытных образцах по сравнению с контрольным образцом; выраженная структурированность поверхности бактерий, которая заключается в достоверном более чем двукратном увеличении шероховатости поверхностных образований бактерии. На основании результатов АСМ-исследований утверждена инструкция на метод определения микро- и макромаркеров повреждения бактериальных клеток с целью оценки активности дезинфицирующих средств и их активно действующих веществ [11].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Использовать экспериментальную модель формирования устойчивости микроорганизмов к дезинфектантам при поиске и разработке новых активно действующих веществ биоцидов, составлении их композиций, а также на этапе лабораторных испытаний ДС и при их применении в учреждениях здравоохранения для оценки закономерностей формирования устойчивости к дезинфектантам в условиях стационара, прогнозирования сроков возникновения резистентности, оценки влияния концентрации дезинфицирующих растворов на выживаемость микроорганизмов и коррекции режима дезинфекции.

2. При изучении госпитальных изолятов бактерий применять методы ультрамикроскопических исследований (АСМ, ТЭМ) с целью выяснения фенотипических признаков устойчивости и механизмов её формирования.

3. Применять Инструкцию на метод определения микро- и макромаркеров повреждения бактериальных клеток с целью оценки активности дезинфицирующих средств и их активно действующих веществ при испытании антимикробной активности ДС и при исследовании чувствительности / устойчивости бактерий к дезинфектантам на этапе лабораторных (регистрационных) испытаний [11]. Метод внедрен в лабораторную практику лаборатории клинической и экспериментальной микробиологии (акт о внедрении от 23.10.2014) и научно-инновационной лаборатории (акт о внедрении от 23.10.2014) ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии».

4. Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре микробиологии, вирусологии, иммунологии УО «Белорусский государственный медицинский университет» (акт о внедрении от 03.10.2014 «Новые знания об изменении ультраструктуры синегнойной палочки при воздействии дезинфицирующих средств на основе полигексаметиленгуанидина и четвертичных аммониевых соединений», акт о внедрении от 20.02.2015 «Новые методические подходы к оценке эффективности биоцидов и определению чувствительности бактерий к дезинфицирующим средствам»).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА

Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Гаврилова, И. А. Устойчивость госпитальных изолятов стафилококков и синегнойной палочки к дезинфицирующим средствам / И. А. Гаврилова, Л. П. Титов // *Здравоохранение*. – 2011. – № 11. – С. 18–20.

2. Гаврилова, И. А. Ультрамикроскопические различия в строении *Pseudomonas aeruginosa*, чувствительных и устойчивых к дезинфицирующим средствам на основе полигексаметиленгуанидина и четвертичных аммониевых соединений / И. А. Гаврилова, Л. П. Титов // *Весті Нац. акад. навук Беларусі. Серыя мед. навук*. – 2013. – № 4. – С. 13–20.

3. Гаврилова, И. А. Атомно-силовая микроскопия морфоструктурных изменений *Pseudomonas aeruginosa*, подвергшихся воздействию биоцида на основе алкилдиметилбензиламмония хлорида и полигексаметиленгуанидина / И. А. Гаврилова, Г. К. Жавнерко, Л. П. Титов // *Докл. Нац. акад. наук Беларусі*. – 2013. – Т. 57, № 5. – С. 81–87.

4. Микроструктурированные покрытия на основе пленок Ленгмюра-Блоджетт для направленной фиксации бактерий *Escherichia coli* / И. В. Парибок, Г. К. Жавнерко, В. Е. Агабеков, И. А. Гаврилова // *Весті Нац. акад. навук Беларусі. Серыя хім. навук*. – 2014. – № 2. – С. 41–44.

Статьи в сборниках научных трудов

5. Гаврилова, И. А. Оценка влияния суббиоцидных доз полигуанидина на морфометрические параметры колоний и бактериальных клеток *Pseudomonas aeruginosa* методом атомно-силовой микроскопии / И. А. Гаврилова, Л. П. Титов // *Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии; под ред. Г. М. Игнатъева*. – Минск, 2011. – Вып. 4. – С. 244–249.

6. Гаврилова, И. А. Сравнительная характеристика и взаимосвязь чувствительности/резистентности клинических изолятов бактерий рода *Staphylococcus* к антибиотикам и дезинфектантам / И. А. Гаврилова, Л. П. Титов // *Современные проблемы инфекционной патологии человека: сб. науч. тр. / Респ. науч.-практ. центр эпидемиологии; под ред. Л. П. Титова*. – Минск, 2013. – Вып. 6. – С. 134–140.

