

Н.Ф. Крюкова<sup>1</sup>, С.Н. Адамович<sup>2</sup>, А.Н. Мирскова<sup>2</sup>, Е.В. Анганова<sup>3</sup>**СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА СТАФИЛОКОККА ДЛЯ УСКОРЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ОКАЗАНИЕМ МЕДИЦИНСКОЙ ПОМОЩИ**<sup>1</sup> Нерюнгринская центральная районная больница (Нерюнгри)<sup>2</sup> Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (Иркутск)<sup>3</sup> Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека СО РАМН (Иркутск)

В статье показана возможность использования ряда биологически активных протонных (2-гидроксиэтил)аммониевых ионных жидкостей общей формулы  $\text{HN}^+\text{R}_1\text{R}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_{3-n} \cdot \text{OOCCH}_2\text{X}(\text{Ind})\text{Ar}$ ;  $\text{R} = \text{H}, \text{Me}, \text{X} = \text{O}, \text{S}, \text{SO}_2$ ;  $n = 0-2$  в качестве стимуляторов роста *S. aureus*. Исследовано 24 штамма, выделенных от больных с гнойно-септическими осложнениями из отделения хирургического профиля. Установлено существенное ускорение роста *S. aureus* на питательной среде, содержащей желточно-солевой агар, при добавлении исследованных стимуляторов в концентрациях  $10^{-4}-10^{-6}$  вес. %. Предложено применение стимуляторов для разработки усовершенствованной методики ускоренной диагностики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, вызванных *S. aureus*, что позволит значительно уменьшить время выдачи результата анализа и своевременно назначить адекватное лечение больного.

**Ключевые слова:** стафилококки, стимуляторы роста, питательная среда

**STAPHYLOCOCCUS, STIMULATORS OF GROWTH FOR RAPID DIAGNOSIS OF HEALTHCARE-ASSOCIATED INFECTIONS**N.F. Kryukova<sup>1</sup>, S.N. Adamovich<sup>2</sup>, A.N. Mirskova<sup>2</sup>, E.V. Anganova<sup>3</sup><sup>1</sup> Neryungri Central Regional Hospital, Neryungri<sup>2</sup> A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk<sup>3</sup> Scientific Centre of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

The possibility of using biologically active proton (2-hydroxyethyl) ammonium ionic liquids of the general formula  $\text{HN}^+\text{R}_1\text{R}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_{3-n} \cdot \text{OOCCH}_2\text{X}(\text{Ind})\text{Ar}$ ;  $\text{R} = \text{H}, \text{Me}, \text{X} = \text{O}, \text{S}, \text{SO}_2$ ;  $n = 0-2$  as stimulators of growth *S. aureus* shows in the article. 24 strains isolated from patients with purulent-septic complications from the surgical department studied. There are shown a significant acceleration of growth of *S. aureus* in a agar nutrient containing yolk-salt agar, the addition of stimulants tested at concentrations  $4.10-6.10$  wt. %. Proposed use of stimulants for the development of improved methods of rapid diagnosis of healthcare-associated infections caused by *S. aureus*, which will greatly reduce the time of issue analysis and prescribe adequate treatment promptly sick.

**Key words:** Staphylococcus, stimulators of growth, agar nutritium

**АКТУАЛЬНОСТЬ**

Нерациональное использование антибиотиков и сульфамидных препаратов привело к развитию резистентности к ним многих патогенных микроорганизмов, в первую очередь, стафилококков, и широкому распространению стафилококковых инфекций, принимающих угрожающий характер и являющихся причиной развития инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), особенно в хирургических отделениях, родильных домах, педиатрических стационарах (язвенные энтероколиты, энтериты, перитониты, эндокардиты, пневмонии, абсцессы легкого, стафилококковый сепсис и др.) [2, 4, 5, 9].

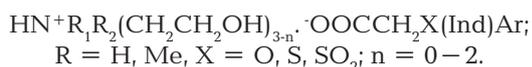
Длительность существующего производства бактериологических анализов негативно сказывается на оказании своевременной медицинской помощи пациенту, усложняя быстрое применение адекватной терапии. Поэтому вопросы ускоренной диагностики инфекций, вызванных стафилококками, являются актуальными.

