

УДК 579.84/86:57.083

Д.О. Степанський

БІОЛОГІЧНА РОЛЬ ГРАМПОЗИТИВНИХ КАТАЛАЗОНЕГАТИВНИХ КОКІВ І МЕТОДИ ЇХ ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ

*Дніпропетровська державна медична академія
кафедра мікробіології, вірусології, імунології та епідеміології
(зав. – д. мед. н., проф. Г.М.Кременчуцький)*

Ключові слова: *грампозитивні каталазонегативні коки, методи ідентифікації, інфекції*

Key words: *gram-positive catalase-negative cocci, methods of identification, infections*

Резюме. *В статті йдеться про особливості малоизученной групи микроорганизмов (грамположительные каталазоотрицательные кокки) и обобщаются мировые достижения в методах их выделения и идентификации. Особенно актуально вопросы выделения и идентификации стоят в наше время, когда наблюдается рост тяжелых инфекций, вызванных грамположительными каталазоотрицательными кокками. В связи с большой актуальностью этот вопрос должен привлечь внимание не только микробиологов, но и практикующих врачей.*

Summary. *The article dwells upon the peculiarities of the insufficiently explored group of microorganisms (gram-positive catalase-negative cocci) and generalizes the worldwide achievements in the methods of their distinguishing and identification. The problem of distinguishing and identification is particularly topical nowadays, when the rise of severe infections caused by gram-positive catalase-negative cocci is observed. Regarding a high actuality, this problem must draw attention both of microbiologists and practitioners.*

В останні роки спостерігається наростання частоти важких інфекцій, викликаних грампозитивними, каталазонегативними коками, які раніше не враховувалися при виділенні культур збудників.

Група гем-негативних коків містить 12 родів. Представники родів усередині цієї групи розрізняються продукцією гідролази L-піролідонил-β-нафтиламід (L-pirrolidonyl-β-naphthylamide; PYR) і лейцинамінопептидази (LAP), здатністю гідролізувати ескулін у присутності солей жовчі, продукцією газу із глюкози, здатністю рости в присутності 6,5% NaCl і при 45°C, рухливістю, чутливістю до ванкоміцину та типом гемолізу [7]. У літературі з'являється усе більше статей про аерококи, що викликають різні інфекції [6, 9]. Був описаний новий патогенний вид *A. urinae*, що викликає інфекції сечовивідних шляхів, ендокардити й сепсиси, які часто закінчуються летально у людей літнього віку й пацієнтів зі схильністю до сечових інфекцій [14]. Із крові та вагінального секрету були виділені аерококи, віднесені до роду *Aerococcus*, виду *A. christensenii* [15]. Із клінічних зразків (із крові хворих на пневмонію, ендокардит і у хворих із нез'ясованою клінікою) було виділено 16 культур, віднесених до виду *A. sanguinicola*. *A. sanguinicola* - каталазонегативні, вансоміцин-чутливі, грампозитивні коки, розташовані скупченнями та тетрадами, як всі види *Aerococcus*, крім *A. chris-*

tensenii (3 культури) [10]. На основі аналізу 16S rRNA gene sequence and DNA-DNA hybridization data була проведена рекласифікація виду *Pediococcus urinaeequi*, віднесеного до роду *Aerococcus* з ім'ям *Aerococcus urinaeequi* comb. nov. [10] Р.А. Lawson et al. (2001) [5] провели філогенетичне й фенотипічне вивчення грампозитивних, каталазонегативних коків, виділених із сечі. Порівняльне вивчення послідовності генів 16S r-RNA показало, що виділені коки є новим видом роду *Aerococcus*. Було запропоновано класифікувати новий вид як *Aerococcus urinaehominis* sp. nov. [9].

Практичні мікробіологи часто не звертають увагу на описувані мікроорганізми через їхню нестандартність у відношенні біохімічних і фізіологічних властивостей, у результаті чого вони не враховуються в клінічних аналізах. Необхідна розробка спеціальних методів транспортування і їхнього зберігання, з огляду на те, що ці бактерії є факультативно анаеробними, мікроаерофільними, або облігатно аеробними. Ми поставили за мету проаналізувати спектр грампозитивних каталазонегативних ванкоміцин-чутливих коків, виділених із сечі хворих з інфекцією сечовивідних шляхів, що відносяться до аерококоподібних коків.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Матеріалом дослідження були аналізи сечі хворих, що надійшли в бактеріологічну лабо-

раторію кафедри мікробіології з лікарень м. Дніпропетровська. Забір і транспортування аналізів, а також ідентифікація мікроорганізмів проводились згідно з уніфікованими методиками [5, 9.]

