

На правах рукописи

**Шихама Якобус Ангара**

**СВЯЗЬ АКУШЕРСКО-ГИНЕКОЛОГИЧЕСКИХ ПАТОЛОГИЙ С  
ИНФИЦИРОВАННОСТЬЮ *SAMPYLOBACTER FETUS* ПОДВИД *FETUS***

**03.00.07– микробиология  
03.00.04– биохимия**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
**Диссертации на соискание ученой степени**  
**Кандидата биологических наук**

**Казань – 2008**

Работа выполнена на кафедре микробиологии Казанской государственной медицинской академии МЗ СР РФ

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор  
Оскар Кимович Поздеев  
доктор биологических наук, профессор  
Ольга Николаевна Ильинская

Официальные оппоненты: кандидат биологических наук,  
Елена Владимировна Никитина (доцент  
Казанского государственного технологического  
университета, г. Казань)

доктор биологических наук, профессор  
Владислав Моисеевич Чернов  
(зам. директора Казанского института биохимии  
и биофизики РАН, г. Казань)

Ведущая организация: ФГУП Казанский научно-исследовательский  
институт эпидемиологии микробиологии,  
г. Казань

Защита диссертации состоится «13» ноября 2008 г. в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при Казанском государственном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета

Автореферат разослан « » 2008 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
профессор, доктор биологических наук

З.И. Абрамова

**Актуальность проблемы.** В настоящее время спектр возбудителей акушерско-гинекологических патологий в значительной степени пополняется за счет представителей условно-патогенной микрофлоры, роль которых в патогенезе микробно-воспалительных инфекционных заболеваний (МВИЗ) человека установлена сравнительно недавно [Bryan *et al.*, 1993; Blaser M.J., 1998; Grogono-Thomas *et al.*, 2003; Kalka-Moll *et al.*, 2005]. Среди таковых большое внимание привлекает *Campylobacter fetus*, так как существенно возросла частота заболеваний вызванных этим видом бактерии и он составляет важную медико-социальную и экономическую проблему в разных регионах земного шара [Бородин, 1999; Carole Tremblay *et al.*, 2000; Kalka-Moll *et al.*, 2005]. *C. fetus* – широко распространен патогенная бактерия (Санитарные правила СП 1.2.731-99 МЗ РФ), ранее считавшаяся условно-патогенной [Graham L.L., 2002; Tremblay *et al.*, 2000]

Несмотря на то, что это вид кампилобактеров был идентифицирован McFadyean J. и Stockman S. еще в 1909 году, его связь с патологией человека впервые установлена лишь в 1947 г. Vinzent R при выделении бактерий от беременных женщин, госпитализированных с лихорадкой неясного генеза [Чайка, 1988; Blaser *et al.*, 1998; William *et al.*, 1977]. Связь острой кишечной инфекции (ОКИ) человека с кампилобактером подтверждена только в 70-е годы [Бутцлер и соавт., 1992]. Клиническое проявление внекишечного кампилобактериоза обуславливается физиологическим и иммунологическим состоянием человека. В факторы риска входят состояние женщины при беременности, низкий иммунный статус новорожденных, хронические заболевания, алкоголизм, а также условия питания, профессия, гигиена и половая активность [Hum *et al.*, 1994; Kelly, 2001]. Широкое распространение кампилобактера является причиной от 5 до 10% всех острых диарейных болезней во всем мире переходящие во внекишечный кампилобактериоз. В США наблюдались эпидемические вспышки кампилобактериоза, связанные с употреблением зараженной воды, молока и мясопродуктов. При вспышках, связанных с употреблением сырого молока заболеваемость кишечного кампилобактериоза достигается 60% [Bokkenheuser,

1970; Harvey *et al.*, 1983]. Наблюдаются профессиональные заболевания лиц, постоянно контактирующих с животными [Hum *et al.*, 1994; Berger *et al.*, 1992; Kelly, 2001]. Также возможно заражение от человека, при инфицировании новорожденных детей (трансплацентарно или при родах). Могут происходить заражение взрослых от детей, при появлении семейных очагов, связанных с бактерионосительством. Отмечена осенне-летняя сезонность кампилобактериозных заболеваний. Давно установлено, что возбудитель попадает в организм преимущественно через желудочно-кишечный тракт алиментарным путем, другие пути передачи мало принимали во внимание, хотя возможно проникновение через поврежденную кожу (контакт с животными, укусы), половой путь передачи также не исключается [Clark, 1972; Creasy *et al.*, 2002; Dekeyser *et al.*, 1986].

Хронические формы кампилобактериоза, связанные с персистенцией кампилобактера в организме, стали все чаще описываться при иммунодепрессивных состояниях, в частности, в сочетании с факторами риска и ВИЧ-инфекцией [On, 2005, Blaser *et al.*, 1988; Francioli *et al.*, 1985]. У женщин чаще поражаются половые органы, что приводит к репродуктивным осложнениям, невынашиванием беременности, выкидышам и бесплодию.

Выше сказанное требует изучения истинного значения бактерий, а также разработку подходов к ее элиминации, что может внести существенный вклад в государственную программу решения демографической проблемы. К сожалению, в настоящее время идентификацию кампилобактера как агента, вызывающего акушерско-гинекологические заболевания не проводят.

Указанное делает перспективным поиск и внедрение в практику новых доступных подходов диагностики и элиминации *C. fetus*, направленных на улучшение результатов лечения акушерско-гинекологических заболеваний, связанных с внекишечной кампилобактериозной инфекцией.

Бактериологическая диагностика выделением возбудителя из биоматериала является «золотым стандартом» при кишечных и внекишечных

кампилобактериозных инфекциях. Для улучшения результатов бактериологического исследования разрабатывают селективную транспортную среду и модифицируют специальные питательные среды [Barrett *et al.*, 1988; Barot *et al.*, 1984; Cardarelli-Leite *et al.*, 1996; Blaser *et al.*, 1998; Newell *et al.*, 2000]. Тем не менее, до сих пор в клинико-микробиологической лабораторной диагностике клиницисты и микробиологов сталкиваются с ложноположительными результатами и трудоемким получением точных результатов диагноза.

**Цель данной работы** - определение частоты встречаемости *C. fetus* подвид *fetus* и изучение его этиологической значимости в развитии акушерско-гинекологических патологий среди населения Республики Татарстан.

**Основные задачи исследования:**

1. Разработать доступные методы транспортировки, выделения и идентификации *C. fetus*.
2. Разработать новую питательную среду и модифицировать глициновый тест для разделения подвидов *C. fetus* на подвид *fetus* (клинически значимый) и подвид *venerealis* (не вызывающий поражений у человека).
3. Определить частоту встречаемости и степень обсемененности *C. fetus* подвид *fetus* у пациенток с акушерско-гинекологическими заболеваниями, в зависимости от нозологии и сроков беременности.
4. Изучить вирулентные свойства выделенных штаммов, способность к персистенции и резистентность к антибактериальным препаратам.
5. Исследовать возможность длительного сохранения выделенных штаммов *C. fetus* в лаборатории с последующей рекультивацией и изучением.

