

БАКТЕРИЦИДНЫЕ СВОЙСТВА МОЧИ

[Е. В. Кульчавеня^{1,2}, О. И. Альховик¹, А. Г. Чередниченко¹](#)

¹ФГБУ «Новосибирский НИИ туберкулёза» Минздрава России (г. Новосибирск)

²ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (г. Новосибирск)

Проведено определение потенциальной бактерицидной противотуберкулезной активности и активности против условно-патогенных энтеробактерий мочи здоровых людей с использованием автоматизированной системы ВАСТЕС MGIT 960 для культивирования и определения лекарственной устойчивости микобактерий и посева на плотные питательные среды. Установлено, что моча здоровых людей *не обладает* бактерицидной активностью по отношению к *M. tuberculosis in vitro* и кишечной палочке.

Ключевые слова: микобактерия, кишечная палочка, бактерицидность, моча.

Кульчавеня Екатерина Валерьевна — доктор медицинских наук, профессор кафедры туберкулёза ФПК и ППВ ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», главный научный сотрудник, руководитель отдела урологии ФГБУ «Новосибирский НИИ туберкулёза», рабочий телефон: 8 (383) 203-79-89, e-mail: urotub@yandex.ru

Альховик Ольга Ивановна — врач-микробиолог бактериологической лаборатории ФГБУ «Новосибирский НИИ туберкулёза», рабочий телефон: 8 (383) 203-83-62

Чередниченко Андрей Георгиевич — заведующий бактериологической лабораторией ФГБУ «Новосибирский НИИ туберкулёза», рабочий телефон: 8 (383) 203-83-62

Введение. Урогенитальные инфекции являются одной из самых частых причин обращения пациентов к урологу [1]; при этом результаты лечения оставляют желать лучшего — не менее половины острых случаев переходят в разряд хронических [2]. Одним из предрасполагающих факторов является дефицит эстрогенов у женщин в менопаузе. Недостаток половых гормонов приводит к структуральным и биохимическим изменениям уротелия, способствует накоплению остаточной мочи. Местное применение эстрогенов у пожилых женщин с возвратным циститом способствует продукции антимикробных пептидов и уплотняет межклеточную связь, что препятствует проникновению микроорганизмов в глубокие слои [3].

Предполагается, что нарушение целостности глюкозаминогликанового слоя уротелия является предрасполагающим фактором для возникновения интерстициального цистита. Есть данные о генетически обусловленной предрасположенности к заболеванию циститом [4].

Тем не менее, несмотря на высокий уровень заболеваемости, обилие предрасполагающих и отягчающих факторов, инфекции нижних мочевых путей не являются тотальным заболеванием, у некоторой части популяции имеется к ним устойчивость.

Мы предположили, что причиной этого является выработка уротелием антимикробных веществ с целью самозащиты (например, лизоцим), и для проверки данной гипотезы провели настоящее исследование.

Цель исследования: определение наличия бактерицидной противотуберкулезной активности и активности против условно-патогенных энтеробактерий мочи здоровых людей с использованием автоматизированной системы BACTEC MGIT 960 для культивирования и определения лекарственной устойчивости микобактерий и посева на плотные питательные среды.

Материал и методы. Учитывая влияние большого числа факторов на заболеваемость урогенитальными инфекциями, бактерицидность мочи оценивалась в 4-х группах здоровых людей: 1-я — женщины репродуктивного возраста без контрацепции, 2-я — женщины репродуктивного возраста, принимающие оральные комбинированные контрацептивы, 3-я — женщины в менопаузе, 4-я — молодые мужчины. Потенциальная бактерицидность средней порции дневной мочи оценивалась по влиянию на клинический изолят *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью, Референс-штамм *M. tuberculosis* H₃₇Rv (NCDC) и референс-штамм *E. coli* F-50 (№ штамма 2592).