Визначення продукції пероксиду водню досліджуваними культурами проводилось йодометричним методом [2]. Ідентифікація культур аерококів проводилася згідно з визначником бактерій Берджі [15]. З метою виявлення аерококів при дослідженні сечі було додатково введене індикаторне середовище з калій-йод-крохмальною системою визначення пероксиду водню, яка була розроблена Г.М. Кременчуцьким та співавторами [4]. Чутливість до антибіотиків визначалася методом дифузії в агар із застосуванням дисків [3]. Антагоністична дія аерококів по відношенню до тест-культури мікроорганізмів вивчалася з використанням методики відстроченого антагонізму [1].

Наявність каталазної активності визначалась за методикою: частину колонії поміщують на предметне скло або порожню чашку Петрі й спостерігають за появою пухирців після додавання краплі 3%-ого H_2O_2 .

Тест чутливості до ванкоміцину визначався за методом Facklam і Вашингтона [13].

LAP-тест визначає наявність ферменту лейцин-амінопептидази (синонім - лейцин-аріламідаза) і визначається за допомогою API - швидкої стрептококової системи (bioMerieux Vitek, Hazewood, Mo.) та комерційного швидкого дискового тесту LAP (Carr-Scarborough Microbiologicals, Inc., Stone Mountain, Ga.).

Ріст на 6,5% NaCl визначався відповідно до методу Facklam й Washington [13].

PYR-тест, тест на гідроліз ескуліну визначалися згідно із загальноприйнятими методиками [9].

Якщо проводилась вибірка ізоляція членів ванкоміцинрезистентних родів *Leuconostoc* й *Pediococcus*, використовувалось середовище Таер-Мартина, щоб пригнітити ріст нормальної флори й інших контамінантів [7].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження проводилися на базі мікробіологічної лабораторії Дніпропетровської державної медичної академії. Було проведено 2730 аналізів сечі, що надійшли в лабораторію з лікувальних установ міста. Виділені аерококоподібні мікроорганізми з сечі склали 3,7% (101 мікроорганізм). Всі штами були виділені від осіб з інфекціями сечовивідних шляхів (ІСВШ), не супутніх іншим захворюванням.

Таблиця 1

Перелік штамів аерококоподібних мікроорганізмів, виділених з аналізів сечі

Кількість культур	Діагноз
10	Хронічний пієлонефрит
61	Інфекції сечовивідних шляхів у вагітних
5	Гострий пієлонефрит
24	Хронічний цистит
101	

Всі виділені культури були грампозитивними, нерухомими коками 1,0- 2,0 мкм у діаметрі, розташовувалися парами та кластерами. У мазках із культур, вирощених на рідких живильних середовищах, вони розташовані тетрадами. На агаризованих середовищах бактерії утворюють біло-сірі колонії. На кров'яному агарі викликають α -гемолиз, можливо, за рахунок утворення H_2O_2 , хоча проведені нами модельні експерименти по введенню розчинів H_2O_2 в кров'яний агар не дали позеленіння кров'яного агару. На індикаторному середовищі з калій-йод-крохмальною системою продукція аерококами пероксиду водню дає характерну зону посиніння. Виділені аерококоподібні мікроорганізми були каталазонегативними факультативними анаеробами. Подібно до ентерококів, вони росли на середовищах, що містять 6,5% NaCl, але не росли при 45°C. Росли в молоці з 0,1% метиленовим синім без редукації. Розкладали різноманітні вуглеводи з утворенням кислоти, але не газу. На підставі даних, наведених у роботах [5, 10], нами було підсумовано у таблиці властивості виділених видів аерококів асимілювати вуглеводи, їхнє відношення до основних диференціальних тестів та їх ідентифікація.

Необхідно відзначити, що при інфекціях сечовивідних шляхів найчастіше виділялися *A. urinae* і *A. urogenitalis*, що відповідає даним літератури [5, 11]. Характерною особливістю *A. viridans* є поява кольорової реакції при їх зростанні на спеціальному індикаторному середовищі. Ця властивість використовувалася нами при їх ідентифікації. На фотографії представлені культури *A. viridans*, посіяні у вигляді бляшок на спеціальне середовище.