**Научная новизна.** Впервые разработан доступный метод быстрого выделения, идентификации и культивирования *C. fetus* подвид *fetus*. Подтверждена связь между акушерско-гинекологическими заболеваниями и инфицированностью *C. fetus* подвид *fetus*. Впервые разработан и использован на практике глициновый

красной кровяной агар с антибиотиками (ГКАА) — амфотерицином и ванкомицином для ускоренной идентификации подвидов *C. fetus* из клинического биоматериала.

Установлена корреляция между степенью обсемененности клинического биоматериала, нозологии, и сроком беременности. На поздних сроках беременности наблюдалась высокая степень обсемененности, при этом умеренная степень обсемененности была выявлена на ранней стадии беременности и при легкой стадии заболевания. Определена дифференциальная чувствительность *Campylobacter* к антибактериальным препаратам, устанавливающая отличие между внекишечных и кишечных кампилобактеров по сравнению с литературными данными. Впервые предложена методика длительного сохранения выделенных штаммов *C. fetus* в консервирующей смеси при  $-10^{\circ}\text{C}$ , что позволяет рекультивацию *C. fetus* с первоначальными свойствами роста и патогенности.

**Практическая значимость.** Новые методы выделения и идентификации *C. fetus* подвид *fetus*, предложенные в работе, значительно облегчают культивирование, идентификацию и выделение патогенна из клинического материала и осуществить ускоренную, точную диагностику кампилобактериозной инфекции.

Модифицированный метод дает возможность провести ранее недоступную ускоренную диагностику и идентификацию *C. fetus* подвид *fetus*. Практическая значимость нашей работы обусловлена применением метода в акушерстве и гинекологии, с помощью которого можно идентифицировать и различить *C. fetus* подвид *fetus* от подвида *venerealis*, которые отличаются эпидемиологической и клинической степенью значимости. Решается сложный вопрос изучения патогенетических свойств сохранённых штаммов *C. fetus* подвид *fetus* с первоначальными свойствами. Работа вносит вклад в решение медико-социальных и демографических проблем.

Научные положения диссертации и выводы базируются на собственных результатах исследований автора.

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Разработаны доступные на практике методы транспортировки, выделения и идентификации *S. fetus* при акушерско-гинекологических патологиях.
2. Установлена высокая степень вирулентности, сочетающаяся с высокой адгезивностью и способностью к синтезу гиалуронидазы выделенных штаммов *S. fetus* подвида *fetus*.
3. Частота встречаемости и степень обсемененности *S. fetus* подвида *fetus* зависит тяжести патологии и сроков беременности.
4. Разработана методика длительного сохранения выделенных изолятов *S. fetus* подвида *fetus* при  $-10^{\circ}\text{C}$  в консервирующей смеси (сахарозо-желатиновой среде в буферном растворе) на срок более 12 месяцев.

**Апробация материалов работы.** Основные положения диссертации доложены на XV и XVI научно-практических конференция Поволжского региона «Окружающая среда и здоровье населения» (Казань 2007, 2008); на научно-практической конференции молодых ученых «Казанская Государственная Медицинская Академия» (Казань 2007, 2008); на научно-практической конференции, «Актуальные вопросы инфекционной патологии» Казанской Государственной Медицинской Университет (Казань 2007); на научно-практической конференции иностранных студентов и аспирантов Российской Федерации (Томск 2007), на 16 съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск 2008), а также на итоговых конференциях КГУ (Казань, 2006 - 2008).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 9 научных работ.

**Благодарности.** Автор искренне выражает огромную благодарность своим научным руководителям: д.б.н., профессору заведующему кафедре микробиологии КГУ Ольге Николаевне Ильинской и д.м.н., профессору заведующему кафедре микробиологии КГМА и КГМУ Оскару Кимовичу Поздееву за представленную возможность выполнить диссертационную работу, по интересной теме, актуальную в моей стране, за ценные идеи в процессе обучения, за воспитание и родительскую

опеку. Автор выражает искреннюю благодарность всему преподавательскому составу кафедры микробиологии КГУ, биолого-почвенного факультета и признателен к.б.н. КГУ Маргулис Анне Борисовне, за неоценимую помощь при выполнении научного исследования.

Автор искренне признателен всему составу кафедре микробиологии КГМА, за огромную помощь при выполнении экспериментальной части работы и кафедре акушерства и гинекологии КГМУ, за представленные клинические материалы. Автору признателен уже родному Казанскому государственному университету.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследований, обсуждения результатов, заключения, выводы, приложения к работе и списка литературы, включающего 295 источников, из них 280 на иностранном языке. Работа изложена на 132 страницах машинописного текста, содержит 7 таблицы и 17 рисунков.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

При выполнении работы нами было обследовано 253 беременных женщин родильного отделения Республиканской клинической больницы (РКБ) №1 и клиники акушерства и гинекологии Казанского государственного медицинского университета (КГМУ) с различными акушерско-гинекологическими патологиями (пиелонефрит, эрозия шейки матки, гестоз, мертворожденный плод и др.). Материалом для исследования являлись биоптаты, слизь из шейки матки и цервикального канала, околоплодные воды, смывы с плаценты и ее кусочки с видимыми изменениями. В работе были использованы следующие методы исследования: биохимические, бактериоскопические, бактериологические и молекулярные методы исследования. Метод полимеразной цепной реакции применялся для подтверждения результатов бактериологического метода.

**Тест-штаммы.** *Escherichia coli* (K12), *Micrococcus lysodeicticus*, *Proteus vulgaris* 019, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

### **Питательные среды и реагенты.**

Транспортная полужидкая тиогликолевая среда: питательный бульон 1000 мл, 0,1% агара, 0,5% глюкозы, 0,1% натрия тиогликолата.

КА: 4% агар с экстрактом сердечной мышцы (НИА) (Difco), 12,5 мл дефибринированной крови кролика, дН<sub>2</sub>О 1000мл.

КАА: 4% агар с экстрактом сердечной мышцы (НИА) (Difco), 12,5 мл дефибринированной крови кролика, 3мг амфотерицин В, дН<sub>2</sub>О 1000мл.

ШАА: протеозопептон 20,00мг, глюкоза 0,5мг, хлорид натрия 5мг, натрия гидрофосфат 5мг, агар-агар 15мг, раствора гемогробина 2%, дН<sub>2</sub>О 1000мл.

ГК: гиалуроновая кислота, полученная из пупочных канатиков.

ГКАА: глицин 1г, 12,5 мл дефибринированной крови кролика, 3мг Амфотерицин В, 7,5мг Ванкомицин, дН<sub>2</sub>О 1000мл.

### **Определение чувствительности к антибактериальным препаратам:**

**использовали** стандартные диски, содержащие: амоксицилин (20мкг/мл); нифлуоксазид (15мкг/мл); Ципрофлоксацин-5мкг/мл; Тетрациклин-30мкг/мл; Эритромицин- 15мкг/мл; Цефозалин-30мкг/мл; Джозамицин-30мкг/мл; Цефтриаксон-30мкг/мл; Ампициллин-30мкг/мл; Метронидазол-30мкг/мл.