Материалы конференций и тезисы

7. Мониторинг устойчивости к дезинфектантам условно-патогенных бактерий, циркулирующих в больничных стационарах / Е. И. Гудкова, Г. А. Скороход, А. А. Адарченко, И. Н. Слабко, Л. И. Симоненко, И. А. Гаврилова // *Внутрибольничные инфекции и методы определения*

механизмов резистентности их возбудителей к антимикробным препаратам: материалы Всеукр. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Киев, 25–26 мая 2010 г. – Киев, 2010. – С. 40–42.

8. Гаврилова, И. А. Формирование резистентности бактерий к дезинфектантам / И. А. Гаврилова // Медицина XXI століття: материалы науч.-практ. конф. молодых ученых с междунар. участием, Харьков, 30 нояб. 2010 г. – Харьков, 2010. – С. 17.

9. Гаврилова, И. А. Ультраструктура бактериальных клеток синегнойной палочки с различным уровнем чувствительности к биоцидам на основе полигексаметиленгуанидина / И. А. Гаврилова // Медицина XXI століття: материалы науч.-практ. конф. молодых ученых с междунар. участием, Харьков, 29 нояб. 2012 г. – Харьков, 2012. – С. 22.

10. Турцевич, Д. В. Действие дезинфектантов на ультраструктуру бактериальной клетки / Д. В. Турцевич, Е. А. Секержицкая, И. А. Гаврилова / Инновации в медицине и фармации 2014: материалы дистанционной науч.-практ. конф. студентов и молодых учёных / Белорус. гос. мед. ун-т; ред.: А. В. Сикорский [и др.]. – Минск, 2014. – С. 449–454.

Инструкции по применению

11. Инструкция на метод определения микро- и макромаркеров повреждения бактериальных клеток с целью оценки активности дезинфицирующих средств и их активно действующих веществ № 295: утв. 23.12.2013 / ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии; сост.: Л. П. Титов, И. А. Гаврилова. – Минск, 2013. – 6 с.

РЭЗІЮМЭ

Гаўрылава Ірына Аляксандраўна

Рэзістэнтнасць клінічных ізалятаў сінегнойнай палачкі і стафілакокаў да дэзінфектантаў: фенатыпічныя і нанаструктурныя змены клетак

Ключавыя словы: стафілакокі, сінегнойная палачка, устойлівасць да дэзінфектантаў, ультраструктура бактэрыяў, атамна-сілавая мікраскапія.

Мэта даследавання: вызначыць механізмы фенатыпічнай адаптацыі клінічных ізалятаў бактэрыяў *P. aeruginosa* і *Staphylococcus spp.* да дэзінфектантаў і распрацаваць крытэрыі ацэнкі ўльтраструктурных зменаў бактэрыяў і іх здольнасці да выжывання пры ўздзеянні дэзінфіцыруючых сродкаў.

Метады даследавання: бактэрыялагічны, ацэнкі адчувальнасці бактэрыяў да дэзінфектантаў і антыбіётыкаў, атамна-сілавая і трансмісійная электронная мікраскапія, статыстычныя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: у клінічных ізалятаў стафілакокаў і *P. aeruginosa* выяўлена адсутнасць узаемасувязі паміж множнай устойлівасцю да дэзінфіцыруючых сродкаў (ДС) і множнай рэзістэнтнасцю да антыбіётыкаў. У стафілакокаў выяўлена статыстычна значная карэляцыйная сувязь паміж адчувальнасцю да чацвярцічных амоніевых злучэнняў і антыбіётыкаў: аксацыліну, эрытраміцыну і кліндаміцыну. У бактэрыяў з розным узроўнем адчувальнасці да дэзінфектантаў рэгіструюцца марфалагічныя адрозненні як паверхневых слаёў бактэрыяльнай клеткі, так і цытаплазматычных уключэнняў. Упершыню ў эксперыменце даказана магчымасць набыцця індукцыраванай устойлівасці да ДС у першапачаткова адчувальных ізалятаў *P. aeruginosa* пры сістэматычным уздзеянні суббіяцыдных канцэтрацый ДС. Пры ўздзеянні суббіяцыдных канцэтрацый ДС назіраецца частковае або поўнае захаванне нуклеаіда з захаваннем здольнасці да культывавання. Набыццё рэзістэнтнасці да дэзінфектантаў суправаджаецца культуральнымі (памяншэнне памераў калоній, утварэнне слізі) і марфалагічнымі зменамі бактэрыяльнай папуляцыі і асобных клетак (палімарфізм, памяншэнне памераў клетак, сінтэз жгуцікаў, атыповае дзяленне). Устаноўлены біялагічныя маркеры жыццяздольнасці клетак пасля ўздзеяння біяцыду, якія выяўляюцца пры атамна-сілавой мікраскапіі.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: атрыманыя вынікі могуць быць выкарыстаны для ацэнкі ўстойлівасці бактэрыяў да дэзінфіцыруючых сродкаў і антымікробнай актыўнасці ДС, а таксама як новыя навуковыя веды – у навучальным працэсе.