Применялись следующие питательные среды и растворители:

1. жидкая питательная среда Middelbrook 7H9 BBL™ MGIT™ (Becton Dickinson);
2. обогатительная добавка BACTEC MGIT Growth Supplement OADC (Becton Dickinson) (10 %);
3. кровяной питательный агар 5 % (нативный);
4. питательная среда Финн II (яичная, нативная);
5. физиологический раствор;
6. дистиллированная вода;
7. фосфатный буфер pH 7,8.

Ход исследования. Образцы мочи, полученные в течение 20 мин от здоровых людей, инокулировались на кровяной агар по количественному методу секторных посевов Голда. Инкубация проводилась в течение 18-20 часов при температуре 37 °С.

Приготовление бактериальной суспензии кишечной палочки проводили следующим образом: 18-часовую культуру *E. coli* суспендировали в стерильном физиологическом растворе, при помощи нефелометра (Phoenix Spec. BD) и доводили до стандарта мутности McFarland 1,0; 0,5, 0,25, что соответствует 3×10^8 , $1,5 \times 10^8$ и $0,75 \times 10^8$ микробных тел/мл соответственно.

Бактериальные суспензии кишечной палочки в трех разведениях (3×10^8 , $1,5 \times 10^8$ и $0,75 \times 10^8$ микробных тел/мл) в соотношении 1:1 смешивали с образцами мочи и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. Для контроля искомые суспензии в соотношении 1:1 смешивали с физиологическим раствором. После часовой экспозиции производили высев на кровяной агар. Экспозицию продолжали при комнатной температуре еще в течение 24 часов, затем также проводили высев на кровяной агар.

В отношении микобактериальных культур использовали иную технологию.

Двухнедельные микобактериальные культуры музейного штамма и клинического образца, выделенного от больного, выросшие на среде Левенштейна-Йенсена, в количестве

не менее 50-ти колоний переносили в пробирку со стерильным физиологическим раствором и со стеклянными бусами. Содержимое пробирки гомогенизировали на вортексе в течение 1-2 мин, оставляли на 10-15 мин для осаждения частиц. Супернатант переносили в другую пробирку, мутность суспензии корректировали в соответствии со стандартом 5Ед ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Далее делали 5 последующих десятикратных разведений; для исследования использовали 2 последних разведения (5×10^4 , 5×10^3).

Инкубацию и детекцию роста выполняли по следующей методике. Микобактериальные суспензии музейного штамма и клинического образца, выделенного от больного, в разведениях 5×10^4 , 5×10^3 смешивали с испытуемыми образцами мочи в соотношении 1:1. После часовой экспозиции проводили стандартную предпосевную обработку фосфатным буфером с последующим центрифугированием 20 мин 3000g.

В качестве контроля использовали физиологический раствор, который смешивали с микобактериальными культурами в соотношении 1:1. После часовой экспозиции проводили также стандартную предпосевную обработку фосфатным буфером с последующим центрифугированием 20 мин 3000g.

Кроме того, производили посев микобактериальных культур в разведениях 5×10^4 , 5×10^3 на плотные и жидкие среды до обработки биологическими жидкостями и физиологическим раствором (контроль ростовых свойств). Посев осадка проводили на среду Финн II и бульон Middlbrook 7H9 BBL™ MGIT™ (Becton Dickinson) в количестве 0,5 мл. Засеянные пробирки с плотной питательной средой инкубировали в термостате при температуре 37 °С. Проводили ежедневный просмотр засеянных пробирок.

Засеянные пробирки MGIT инкубировали в системе BACTEC MGIT 960 до автоматической индикации наличия роста, которая подтверждается путем микроскопии мазков с окраской по Циль-Нельсену. Пробирки с положительным результатом извлекали, пробирки с отсутствием роста продолжали инкубировать до 42-х дней.

Результаты. Результаты исследования представлены в таблицах: табл. 1 — активность по отношению к *E. coli*, и табл. 2 — по отношению к *M. tuberculosis*.