### **Культивирование и выделение *C. fetus* подвид *fetus***

Для выделения *Campylobacter fetus* повид *fetus*, биоматериалы и биоптаты от акушерско-гинекологических больных помещали в пробирки с 5 мл транспортной полужидкой тиогликолевой средой и доставляли в микробиологическую лабораторию. Часть биоптата использовали для бактериоскопического и биохимического исследования, другую часть – для приготовления гомогената, необходимого для бактериологического и повторного биохимического исследования.

Принадлежность выделенных культур к роду *Campylobacter* определяли по совокупности положительных результатов при бактериоскопическом,

бактериологическом и биохимическом исследованиях. Определение степени вирулентности проводили с помощью анилиновых красителей согласно методике предложенной И.А. Григорьевой с соавт. (1991). Определение гиалуронидазной, фибринолитической активностей и устойчивости к лизоциму среди выделенных штаммов осуществляли с помощью доступных стандартных методов (основанные на гидролизе гиалуроновой кислоты и фибрина). Изучение адгезивных свойств штаммов *C. fetus* подвид *fetus* проводили в реакции прямой гемагглютинации на стекле в присутствии D-маннозы по Б.Г. Каральнику и соавт. (1990). Чувствительность 114 штаммов *C. fetus* к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом со стандартными дисками.

Возможность длительного сохранения при  $-10^{\circ}\text{C}$  в консервирующей смеси, (10% сахарозо-желатиновой среды, модифицированной нами добавлением буферно-физиологического раствора) с последующим рекультивированием была определена у 35 штаммов *C. fetus*. Через 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 и 24 месяца производили медленное размораживание культур при комнатной температуре с последующим высевом на кровяной агар с добавлением 10% бараньей крови и 3 мкг/мл амфотерицина В (КАА).

### **Разработка новой питательной среды для ускоренного выделения и идентификации подвидов *C. fetus***

Для выделения кампилобактера при инфекции кишечного тракта чаще используют КАА. Недостатком этой среды является невозможность дифференцирования *C. fetus* на подвиды *C. fetus* подвид *fetus* и *C. fetus* подвид *venerialis*. Мы модифицировали среду, добавлением 1% глицина, который позволил идентифицировать *C. fetus* подвид *fetus* (т.к. *C. fetus* подвид *venerialis* не растет в присутствии глицина). Поскольку глицин не подавляет рост *C. jejuni*, то дополнительно определяли наличие гипуразы, синтезируемой только *C. jejuni*.

Проводили посеvy газоном по 1 капле суспензии посевного материала и культивировали 48 ч в микроаэрофильных условиях при  $37^{\circ}\text{C}$  и 98% влажности. Контролем служили суточные культуры *C. jejuni*.

Для подтверждения результатов, полученных микробиологическими методами, провели идентификацию изолятов, выращенных на ГКАА, с помощью ПЦР анализа. Идентификацию проводили с помощью специфических праймеров (MG3F и MG4R) *Campylobacter fetus* подвид *fetus*. Отрицательным контролем являлась ДНК *Campylobacter fetus* подвид *venerealis*, положительным контролем служила музейная культура *Campylobacter fetus* подвид *fetus*.

#### **Определение устойчивости к лизоциму *C. fetus* подвид *fetus***

Устойчивость к лизоциму выделенных изолятов *C. fetus* подвид *fetus* проводили по методу О.В. Бухарина с соавт. (1990). Использовали 5 и 15% растворы лизоцима в 0,5% растворе NaCl. Тест-культуру (*Micrococcus lysodeicticus*) выращивали 48 часов при 37°C на кровавом и шоколадном агарах. Штаммы *C. fetus* подвид *fetus* ресуспендировали в пробирках с различными концентрациями фермента; контролем служил физраствор. Пробирки инкубировали при 37°C 30, 60, 120 минут и 24 часа. Затем проводили высеv на питательную среду и подсчитывали число выросших колоний.

#### **Исследование гиалуронидазной активности *C. fetus* подвид *fetus***

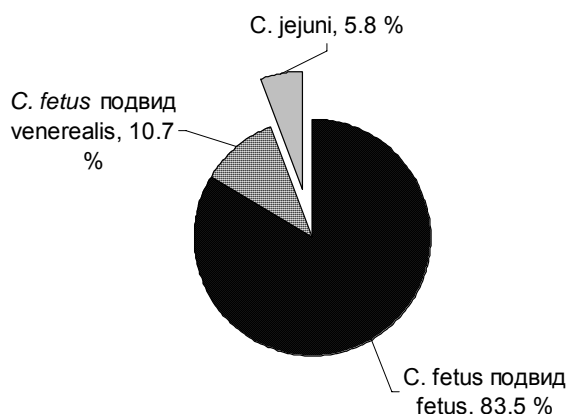
Гиалуронидазную активность бактерий проводили в отношении гиалуроновой кислоты, выделенной из пупочных канатиков новорожденных (500 г пупочных канатиков полученных из родильного отделения клиники им. В.С.Груздева КГМУ). Полученный пупочный субстрат (раствор содержащий гиалуроновую кислоту) не изменял своих свойств в течение 30 дней хранения при 4°C в холодильнике. Рабочую дозу определяли титрованием в пробирках, содержащих минимальное количество гиалуроновой кислоты в субстрате, при котором образовывался хорошо выраженный муциновый сгусток. Гиалуронидазную активность определяли по лизису сгустка.

**Статистическая обработка данных:** Для вычисления средних величин, средней квадратичной ошибки и критерия достоверности разности средних величин использовали программный пакет Microsoft Office 2003 Windows и

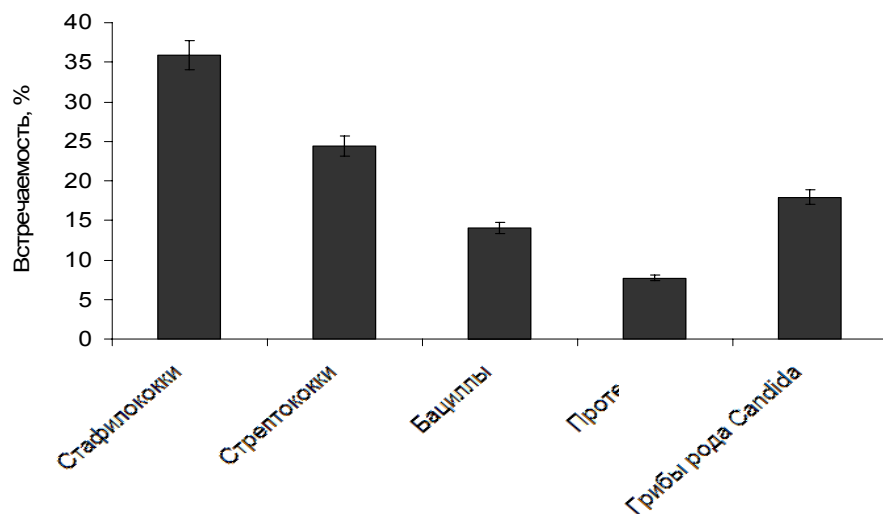
Statistica 6.0. Полученные данные мы подвергли статистической обработке с вычислением средней ошибки показателя –  $m$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