Розподіл різних видів аерококів на підставі здатності асимілювати вуглеводи і їхнє відношення до основних диференціальних тестів

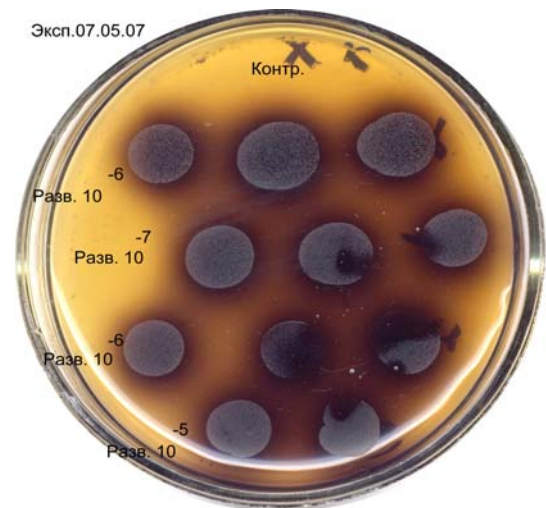
	<i>A. christensenii</i>	<i>A. sanguinicola</i>	<i>A. urinae</i>	<i>A. urinaeequi</i>	<i>A. urinaehominis</i>	<i>A. viridans</i>
Лактоза	-	-	-	вар.	-	+
Мальтоза	-	+	-	+	+	+
Манітол	-	-	+	вар.	-	вар.
Рибоза	-	-	вар.		+	вар.
Сахароза	-	+	+	+	+	+
Трегалоза	-	+	-	+	-	+
β-глюкуронидаза	-	+	+	-	+	вар.
Кисла пироглютамінова ариломидаза	-	+	-	-	-	+
Лейцин-ариламідаза	-	+	+	-	-	-
Аргінін-гідролаза	-	+	-	-	-	-
Гідроліз гіпурату	вар.	+	+	-	+	+
Гідроліз ескуліну	-	+	-	-	+	вар.
Кількість видів аерококів	6	5	45	0	30	15

Ця властивість характерна саме для *Aerococcus viridans*, що окиснюють молочну кислоту. Інші грам-позитивні каталазонегативні мікроорганізми в меншому ступені мають цю здатність, окиснюючи відновлений нікотинаміддинуклеотид.

Положення про ідентифікацію аерококів, представлені в цьому розділі, відбивають доступну інформацію, у цей час відносно нечасто ізолюваних грам-позитивних коків, які є факультативними анаеробами. Додаткові таксономічні дослідження клінічних ізолятів можуть змінити схеми ідентифікації, представлені тут. Хоча морфологія й забарвлення за Грамом (які найкраще візуалізуються в бульйонних культурах) дають суб'єктивну інтерпретацію, це використовується як головний пункт рішення в ідентифікації двох категорій: грам-позитивна морфологія, подібна до стрептококів, що представляє коки в парах і ланцюжках; і стафілококова морфологія, що складається з кокоподібних клітин (звичайно більше сферичної форми), розташованих парами, кластерами або тетрадами.

На додаток до перерахованих ознак аерококи ростуть слабо або не ростуть, коли культивуються в анаеробній атмосфері [9]. Це можна перевірити інкубацією двох культур на чашках із кров'яним агаром в анаеробній й аеробній атмосфері, порівнюючи ріст після 24 - 48 h.

Aerococcus viridans й *G. haemolysans* чутливі до пеніциліну й ванкоміцину і мають низький рівень стійкості до аміноглікозидів.



Зони забарвлення навколо бляшок росту аерококів

Вуи-Ної і колеги [8] відзначили, що, незважаючи на те, що *A. viridans* природно стійкі до макролідів, тетрацикліну і хлорамфеніколу, іноді спостерігалася стійкість до цих агентів. *A. urinae* був описаний як чутливий до пеніциліну й ванкоміцину, але стійкий до сульфонамідів і

нетилміцину, має негативний PYR і позитивний LAP-тест, на відміну від *A. viridans* [6]. Інформація з гетерогенної природи роду *Aerococcus* може бути знайдена в дослідженні Bosley [12]. Мікробіологи повинні радитися із клініцистами в оцінці значення цих нечасто ізолюваних організмів [11].