Таблица 1

Бактерицидная активность мочи по отношению к кишечной палочке

Образец	Разведение <i>E. coli</i> McFarland 1ед	Разведение <i>E. coli</i> McFarland 0,5ед	Разведение <i>E. coli</i> McFarland 0,25 ед	Стерильность
Моча № 1	Рост на кровяном агаре есть	Рост на кровяном агаре есть	Рост на кровяном агаре есть	Нестерильно
Моча № 2	Рост на кровяном агаре есть	Рост на кровяном агаре есть	Рост на кровяном агаре есть	Стерильно
Моча № 3	Рост на кровяном агаре есть	Рост на кровяном агаре есть	Рост на кровяном агаре есть	Стерильно
Моча № 4	Рост на кровяном агаре есть	Рост на кровяном агаре есть	Рост на кровяном агаре есть	Стерильно
Контроль (физраствор)	Рост на кровяном агаре есть	Рост на кровяном агаре есть	Рост на кровяном агаре есть	Стерильно

Как следует из табл. 1, во всех категориях испытуемых моча по своей бактерицидной активности не отличалась от физиологического раствора. После экспозиции 60 мин

и 24 часа во всех образцах получен сливной рост *E. coli* на кровяном агаре. Таким образом, бактерицидного действия мочи на *E. coli* в концентрациях 3×10^8 , $1,5 \times 10^8$ и $0,75 \times 10^8$ микробных тел/мл не отмечено.

Таблица 2

Бактерицидная активность мочи по отношению к микобактерии туберкулеза 2

Образец	H ₃₇ Rv 10 × 3 бактек	H ₃₇ Rv 10 × 3 ППС	H ₃₇ Rv 10 × 4 бактек	H ₃₇ Rv 10 × 4 ППС	Кл. шт. 10 × 3 бактек	Кл. шт. 10 × 3 ППС	Кл. шт. 10 × 4 бактек	Кл. шт. 10 × 4 ППС
Моча № 1	Контам	Контам	Контам	Контам	Контам	Контам.	Контам	Контам.
Моча № 2	Рост 15 сут.	Рост 31 сут. 21 КОЕ	Рост 17 сут.	Рост 34 сут. > 50 КОЕ	Рост 16 сут.	Рост 52 сут. 30 КОЕ	Рост 19 сут.	Рост 44 сут. > 50 КОЕ
Моча № 3	Рост 13 сут.	Рост 35 сут. 12 КОЕ	Рост 17 сут.	Рост 36 сут. > 50 КОЕ	Рост 15 сут.	Рост 57 сут. 19 КОЕ	Рост 18сут.	Рост 44 сут. > 50 КОЕ
Моча № 4	Рост 16 сут.	Рост 31 сут. 16 КОЕ	Рост 19 сут.	Рост 36 сут. > 50 КОЕ	Рост 17 сут.	Рост 36 сут. > 50 КОЕ	Рост 22 сут.	Рост 36 сут. > 50 КОЕ
Контроль (физ. р-р)	Рост 14 сут.	Рост 31 сут. 18 КОЕ	Рост 18 сут.	Рост 36 сут. > 50 КОЕ	Рост 16 сут.	Рост 36 сут. > 50 КОЕ	Рост 14 сут.	Рост 36 сут. > 50 КОЕ
Без обработки	Рост 12 сут.	Рост 22 сут. 28 КОЕ	Рост 10 сут	Рост 21сут > 50КОЕ	Рост 14 сут.	Рост 18 сут. 24 КОЕ	Рост 10 сут	Рост 14 сут. > 50КОЕ

Анализ табл. 2 показал, что после экспозиции 45 суток при ежедневном контроле роста и подсчете КОЕ моча здоровых людей *не обладает* бактерицидной активностью по отношению *M. tuberculosis in vitro*.

Выводы. Таким образом, проведенное исследование не подтвердило гипотезу о природном защитном факторе мочевых путей от инфекции за счет бактерицидности мочи.