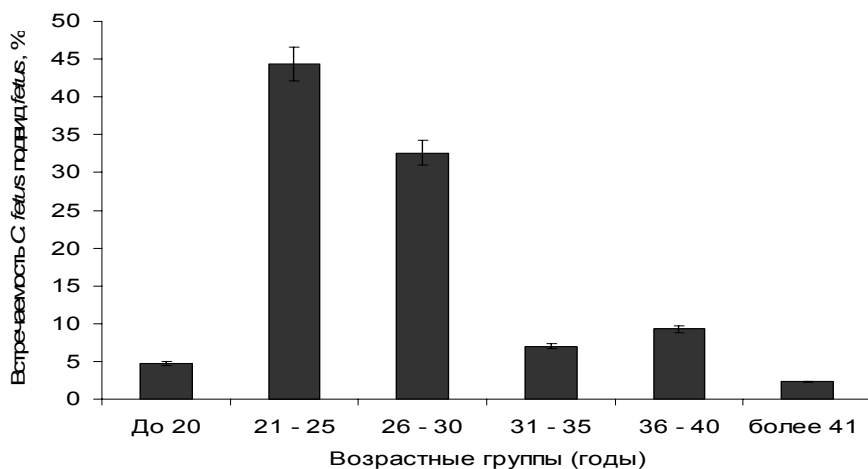
**Частота встречаемости *Campylobacter* при акушерско-гинекологических заболеваниях.** В наших исследованиях из 253 обследованных пациенток отделения акушерской гинекологии, у 121 ( $48,8 \pm 3,1\%$ ) были выделены бактерии рода *Campylobacter*. При этом 101 ( $83,5 \pm 3,4\%$ ) изолятов принадлежал к *C. fetus* подвид *fetus*, 13 ( $10,7 \pm 2,8\%$ ) к *C. fetus* подвид *venerealis* и только 7 ( $5,8 \pm 2,1\%$ ) к *C. jejuni*.



Факт моноинфекции *Campylobacter* установлен в 48,8% случаев, что указывает на высокую значимость бактерий в акушерско-гинекологических патологии. В 51,2% случаев имела место смешанное инфицирование несколькими бактериями (рис. 2).

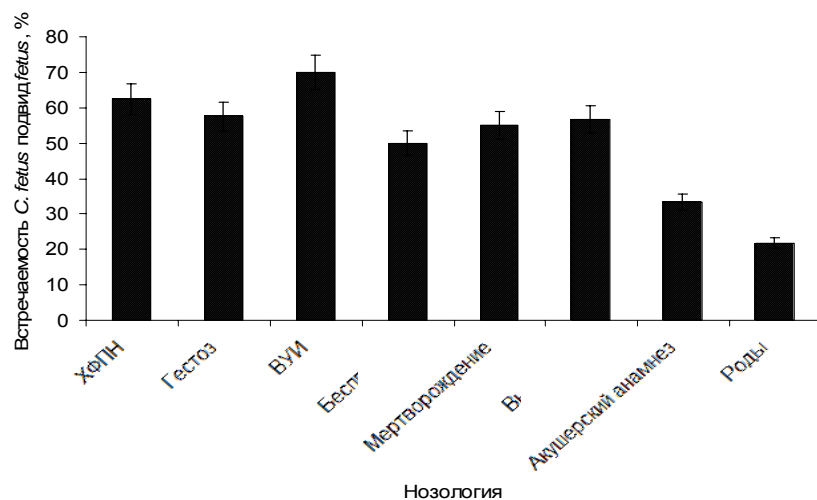


Анализ зависимости частоты встречаемости *C. fetus* от возраста пациенток показал, что самый высокий процент выделения *C. fetus* подвид *fetus* (44.4 %) наблюдали среди женщин в возрасте 21-25 лет. Среди пациенток от 26 до 30 лет она составила 32.6 %. Реже всего бактерии выявляли у женщин моложе 20 лет и старше 41 года (рис. 3).

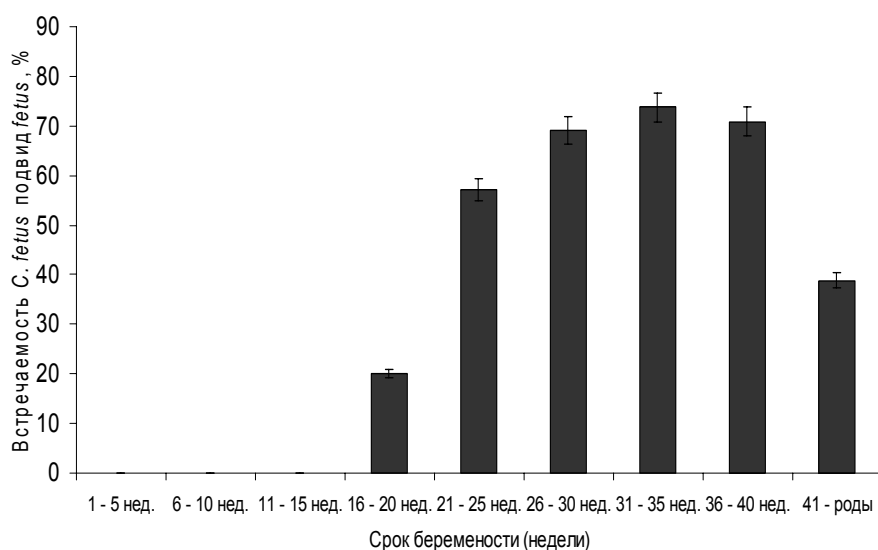


Частота выделения бактерий зависел от типа патологии. В частности, при хронической фетоплацентарной недостаточности (ХФПН) их выявляли у 62,5±7,6% женщин, при гестозах — у 57,5±8,4%, при бесплодии — у 50±15,8%. При внутриутробных инфекциях (ВУИ) *C. fetus* подвид *fetus* выявляли у 70±8,4% пациенток. При мертворождении бактерии обнаруживали у 55±11,1% женщин, при

выкидышах — у  $56,7 \pm 9,0\%$ , при акушерском анамнезе — у  $33,3 \pm 8,2\%$ , тогда как при физиологических родах только у  $21,8 \pm 5,6\%$  пациенток (рис. 4).



