

Козлова А. И.
Гомельский государственный медицинский университет, Беларусь
Танальский Д. В.
Гомельский государственный медицинский университет, Беларусь

ФАГОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ KLEBSIELLA PNEUMONIAE С КЛАССИЧЕСКИМ И ГИПЕРМУКОИДНЫМ ФЕНОТИПАМИ

В настоящее время различают две эволюционные ветви *Klebsiella pneumoniae*: классические (classical *K. pneumoniae* — сКР) и филогенетически более поздние гипервирулентные (hypervirulent *K. pneumoniae* — hvКР). Классические изоляты *K. pneumoniae* выделяются главным образом из клинических образцов при инфекциях, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП). Штаммы гипервирулентных *K. pneumoniae* являются основными возбудителями ряда характерных инфекций (например, первичного пиогенного абсцесса печени с метастазированием в различные органы) у иммунокомпетентных лиц; в настоящее время они играют значимую роль при внебольничной патологии.

Как известно, подавляющее большинство изолятов *K. pneumoniae* образует слизистые (мукоидные) колонии на питательных средах благодаря наличию полисахаридной капсулы. Однако степень «слизистости» может значительно варьировать. Как правило, сКР обладают классическим фенотипом с типичными мукоидными колониями, тогда как hvКР присущ гипермукоидный фенотип с избыточной продукцией капсульного материала. Многочисленными исследованиями зарубежных и российских авторов подтверждено, что именно гипермукоидные культуры *K. pneumoniae* должны рассматриваться в качестве потенциально гипервирулентных штаммов. Самым доступным фенотипическим методом для оценки степени мукоидности культуры является string-тест [2].

Штаммы hvКР появились в середине 80-х годов в странах Азиатско-Тихоокеанского региона и в настоящее время регистрируются по всему миру. Характерно, что антибиотикочувствительность hvКР остается на высоком уровне, хотя уже встречаются конвергентные мульти- или экстремально-антибиотикорезистентные гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae*. Помимо антибиотиков сдерживающим фактором распространения hvКР могут стать клебсиеллезные бактериофаги, способные разрушать капсульный материал «мишени» специфическими деполимеразами. В исследованиях различных авторов отмечен переменный уровень фагочувствительности культур *K. pneumoniae*.

Таким образом, при текущей эпидемиологической ситуации в мире в спектр микробиологического мониторинга должны быть включены гипермукоидные штаммы *K. pneumoniae*, рекомендуется определять их чувствительность не только к антибиотикам, но и к коммерческим препаратам бактериофагов.

Цель исследования — оценить чувствительность клинических изолятов *K. pneumoniae* с гипермукоидным и классическим фенотипами к коммерческим препаратам бактериофагов.

Материалы и методы. Изучено 136 клинических изолятов *K. pneumoniae*, выделенных в 2012–2015 гг. от госпитализированных пациентов в лечебных учреждениях из трех регионов Беларуси (Гомель, Минск, Могилев). Все изоляты были выделены из различных видов клинического материала. Идентификация микроорганизмов осуществлялась на микробиологических анализаторах VITEK 2 Compact и VITEK MS (bioMérieux, Франция).

Гипермукоидный фенотип штаммов определяли при постановке string-теста [2] с использованием суточной культуры возбудителя, выращенной на коммерческом кровяном агаре с 5 % бараньих эритроцитов. Тест считали положительным, если за бактериологической петлей тянулся слизистый тяж высотой более 5 мм от поверхности питательной среды.

В исследование включены препараты для фаготерапии производства НПО «Микроген» (Российская Федерация) с заявленной активностью против клебсиелл: «Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный» и «Сестафаг». Определение чувствительности изолята к коммерческим препаратам бактериофагов проводили капельным методом (spot-test) [1]. Для приготовления инокулюма использовали чистые суточные бактериальные культуры. По стандартной методике готовили суспензии с оптической плотностью 0,5 по МакФарланду и хлопковым тампоном проводили инокуляцию на поверхность среды в трех направлениях. Далее чашки подсушивали 30–60 мин при комнатной температуре, накрыв их стерильными бумажными фильтрами. На подсушенную поверхность пипеткой наносили препараты бактериофагов в объеме 20 мкл. Чашки повторно подсушивали 15–30 мин, закрывали, переворачивали и инкубировали 18–20 ч при температуре 37 °С. Учет степени лизиса выполняли по четырехкрестной системе. Результаты от 3+ до 4+ учитывали как положительные. Исследование проводили в трех повторах.