Список литературы

1. Шевченко С. Ю. Инфекции мочевыводящих путей в структуре поликлинического приема уролога [Электронный ресурс] / С. Ю. Шевченко, Е. В. Кульчавеня, Я. В. Зулин // Медицина и образование в Сибири : сетевое научное издание. — 2013 — № 5. — Режим доступа : (http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1140)
2. Urinary concentrations and antibacterial activity of Nitroxoline 250mg versus Trimethoprim 200mg against uropathogens in healthy volunteers / F. M. Wagenlehner, F. Münch, A. Pilatz [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. — 2013 Nov. — Vol. 11.
3. Lühje P. Estrogenic action on innate defense mechanisms in the urinary tract / P. Lühje, A. Lindén Hirschberg, A. Brauner // Maturitas. — 2013 Nov. — Vol. 5.
4. Intravesical liposome versus oral pentosan polysulfate for interstitial cystitis/painful bladder syndrome / Y. C. Chuang, W. C. Lee, W. C. Lee, P. H. Chiang // J. Urol. — 2009 Oct. — Vol. 182 (4). — P. 1393-400.

BACTERICIDAL PROPERTIES OF URINE

[E. V. Kulchavenya](#)^{1,2}, [O. I. Alkhovik](#)¹, [A. G. Cherednichenko](#)¹

¹FBHE «Novosibirsk SRI of tuberculosis» of Ministry of Health (Novosibirsk c.)

²SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health» (Novosibirsk c.)

Determination of potential bactericidal antituberculous activity and activity against opportunistic enterobacteria of urine at healthy people with usage of automated BACTEC MGIT 960 system for cultivation and determination of medicinal fastness of micobacteria and crops on dense mediums is performed. It is established that urine of healthy people doesn't possess bactericidal activity in relation to M. tuberculosis in vitro and intestinal bacterium.

Keywords: micobacterium, intestinal bacterium, bactericidal action, urine.

About authors:

Kulchavenya Ekaterina Valeryevna — doctor of medical sciences, professor of tuberculosis chair of FAT & PDD at SBEI HPE «Novosibirsk State Medical University of Ministry of Health», chief research officer, head of urology department at FBHE Novosibirsk SRI of tuberculosis of Ministry of Health, office phone: 8 (383) 203-79-89, e-mail: urotub@yandex.ru

Alkhovik Olga Ivanovna — microbiologist of bacteriological laboratory at FBHE Novosibirsk SRI of tuberculosis of Ministry of Health, office phone: 8 (383) 203-83-62

Cherednichenko Andrey Georgiyevich — manager of bacteriological laboratory at FBHE Novosibirsk SRI of tuberculosis of Ministry of Health, office phone: 8 (383) 203-83-62

List of the Literature:

1. Shevchenko S. Y. Urinary tract infections in structure of polyclinic consultation of urologist [electron resource] / S. Y. Shevchenko, E. V. Kulchavenya, Y. V. Zulin // *Medicine and education in Siberia: mains-operated scientific edition*. — 2013 — № 5. — Access mode: (http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1140).
2. Urinary concentrations and antibacterial activity of Nitroxoline 250mg versus Trimethoprim 200mg against uropathogens in healthy volunteers / F. M. Wagenlehner, F. Münch, A. Pilatz [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother*. — 2013 Nov. — Vol. 11.
3. Lühje P. Estrogenic action on innate defense mechanisms in the urinary tract / P. Lühje, A. Lindén Hirschberg, A. Brauner // *Maturitas*. — 2013 Nov. — Vol. 5.
4. Intravesical liposome versus oral pentosan polysulfate for interstitial cystitis/painful bladder syndrome / Y. C. Chuang, W. C. Lee, W. C. Lee, P. H. Chiang // *J. Urol*. — 2009 Oct. — Vol. 182 (4). — P. 1393-400.