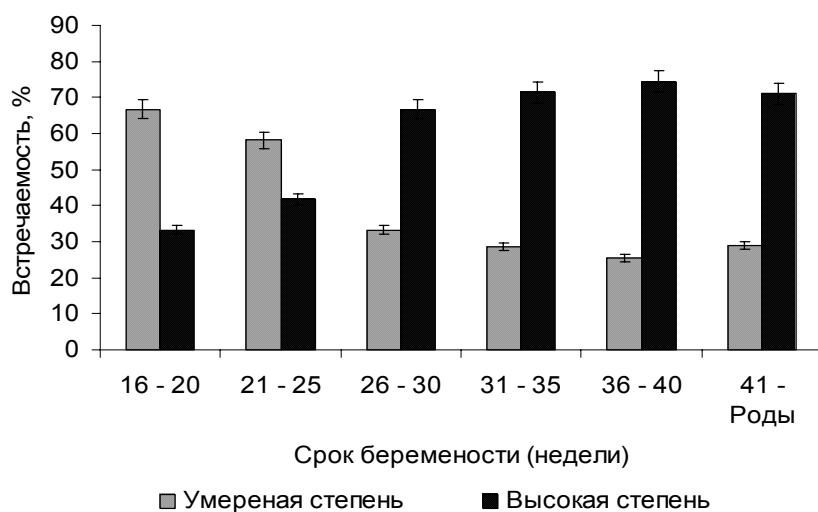
Также мы исследовали степень инфицирования кампилобактерами на разных сроках беременности. Нами установлено, что инфицированность *C. fetus* подвида *fetus* чаще была выявлена в третьем триместре (31 – 40 недель) беременности и составляла от  $70,9 \pm 4,1\%$  до  $73,7 \pm 4,0\%$ . Выявили, что на 16 – 25 неделях беременности частота выделения *C. fetus* подвида *fetus* гораздо ниже, чем на последних неделях и послеродовом периоде (рис. 5). На ранних сроках (до 15 недели) ни у одной из обследованных женщин не был выделены *C. fetus* подвида *fetus*.



## Зависимость степени обсемененности *C. fetus* от сроков беременности

Уровень обсемененности кампилобактерами беременных женщин с гинекологическими патологиями возрастал с увеличением сроков беременности. Наибольшим он был во втором триместре (16–30 недель) от  $20 \pm 3,6\%$  до  $69,2 \pm 4,2\%$ . При этом в  $66,7 \pm 4,3\%$  случаев регистрировали умеренную и только в  $33,3 \pm 4,3\%$  — высокую обсемененность. В третьем триместре (31–41 недель) высокий уровень обсемененности выявляли, в среднем, у 72% женщин (рис. 6).

Эти данные указывают на то, что при увеличении срока беременности обсемененность инфицированных органов *C. fetus* подвид *fetus* повышается.



Таким образом, можно полагать, что инфицированность беременных женщин кампилобактерами является фактором риска возникновения ХФПН, которая поддерживает хронические воспалительные процессы, способные приводить к невынашиванию беременности либо к инфекционным абортam.

В наших исследованиях бактерии наиболее часто обнаруживали в эндометрии и плаценте, реже — в соскобах цервикального канала, слизи шейки матки и околоплодных водах. Наиболее редкими были находки *C. fetus* подвид *fetus* в пуповинной крови, что, по-видимому, связано с наличием мощных антибактериальных сывороточных систем и определенной сложностью выделения микроорганизмов из крови.

## Определение факторов патогенности *C. fetus*

Отсутствие у кампилобактеров видимых и быстро определяемых признаков патогенности, усложняет изучение их значимости в развитии акушерско-гинекологических осложнений. Тем не менее к таковым можно отнести чрезвычайно высокую подвижность, способность перемещаться в межклеточных пространствах, высокую инвазивность и способность синтезировать широкий спектр ферментов, в том числе разлагающих супероксидные радикалы, продуцируемые фагоцитирующими клетками. Нами были исследованы следующие признаки патогенности: способность к синтезу мембраноповреждающих токсинов (гемолизинов), фибринолизина, гиалуронидазы, адгезивные свойства, а также устойчивость к действию лизоцима. Все выделенные изоляты *Campylobacter* не проявляли гемолитическую активность. Установили, что ни один из них не вызывал гемолиз. Однако определение наличия или отсутствия гемолизина недостаточно для установления патогенетической значимости выделенного изолята. Для заключения этиологической роли *C. fetus* при определенном гинекологическом заболевании во время беременности, необходимо было определить адгезиность штаммов.

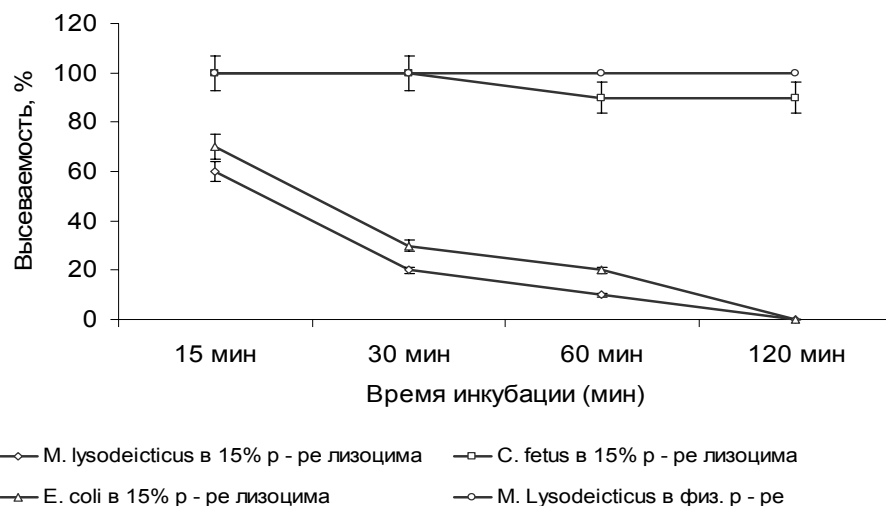
Исследование адгезии штаммов, выделенных при разных нозологиях, показало, что кампилобактеры обладают значительным количеством фимбрии 1 типа (манноза-чувствительные). При большинстве патологий бактерии проявляли 100% адгезивность. При ХФПН этот показатель снижался до  $80 \pm 3,6\%$ , а у штаммов, выделенных от женщин с гинекологическим анамнезом либо при родах, уровни адгезии составили  $80 \pm 3,6\%$  и  $83,3 \pm 3,4\%$  соответственно. Исследование действия лизоцима на 30 выбранных штаммов *C. fetus* подвид *fetus* показало, при обработке бактерий различными концентрациями и временем воздействия, на вторые сутки колонии появились почти на всех чашках. При высеве количество КОЕ на чашку составляло от  $10^4$  до  $10^6$  (таб. 1). Таким образом, лизоцим, как фактор неспецифической защиты не оказывал бактерицидного эффекта на выделенные изоляты *C. fetus* подвид *fetus*.