В настоящее время для культивирования стафилококков применяются питательные среды, на которых длительность выращивания составляет

до 48 часов [7]. В ходе проведения исследований по изучению эпидемиологических и микробиологических особенностей ИСМП выявлено, что перспективным направлением для борьбы с их распространением и сокращением времени выдачи результатов анализа для быстрого назначения больному адекватной антибиотикотерапии может явиться разработка усовершенствованной методики ускоренной диагностики госпитальных инфекций, вызванных *S. aureus*. Для решения поставленной задачи в данной работе изучена возможность оптимизации питательных сред для роста стафилококков путем добавления в среду культивирования стимуляторов роста.

**МЕТОДИКА**

В качестве стимуляторов роста *S. aureus* впервые исследованы биологически активные соединения, синтезированные в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения РАН — представители нового класса биологически активных протонных (2-гидроксиэтил)аммониевых ионных жидкостей [2, 6, 8, 10] общей формулы:



Их молекулы состоят из катионов протонированных 2-гидроксиэтиламинов и анионов биологически активных арил(индолил)окси-(сульфанил) (сульфонил)уксусных кислот. Известно, что фрагмент  $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$ - присутствует в молекулах холина, ацетилхолина и коламина, входит в состав фосфолипидов, коэнзима Q, витамина  $\text{B}_{12}$ . Моноэтаноламин является составной частью кефалинов, а диметиэтаноламин — лецитина, относящихся к классу фосфолипидов. Второй компонент — органические кислоты — также обладают высокой биологической активностью [1]. Так, ароксисукусные кислоты, индолилукусная кислота (гетероауксин) и их производные широко применяются в сельском хозяйстве в качестве гербицидов и стимуляторов роста растений.

Синтезированные (2-гидроксиэтил)аммониевые соли арил(гетерил)(сульфанил)-(сульфонил)уксусных кислот при низкой токсичности ( $\text{LD}_{50} = 1300-6000$  мг/кг) проявляют высокую и разнообразную биологическую активность: гемо- и иммуностропную, кардиотропную, противовоспалительную, антитромботическую, антиоксидантную, адаптогенную, гипохолестеринемическую [3, 10], являются высокоэффективными ростстимулирующими препаратами для биотехнологических процессов [6]. Биологическая активность таких 2-гидроксиэтиламмониевых солей существенно превосходит или отличается от активности исходных кислот и алканоламинов.

Соединения данного класса проявляют ростстимулирующую активность в низких концентрациях (преимущественно в интервале  $10^{-4} - 10^{-8}$  вес. %), легкодоступны благодаря разработанным нами химическим методам синтеза. Исследованные

в данной работе соединения №№ 1–5 (табл. 1) представляют собой бесцветные кристаллические вещества, имеют постоянный состав, устойчивые при хранении, хорошо растворимые в воде.

Испытания соединений №№ 1–5 в качестве потенциальных стимуляторов роста *S. aureus* проведены на базе бактериологической лаборатории МУЗ Центральной районной больницы г. Нерюнгри (Иркутская область). В работе использованы 24 штамма *S. aureus*, выделенных от больных с гнойно-септическими осложнениями из отделения хирургического профиля. Идентификацию выделенных микроорганизмов оценивали с помощью коммерческих тест-систем «STAPHYtest» фирмы LACHEMA (Чехия) [8].

В ходе испытания проводили растворение каждого потенциального стимулятора роста по следующей методике: растворяли 0,1 г (100,0 мг) вещества в 100,0 мл дистиллированной воды, получая 0,1%-й раствор (матричный). Дальнейшие разведения проводили следующим образом — первое разведение: 0,1 мл матричного 0,1%-го раствора добавляли в 100,0 мл желточно-солевого агара (ЖСА). Концентрация препарата в среде составила  $10^{-4}$ . Второе разведение: 0,1 мл матричного 0,1%-го раствора добавляли в 1000,0 мл ЖСА. Концентрация препарата в среде составила  $10^{-5}$ . В эксперименте использовали каждое разведение препарата в питательной среде и чистую культуру возбудителей ИСМП.