Галіна прымянення: бактэрыялогія, клінічная мікрабіялогія, дэзінфекталогія.

РЕЗЮМЕ

Гаврилова Ирина Александровна

Резистентность клинических изолятов синегнойной палочки и стафилококков к дезинфектантам: фенотипические и наноструктурные изменения клеток

Ключевые слова: стафилококки, синегнойная палочка, устойчивость к дезинфектантам, ультраструктура бактерий, атомно-силовая микроскопия.

Цель работы: установить механизмы фенотипической адаптации клинических изолятов бактерий *P. aeruginosa* и *Staphylococcus spp.* к дезинфектантам и разработать критерии оценки ультраструктурных изменений бактерий и их способности к выживанию при воздействии дезинфицирующих средств.

Методы исследования: бактериологический, методы оценки чувствительности бактерий к дезинфектантам и антибиотикам, атомно-силовая и трансмиссионная электронная микроскопия, статистические.

Полученные результаты и их новизна: у клинических изолятов стафилококков и *P. aeruginosa* выявлено отсутствие взаимосвязи между множественной устойчивостью к дезинфицирующим средствам (ДС) и полиантибиотикорезистентностью. У стафилококков выявлена статистически значимая корреляционная связь между чувствительностью к четвертичным аммониевым соединениям и антибиотикам: оксациллину, эритромицину и клиндамицину. У бактерий с разным уровнем чувствительности к биоцидам регистрируются морфологические различия как поверхностных слоёв бактериальной клетки, так и цитоплазматических включений. Впервые в эксперименте доказана возможность приобретения индуцированной устойчивости к ДС у изначально чувствительных изолятов *P. aeruginosa* при систематическом воздействии суббиоцидных концентраций ДС. При воздействии суббиоцидных концентраций ДС наблюдается частичное / полное сохранение нуклеоида с сохранением способности к культивированию. Приобретение дезрезистентности сопровождается изменением культуральных (уменьшение размеров колоний, слизееобразование) и морфологических свойств бактерий (полиморфизм, уменьшение размеров, синтез жгутиков, атипичное деление). Установлены биологические маркеры жизнеспособности клеток после воздействия биоцида, выявляемые при атомно-силовой микроскопии.

Рекомендации по использованию результатов: полученные данные могут быть использованы для оценки дезрезистентности и антимикробной активности ДС, а также как новое научное знание – в учебном процессе.

Область применения: бактериология, клиническая микробиология, дезинфектология.

SUMMARY

Gavrilova Irina Alexandrovna

Resistance of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and staphylococci to disinfectants: phenotypic and nanostructured changes of the cells

Key words: atomic force microscopy, *Pseudomonas aeruginosa*, resistance to disinfectants, staphylococci, ultrastructure of bacteria.

Purpose of research: to establish mechanisms of phenotypic adaptation of clinical isolates of *P. aeruginosa* and *Staphylococcus spp.* to disinfectants and to develop criteria for evaluation of ultrastructural changes of bacteria and their ability to survive when exposed to disinfectants.

Methods of study: bacteriological, antimicrobial susceptibility tests, atomic force microscopy, transmission electron microscopy, statistical.

Results and their novelty: clinical isolates of staphylococci and *P. aeruginosa* are characterized by the absence of association between resistance to two or more disinfectants and multidrug resistance. A statistically significant correlation between sensitivity to quaternary ammonium compounds and antibiotics oxacillin, erythromycin and clindamycin in staphylococci was revealed. Bacterial cells with different levels of sensitivity to biocides have morphological differences both in bacterial cell surface layers (the tortuosity of the cell wall, the severity of the periplasmic space) and cytoplasmic inclusions. For the first time in the experiment proved the possibility of acquiring induced resistance to disinfectants in susceptible isolates of *P. aeruginosa* when exposed to the sublethal concentrations of biocides. Either a partial or complete preservation of the nucleoid was observed with the ability to cultivate under the action of sublethal concentrations of biocides. Acquired resistance to disinfectants accompanied by a change of cultural (reducing the size of the colonies, the formation of mucoid strains) and morphological properties of bacteria (polymorphism, size reduction, synthesis of flagella, atypical division). Biological markers of cell viability after exposure to disinfectant were established by atomic force microscopy.

Recommendations for use: the results can be used to develop objective criteria for assessing the antimicrobial activity of disinfectants and for the creation of new methodological approaches to determine the resistance of microorganisms, as well as in the search for effective biocidal substances.

Application area: bacteriology, clinical microbiology, disinfectology.

Подписано в печать 20.03.15. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Снегурочка».

Ризография. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 1,16. Уч.-изд. л. 1,35. Тираж 60 экз. Заказ 167.

Издатель и полиграфическое исполнение: учреждение образования
«Белорусский государственный медицинский университет».

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/187 от 18.02.2014.

Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.