**Таблица. 1**

Действие лизоцима на выживаемость выделенных штаммов *C. fetus* подвида *fetus in vitro*

Время обработки	30 мин		60 мин		120 мин	
Концентрация лизоцима (%)	5	15	5	15	5	15
Количество штаммов, выросших после обработки лизоцимом	30	30	30	28	30	28

Мы сравнивали действие лизоцима на культуры *C. fetus* подвида *fetus*, *E. coli* и *M. lysodeicticus*. Дополнительным контролем являлся рост *M. lysodeicticus* без лизоцима (в физиологическом растворе). На рисунке 8 четко видно угнетение роста культур *E. coli* и *M. lysodeicticus* при увеличении времени инкубации с лизоцимом до полной гибели бактерии после 120 мин воздействия. При этом динамика роста *C. fetus* подвида *fetus* практически совпадала с *M. lysodeicticus* в физиологическом растворе (см. рис. 7).

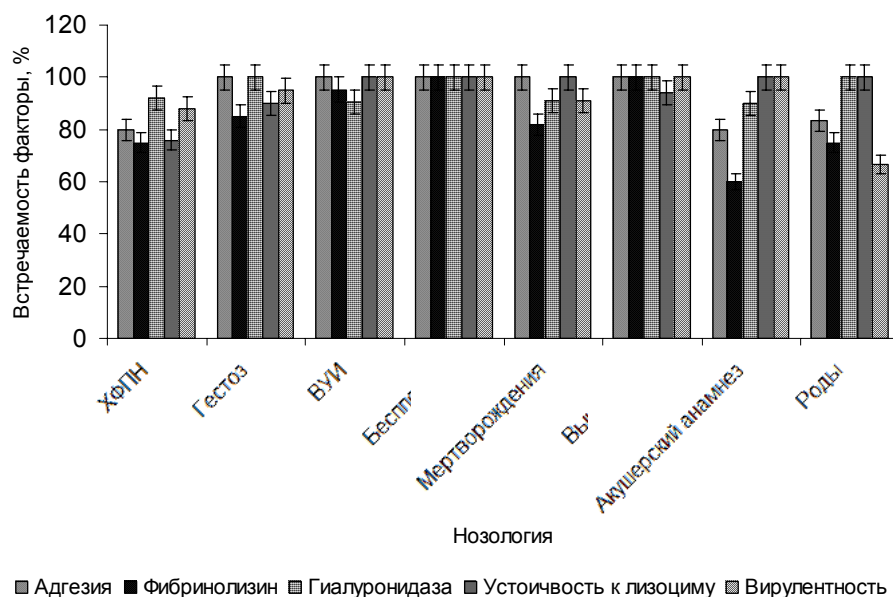


Одним из важнейших ферментов, участвующих во внедрении и диссеминации в организме хозяина является гиалуронидаза. Этот фермент вызывает распад гиалуроновой кислоты — основного межклеточного вещества соединительной ткани, особенно значимого в барьерных органах. Кроме того, гиалуронидаза увеличивает проницаемость сосудов и чувствительность больного к различным веществам (ферменты и токсины). Было установлено, что выделенные

штаммы *C. fetus* подвид *fetus* синтезируют гиалуронидазу. При этом у 74,1% всех 30 исследованных штаммов выявлена умеренная (++) , а у 11,1% штаммов низкая (+) степень активности фермента. Лишь 14,8% штаммов не обладали способностью синтезировать гиалуронидазу. При этом было установлено, что синтез гиалуронидазы носит индуцибельный характер и на фоне снижения рН среды, частота обнаружения штаммов с высокой и средней гиалуронидазной увеличивалась, а штаммов с низкой гиалуронидазной активностью либо не способных продуцировать фермент — снижалась.

Для изучения и выявления активности фибринолизина у *Campylobacter fetus* использовали плазму барана. Плазму разводили 1:3 и 1:5 физиологическим раствором и по одной петле 48 часовой культуры вносили в пробирки с 0,2 – 0,3 мл цитратной плазмы и тщательно размешивали. Пробирки выдерживали при 37<sup>0</sup>С в течение суток, и обязательно просматривали их дважды, через 3-4 и 18-24 часа. Учитывали как полную коагуляцию плазмы, так и образование небольших сгустков. коагулазо-позитивные штаммы, обильно продуцирующие фибринолизин, вызывают в начале образование сгустков, а к концу - сгусток их расплавляется под действием фибринолизина. На фибринолизин исследовали 25 штаммов, из которых 21 (84%) обнаружили этот фермент. Вирулентные штаммы микроба отличаются от невирулентных высокой скоростью размножения. В связи с этим вирулентные штаммы более интенсивно адсорбируют анилиновые красители, чем невирулентные. При ВУИ, бесплодии, выкидышах и анамнезе все исследованные штаммы были вирулентным в тесте поглощения красителя Романовского-Гимзы. Количество вирулентных штаммов, выделенных при ХФПН, гестозах и мертворождениях составило, соответственно, 88±3,0%, 95±2,0%, 90,9±2,6%. Только при нормальных родах процент вирулентных штаммов составил 66,7±4,3%.

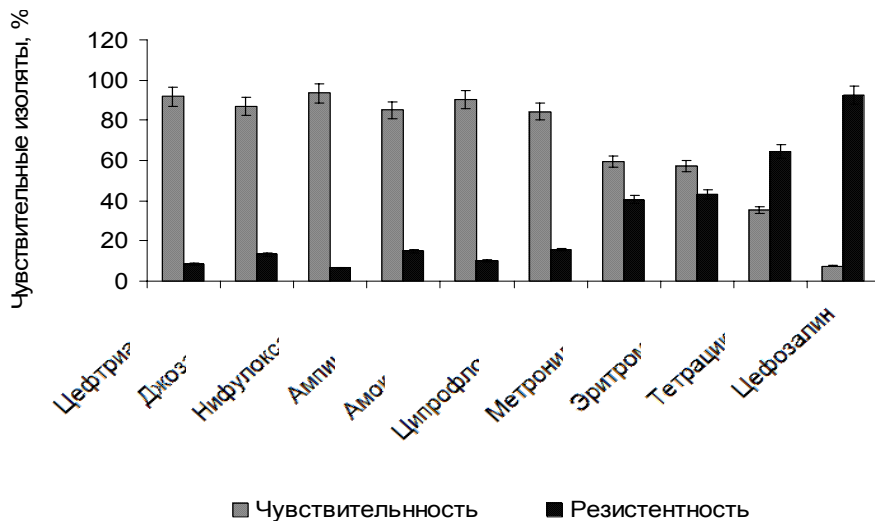
Из сводной гистограммы, где представлены все исследованные признаки, видно, что выделенные штаммы *C. fetus* подвид *fetus* обладают свойствами, которые определяют их патогенную значимость (рис. 8). Более 60% штаммов обладают всеми исследованными патогенными признаками.



Таким образом, из полученных данных видно, что *C. fetus* синтезирует агрессивные и защитно-адаптивные ферменты, которые позволяют внекишечным кампилобактерам проникать в ткани и органы, адаптироваться к условиям макроорганизма и противостоять защитным механизмам хозяина. Данные наших исследований позволяют нам причислять *C. fetus* подвид *fetus* к числу этиологически значимых в развитии различных акушерско-гинекологических патологий.