Из культуры золотистого стафилококка готовили взвесь  $10^4$  в физрастворе по стандарту мутности. Далее брали три разведения препарата в ЖСА, разливали агар по чашкам Петри (по три чашки каждого разведения препарата в питательной среде). На чашки высевали по 0,1 мл приготовленной взвеси золотистого стафилококка и инкубировали при 37 °С. Просмотр чашек производили каждые

Таблица 1

Структура исследованных соединений №№ 1–5

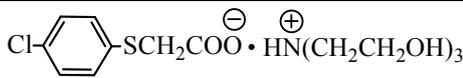
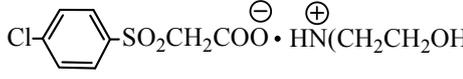
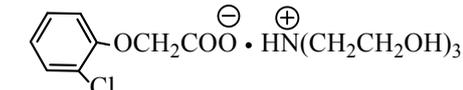
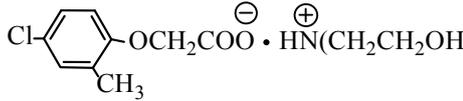
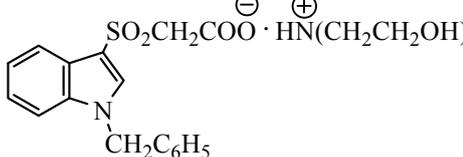
Соединение	Формула
1. Трис(2-гидроксиэтил)аммоний-4-хлорфенил-сульфанилацетат	
2. Трис(2-гидроксиэтил)аммоний-4-хлор-фенил-сульфонилацетат	
3. Трис(2-гидроксиэтил)аммоний-2-хлор-фенил-оксиацетат	
4. Трис(2-гидроксиэтил)аммоний-2-метил-4-хлор-фенилоксиацетат	
5. Трис(2-гидроксиэтил)аммоний-1-бензил-индол-3-илсульфонилацетат	

Таблица 2

Всхожесть *S. aureus* в питательной среде со стимуляторами роста №№ 1–5 и на контрольной среде ЖСА

№ стимулятора роста	Время, час	Концентрация, М %		
		10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
1	3	а	а	а
	6	б	б	а
	9	с	с	б
2	3	а	а	а
	6	б	б	а
	9	с	с	б
3	3	а	а	а
	6	б	б	а
	9	с	с	б
4	3	а	а	а
	6	б	б	а
	9	с	с	б
5	3	а	а	а
	6	б	б	б
	9	с	с	с
Контроль (без стимулятора роста)	3	д	«-»	«-»
	6	д	«-»	«-»
	9	а	«-»	«-»

**Примечание:** а – пылевидный рост микроорганизмов, б – единичные колонии микроорганизмов, с – рост микроорганизмов с выраженной лецитиназной активностью, д – отсутствие роста микроорганизмов, «-» – исследования не проводились.

3 часа, отмечая рост колоний. В качестве контроля были произведены посеы на ЖСА без стимулятора роста.

При применении синтезированных стимуляторов №№ 1 – 5 роста *S. aureus* в среде ЖСА устанавливали всхожесть микроорганизмов.

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

Проведенные эксперименты показали значительные различия во всхожести штаммов *S. aureus* на средах со стимуляторами роста разной концентрации, а также на контрольной среде ЖСА. Так, при использовании всех стимуляторов роста при концентрациях 10<sup>-4</sup> – 10<sup>-5</sup> вес. %, а также стимулятора № 5 при концентрациях 10<sup>-4</sup> – 10<sup>-6</sup> вес. % через 3 часа имел место пылевидный рост микроорганизмов, через 6 часов отмечались единичные колонии, через 9 часов после посева наблюдался рост *S. aureus* с выраженной лецитиназной активностью (табл. 2).

При добавлении в питательную среду стимуляторов роста 1 – 4 в концентрации 10<sup>-6</sup> вес. % через 3 и 6 часов после посева отмечался пылевидный рост микроорганизмов, через 9 часов – рост единичных колоний.

При посеве исследуемых культур на желточно-солевой агар без стимуляторов роста через 3 и 6 часов роста не отмечалось, и только через 9 часов появлялся пылевидный рост микроорганизмов. За

9 часов культивирования *S. aureus* в контроле не наблюдалось ни роста единичных колоний микроорганизмов, ни роста исследуемых с выраженной лецитиназной активностью.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, впервые установлена рост-стимулирующая активность протонных (2-гидроксиэтил)-аммониевых ионных жидкостей общей формулы