ВИСНОВКИ

1. Грампозитивні коки, обговорювані тут, можуть з'явитися в клінічних культурах як контамінанти або частина резидентної флори, їхня ідентифікація робиться, коли їхня ізоляція клінічно істотна (тобто ізолюються неодно-

разово, у чистій культурі або зі звичайно стерильних).

2. Роль описаних мікроорганізмів у виникненні інфекції сечовивідних шляхів не може бути завжди причиною хвороби, а може залежити від величини контамінації мікроорганізмів у сечі, починаючи з 10⁴ - 10⁵ КУО/мл.

3. Потрібно пам'ятати, що ці бактерії є опортуністами; ізоляція від імунокомпетентного пацієнта, можливо, не має того ж самого значення, як ізоляція від імуноскомпрометованого хазяїна.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. А-бактерин в лечении и профилактике гнойно-воспалительных процессов: Монография / Г.Н.Кременчуцкий, С.А.Рыженко, А.Ю.Вольнянский и др.-Днепропетровск: Пороги, 2000.- 150 с.
2. Государственная фармакопея СССР.- 10-е изд.- М.: Медицина, 1968.- 1079 с.
3. Об унификации методов определения чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам: Приказ № 250 МЗ СССР от 13.03.1975.- М., 1975.- 14 с.
4. Пат. 80892 Україна. Спосіб визначення оксидної активності мікроорганізмів/ Г.М.Кременчуцький, Д.О.Степанський, Л.В.Хілько (Україна).- № 200600328; заявл. 13.01.2006; Опубл. 12.11.2007, Бюл. № 18.
5. *Aerococcus urinaehominis* sp. nov., isolated from human urine/ Lawson P.A., Falsen J.E., Ohlen M., Collins M. D. // International J. Systematic Evolutionary Microbiology.-2001.-Vol. 51.-P. 683-686.
6. Aguirre, M., Collins M.D. Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from urinary tract infections: description of *Aerococcus urinae* sp. nov.// J. Gen. Microbiol.- 1992.-Vol. 138.-P.401-405.
7. Bascomb S., Manafi M. Use of Enzyme Tests in Characterization and Identification of Aerobic and Facultative Anaerobic Gram-Positive Cocci// Clin. Microb. Reviews.- 1998.- Vol. 11, N 2.- P. 318-340.
8. Buu-Hoi A., Le Bouguenec C., Horaud T. Genetic basis of antibiotic resistance in *Aerococcus viridans*// Antimicrob. Agents Chemother.- 1989.-Vol. 33.-P.529-534
9. Colman G. *Aerococcus*-like organisms isolated from human infections // J. Clin. Pathol. -1967.-Vol. 20.-P.294-297.
10. Facklam, R. R., Washington J. A. Streptococcus and related catalase-negative gram-positive cocci // Manual of Clinical Microbiology / Balows A., Hausler W.J., Herrmann K.L., Isenberg H.D. et al.- 5th ed.- Washington, 1991.- Vol. 2.- P. 238-257.
11. Facklam R., Elliott J.A. Identification, classification, and clinical relevance of catalase-negative, Gram-positive cocci, excluding the streptococci and enterococci // Clin. Microbiol. Rev.- 1995.-N 8.-P. 479-495.
12. Phenotypic characterization, cellular fatty acid composition, and DNA relatedness of aerococci and comparison to related genera / Bosley, G.S., Wallace P.L., Moss C.W. et al. // J. Clin. Microbiol. -1990.-Vol 28.-P.416-421.
13. Phenotypic Description and Antimicrobial Susceptibilities of *Aerococcus sanguinicola* Isolates from Human Clinical Samples / Facklam R., Lovgren M., Shewmaker P., Tyrrell G. // J. Clinical Microbiology.- 2003.-Vol. 41, N 6.-P.2587-2592.
14. Schuur P.M., Kasteren M.E., Sabbe L. Urinary tract infections with *Aerococcus urinae* in the south of The Netherlands// Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.- 1997.- Vol.16, N 12. -P.871-875.
15. The low G + C Gram-positive Bacteria / Bergey's Manual of Systematic Bacteriology George M. Garrity.- 2-nd Edition.- New York : Editor-in- Chief Springer, 2006.- Vol. 3- P. 167-194.