### **Чувствительность выделенных штаммов *C. fetus* подвид *fetus* к антибактериальным препаратам**

Мы исследовали диско-диффузионным методом чувствительность 50 выделенных изолятов *C. fetus* подвид *fetus* к антибактериальным препаратам. Большинство штаммов ( $93,4 \pm 2,3\%$  и  $91,7 \pm 2,7\%$ ) были чувствительны к нифлуоксазиду и цефтриаксону соответственно. Также значительное число штаммов было чувствительно к джозамицину, ампицилину, амоксицилину и ципрофлоксацину — от  $84,4 \pm 3,3\%$  до  $90,1 \pm 2,7\%$  (рис. 9).



Мы отметили высокую устойчивость к тетрациклину и эритромицину ( $35,5 \pm 4,4\%$  и  $57,0 \pm 4,5\%$  соответственно). Наиболее устойчивыми бактерии были в отношении цефозалина ( $92,9 \pm 3,4\%$ ). Число изолятов, устойчивых к метронидазолу, составило  $40,5 \pm 4,5\%$ .

#### **Разработка новой схемы диагностики *C. fetus* подвид *fetus* при акушерско-гинекологических заболеваниях**

Метод разработан на основе известного способа выделения и идентификации *C. fetus* из биоптата от разных животных и человека [Hunt *et al.*, 1998]. Предлагаемая схема дает возможность более быстро выделить и идентифицировать *C. fetus* подвид *fetus* при акушерско-гинекологических патологиях. Мы использовали модифицированную среду ГКАА при первичном посеве. В дальнейшем после 48 часов проводили изучение каталазной, оксидазной и гемолитической активностей, способность к адгезии, микроскопирование методом раздавленной капли.

Применение модифицированной среды ГКАА позволило не только сохранить высокую скорость роста подавляющего большинства тестируемых штаммов (что отличает КАА, применяемый при выделении кампилобактеров), но и дифференцировать *C. fetus* подвид *fetus* и *C. fetus* подвид *venerealis* уже на первом этапе культивирования. Таким образом, мы исключили второй посев на КАГ, и необходимость в дополнительных тестах для определения подвида исчезла,

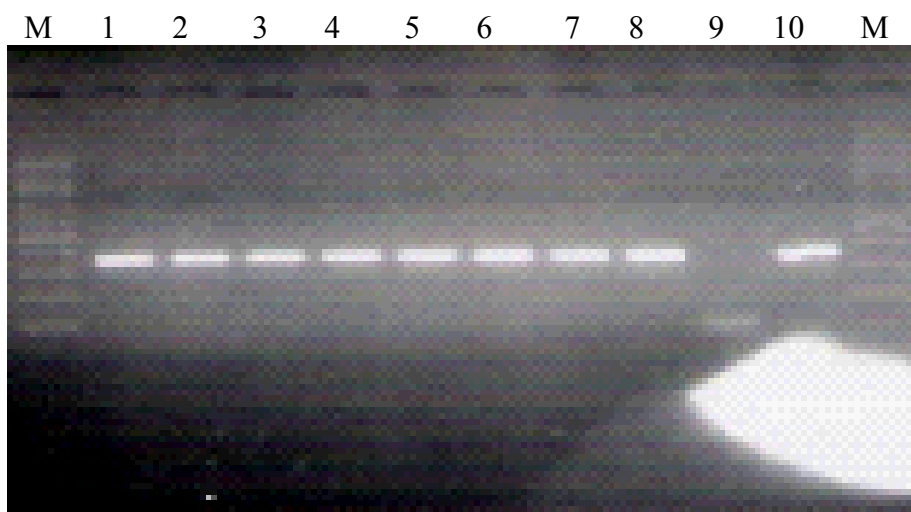
сократив при этом время выделения и идентификации на 48 часов. Было исследовано 50 штаммов, 100% из которых показали хороший рост на КАА. При высеве исследуемых штаммов на ГКАА 94% из них также показали высокую скорость роста, как и на КАА. Два штамма оказались чувствительны к глицину, что означает их принадлежность к *S. fetus* подвида *venerealis* (таб. 2). Таким образом все последующие тесты мы проводили с интересующим нас подвидом *fetus*.

**Таблица 2**

Рост выделенных штаммов *S. fetus* подвида *fetus* на ГКАА

Число тест штаммов (КАА)	Число выросшие на ГКАА изолятов, %	Число изолятов чувствительных к глицину, %
50 (100%)	48 (94%)	2 (6%)

Таким образом, 94% штаммов выделенных при акушерско-гинекологических патологиях оказались устойчивыми к глицину и принадлежали к *S. fetus* подвида *fetus*, но выделялись и чувствительны к глицину *S. fetus* подвида *venerealis*. Точность нашего метода подтверждают результаты ПЦР теста (рис.10).

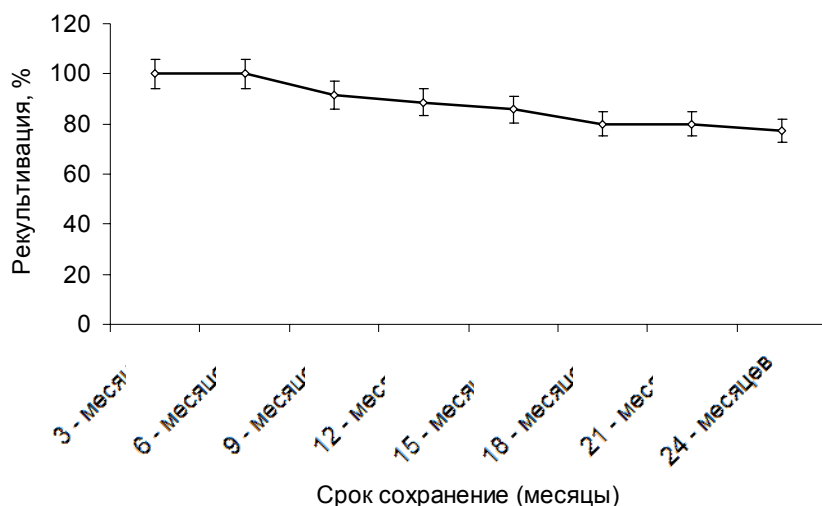


**Рис. 10.** Обнаружение ДНК *S. fetus* подвида *fetus*: 1-8 –ДНК изолятов; М-маркер; 9- отрицательный контроль; 10- положительный контроль.

## Длительное сохранение и рекультивирование выделенных штаммов *C. fetus*

Для сохранения культур в клинической лабораторной практике наиболее часто используют метод пересева. Однако, как показали наши исследования при таком способе сохранения штаммы *C. fetus* подвида *fetus* теряли жизнеспособность. При пересеве культур каждые 2 недели большинство из них прекратили свой рост после 4 пассажа. Только 2 культуры сохранили жизнеспособность после 5-го пересева. С каждым пассажем происходило уменьшение зоны газонного роста и размеров колоний до точечных. Параллельно с пересевами проводили анализ мазков-отпечатков, в которых с увеличением числа пассажей росло количество инволюционных кокковидных форм.

Нами был предложен и испытан новый метод сохранения выделенных клинических изолятов. Он основан на замораживании суспензии культуры в консервирующей смеси при  $-10^{\circ}\text{C}$  (10% сахарозо-желатиновая среда, модифицированная нами добавлением буферно-физиологического раствора.). Так как при высеве культур после 2-х, 4-х и 6-ти недель сохранения данным методом, высеваемость штаммов составляла 100%, мы увеличили время между пассажами до 3 месяцев. Длительное сохранение данным методом исследуемых культур до 24 месяцев пассаживанием через каждые 3 месяца позволило сохранить 88% штаммов (рис. 13).



При этом в течение 6 месяцев высеваемость составляла 100%. Рекультивированные штаммы *C. fetus* подвида *fetus* мы исследовали на изменения морфологических и культуральных свойств, а также вирулентности. Проводили сравнительный анализ свойств культур, выросших после 12 месяцев сохранения (4 пасажа) предложенным нами способом и культур после 5-го пассажа при классическом методе пересева.

Установлено, что при пересевах подвижность сохраняют менее 20% штаммов, тогда как при замораживании около 90% культур сохранило высокую подвижность. Характерная спиралевидная форма сохранилась более чем у 70% штаммов при культивировании в консервирующей смеси, и лишь у 20% при сохранении методом пересева. При сохранении новым методом более 90% выделенных культур обладали вирулентностью, при классическом методе пересева в 2 раза меньше.

Таким образом, большинство штаммов *C. fetus* подвида *fetus* сохранили характерные свойства при применении метода замораживания в консервирующей смеси. Консервирование выделяемых штаммов бактерий имеет большое значение для ретроспективного изучения их биологических свойств, для создания банка штаммов *C. fetus*, циркулирующих в определенных регионах, экологических нишах, и для обучающих целей. Новый метод выделения и идентификации *C. fetus* подвида *fetus*, предложенный в работе, значительно облегчает культивирование и идентификацию бактерий, выделенных из клинического материала.

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны доступные методы транспортировки, выделения и идентификации *S. fetus* при акушерско-гинекологических патологиях.
2. Разработан новый метод быстрой и упрощенной идентификации *S. fetus*.
3. Инфицированность *S. fetus* прямо зависит от тяжести заболевания: чаще их выделяли при ВУИ (71%), ХФПН (63%), гестозах (58%), выкидышах (58%) и мертворождениях (51%).
4. Установлена корреляция между сроками беременности и степенью обсемененности бактерий, достигающее своего максимума в третьем триместре беременности.
5. Установлено высокая степень вирулентности (89%), сочетающаяся с высокой адгезивностью (92%), способностью к синтезу гиалуронидазы (95%) и фибринолизина (84%) у выделенных изолятов *S. fetus* подвид *fetus*.
6. Выделенные изоляты проявляют чувствительность к цефтриаксону (91%), джозамицину (86%), нифулоксазиду (93%), ампициллину (85%), амоксициллину (90%) и ципрофлоксацину (84%). Большинство штаммов устойчивы к цефозолину (92%), эритромицину (43%), тетрациклину (64%) и метронидазолу (40%).
7. Предложен метод длительного сохранения выделенных бактерий (до 24 месяцев) при -10 °С в модифицированной консервирующей смеси на основе сахарозо-желатиновой среды в буферно-физиологическом растворе с последующей рекультивацией 89% штаммов.

### Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Морозова Л.Г. Метод выделения *Campylobacter fetus* при выявлении внутриутробной инфекции у беременных женщин / Л.Г. Морозова, **Я.А. Шихама**, А.А. Ибрагимова, Н.К. Минуллина, Ж.П. Федорова // Научно-практическая конференция молодых ученых КГМА, - Казань, 2007, С 99 – 101.
2. **Шихама Я.А.** Связь гинекологических патологий с инфицированность *Campylobacter fetus subsp. fetus* / Я.А. Шихама, О.К. Поздеев, А.А. Хасанов, Н.К. Минуллина, Ж.П. Федорова, Г.Н. Лапшина, А.А. Ибрагимова // окружающая среда и здоровье: материалы XV научно-практической конференции поволжского региона, ГОУ ДПО КГМА росздрава, - Казань, 2007, С 94 – 96.
3. **Шихама Я.А.** Этиологическая значимость *Campylobacter fetus* подвид *fetus* в инфекционных осложнениях беременности / Я.А. Шихама, И.А. Бакирова, О.К. Поздеев, А.А. Хасанов // Актуальные вопросы инфекционной патологии: материалы юбилейной научно-практической конференции КГМА, - Казань, 2007, С 94.
4. **Шихама Я.А.** Значение инфицирования *Campylobacter fetus* как причины репродуктивных потерь в обществе. « всероссийский смотр работ иностранных студентов и аспирантов вузов Российской Федерации »/ ТПУ, Томск, 2007
5. **Шихама Я.А.** Встречаемость вирулентных видов *Campylobacter* в акушерско-гинекологической практике / Я.А. Шихама, О.К. Поздеев, А.А. Ибрагимова, О.Н. Ильинская, А.А. Хасанов // IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, - Новосибирск, 2008, С 816.
6. **Шихама Я.А.** К изучению признаков патогенности и вирулентности у *Campylobacter fetus subsp. fetus*, как возбудителя патологии беременности / Я.А. Шихама, Л.Г. Морозова, А.А. Ибрагимова, Н.К. Минуллина, Ж.П. Федорова // научно-практическая конференция молодых ученых КГМА, - Казань, 2008, С 43 – 44.
7. **Шихама Я.А.** Клинико-бактериологические параллели между различными формами патологии беременных и кампилобактериозной инфицированностью /

Я.А. Шихама, О.К. Поздеев, Н.К. Минуллина, А.А. Ибрагимова, Г.Н. Лапшина, А.А. Хасанов, О.Н. Ильинская, М.П. Шулаева // окружающая среда и здоровье: XVI научно-практической конференции поволжского региона, ГОУ ДПО КГМА росздрава, - Казань, 2008, С 120 – 123.

8. **Шихама Я.А.** Патогенетическое значение ферментов патогенности кампилобактеров в акушерско-гинекологической практике / Я.А. Шихама, О.К. Поздеев, Л.Г. Морозова, Н. Осоманы, А.А. Ибрагимова, Г.Н. Лапшина // Материалы научно-практической конференции Поволжского региона « Окружающая среда и здоровье населения», - Казань, 2008, С 48 – 52.

9. **Шихама Я.А.** Этиологическая значимость и плазмидозависимые признаки патогенности *Campylobacter fetus fetus* в структуре акушерско-гинекологических инфекционных осложнений беременных / Я.А. Шихама, Г.Н. Лапшина, О.Н. Ильинская, О.К. Поздеев // Ученые записки Казанского государственного университета. - Казань, 2008. – Т150 (2). – С 259 – 264.

**Контакт:**

E-mail: sheehamajacob@yahoo.com