Результаты и обсуждение. В ходе исследования 136 клинических изолятов *K. pneumoniae* на основании положительного string-теста выявлено 14 (10,3 %) изолятов с гипермукоидным фенотипом. Остальные 122 (89,7 %) изолята *K. pneumoniae* расценивались как штаммы с классическим (мукоидным) фенотипом. Показано, что исследуемые культуры *K. pneumoniae* с гипермукоидным фенотипом более чувствительны к препарату «Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный» по сравнению с классическими изолятами (χ -квадрат = 9,860, p = 0,002). На литическую активность препарата «Секстафаг» наличие гипермукоидного фенотипа у штамма существенного влияния не оказывало (χ -квадрат = 0,746, p = 0,388).

Результаты исследования фагочувствительности клинических изолятов *K. pneumoniae* к двум коммерческим препаратам бактериофагов представлены на рисунке.

Ввиду небольшой выборки гипермукоидных изолятов *K. pneumoniae* в нашем исследовании нельзя достоверно утверждать, какой из препаратов бактериофагов более активен в отношении данной популяции бактерий, но, фактически,

«Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный» характеризовался более выраженной литической активностью в отношении штаммов с гипермукоидным фенотипом (42,86 % фагочувствительных изолятов) по сравнению с «Секстафагом» (28,57 %). Достаточно выраженная литическая активность поливалентного бактериофага в отношении штаммов *K. pneumoniae* с гипермукоидным фенотипом указывает на возможность его перспективного использования для терапии инвазивных инфекций, вызванных hνКР с обязательным условием предварительного определения фагочувствительности выделенного изолята *in vitro*.

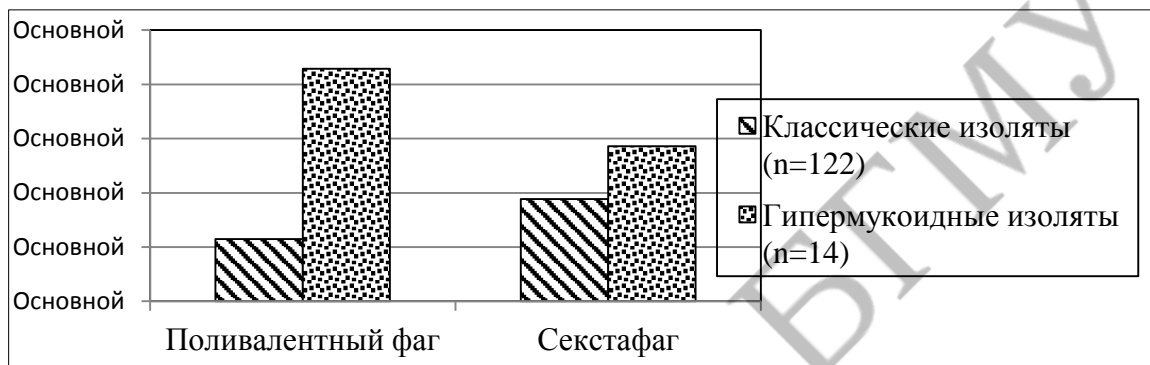


Рис. Фагочувствительность классических и гипермукоидных изолятов *K. pneumoniae* (% чувствительных изолятов)

Определенно, эпидемиологическая ситуация в мире требует целенаправленного поиска во внешней среде новых безопасных литических бактериофагов, обладающих высокой активностью в отношении гипермукоидных hνКР, которые могут также являться потенциальными продуцентами карбапенемаз.

Выводы. Изоляты *K. pneumoniae* с гипермукоидным фенотипом были более чувствительны к препарату «Бактериофаг клебсиелл поливалентный очищенный» по сравнению с классическими изолятами. На литическую активность препарата «Секстафаг» характер фенотипа существенного влияния не оказывал.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике. Федеральные клинические рекомендации / Б. И. Асланов [и др.]. Москва, 2014. 39 с.
2. Shon, A. S. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* : a new and dangerous breed / A. S. Shon, R. P. Bajwa, T. A. Russo // Virulence. 2013. Vol. 4, № 2. P. 107–118.