$HN^+R_1R_2(CH_2CH_2OH)_{3-n} \cdot ^-OOCCH_2X(Ind)Ar$ ; R = H, Me, X = O, S, SO<sub>2</sub>; n = 0 – 2 в отношении *S. aureus* при добавлении в питательную среду на основе желточно-солевого агара. Предложенная питательная среда для методики ускоренной диагностики ИСМП, вызванных *S. aureus*, содержащая желточно-солевой агар и стимулятор роста, существенно сокращает (до 9 часов) время роста стафилококков (при использовании стимуляторов роста №№ 1 – 4 в концентрациях 10<sup>-4</sup> – 10<sup>-5</sup> вес. % и № 5 в концентрациях 10<sup>-4</sup> – 10<sup>-6</sup> вес. %). Использование предложенной методики позволяет значительно сократить время выдачи результата анализа для быстрого назначения адекватной антибиотикотерапии.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. 2-Гидроксиэтиламмониевые соли органилсульфанил(сульфонил)уксусных кислот – но-

вых фармакологически активных соединений / А.Н. Мирскова [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. — 2011. — Т. 19, № 5. — С. 467–478.

2. Nichols R.L. Preventing Surgical Site Infections // *Clinical Medicine, Research*. — 2004. — Vol. 2 (2). — P. 115–118.

3. Pat. RF 2086239; Byul. Izobret. [Invention Bulletin], 1997, 22; Pat. RF 2 080 861; Byul. Izobret. [Invention Bulletin], 1997, 16; Pat. RF 2 108 100; Byul. Izobret. [Invention Bulletin], 1998, 10, 153; Pat. RF 2 034 540; Byul. Izobret. [Invention Bulletin], 1995, 13 (in Russian).

4. Брискин Б.С. Внутрибольничная инфекция и послеоперационные осложнения с позиций хирурга // Инфекции и антимикробная терапия. — 2000. — Т. 2, № 4. — С. 561–583.

5. Внутрибольничные инфекции: Пер. с англ. / Под ред. Р.П. Венцела. — М.: Медицина, 2004. — 840 с.

6. Мирскова А.Н. Алканоламмониевые соли органилсульфанил(сульфонил)уксусных кислот — новые стимуляторы биологических процессов // *ЖорХ*. — 2008. — Т. 44, Вып. 10. — С. 1501–1508. (Mirskova A.N., Levkovskaja G.G., Mirskov R.G., Voronkov M.G. Hydroxyalkylammonium Salts of Organylsulfanyl(sulfonyl)acetic Acids — New Stimulators of Biological Processes. *Russ*

*J Org Chem* 2008, 44: 1478-1485. DOI: 10.1134/S1070428008100126).

7. Об улучшении медицинской помощи больным с гнойными хирургическими заболеваниями и усилении мероприятий по борьбе с внутрибольничной инфекцией: приказ МЗ СССР № 720 от 31.07.78 г.

8. Скала Л.З., Сидоренко С.В., Нехорошева А.Г. Практические аспекты современной клинической микробиологии. — М.: Лабинформ, 2004. — С. 64–69.

9. Современные особенности эпидемиологии и профилактики септических инфекционных осложнений у больных отделений реанимации и интенсивной терапии хирургического профиля / В.Г. Акимкин [и др.] // Поликлиника. — 2007. — № 3. — С. 62.

10. Трис-(2-гидроксиэтил) аммоний 2-метил- и 2-метил-4-хлор-феноксиацетаты — эффективные ингибиторы агрегации тромбоцитов и антиоксиданты / А.Н. Мирскова [и др.] // Докл. АН. — 2010. — Т. 433, № 5. — С. 710–712. (Mirskova A.N., Adamovich S.N., Mirskov R.G., Voronkov M.G. Tris-(2-Hydroxyethyl)- Ammonium 2-Methyl- and 2-Methyl-4-Chlorophenoxyacetate Serve as Effective Inhibitors of Thrombocyte Aggregation and Antioxidants, *Doklady Biological Sciences, Physiology*, 2010, Vol. 433, pp. 244–246. DOI: 10.1134/S0012496610040022.

#### Сведения об авторах

**Крюкова Наталья Федоровна** — врач-бактериолог высшей категории МУЗ «Нерюнгринская центральная районная больница», г. Нерюнгри

**Адамович Сергей Николаевич** — к.х.н., старший научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1, ИриХ; тел. 42-65-45; e-mail: mir@irioch.irk.ru)

**Мирскова Анна Николаевна** — д.х.н., профессор, главный научный сотрудник Иркутского института химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1; тел. 42-47-11; e-mail: mirskova@irioch.irk.ru)

**Анганова Елена Витальевна** — к.м.н., старший научный сотрудник ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН