

## **Тест-системы для идентификации стрептококков и определения их чувствительности к антибиотикам с учетом способности образовывать биопленку**

*Пинчук А. Н., Лептеева Т. Н., Гончарова А. И., Шилин В. Е., Окулич В. К.*

*Учреждение образования*

*«Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»,  
г. Витебск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Стрептококки имеют наибольшую значимость как одни из ведущих патогенов гнойно-воспалительных инфекций верхних дыхательных путей, кожных покровов с развитием постстрептококковых аутоиммунных (ревматизм, гломерулонефрит) и токсико-септических



осложнений (синдром токсического шока, перитонзиллярный абсцесс, сепсис и др.) [1]. В связи с широкой распространенностью стрептококковых заболеваний и угрозой развития осложнений инфекционного и иммуноопосредованного характера проблема рациональной и эффективной профилактики является одной из приоритетных в практическом здравоохранении. Кроме этого, стрептококки, как и большинство других микроорганизмов, в естественных и искусственно созданных окружающих средах пребывают в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ — биопленок, что также диктует необходимость пересматривать многие принципы микробиологических исследований, а также искать пути эффективной борьбы с ними [2, 3].

**Ключевые слова:** стрептококки, гнойно-септические инфекции, биопленки, тест-системы, антибиотики.

**Введение.** Актуальность гнойно-воспалительных заболеваний, вызываемых различными видами стрептококков, обусловлена убиквитарностью их распространения, высоким уровнем заболеваемости, многообразием нозологических форм и их осложнений, вовлечением в эпидемический процесс наиболее уязвимых групп населения: детей, беременных. В этиологической структуре развития острых респираторных заболеваний около 10–15 % приходится на стрептококки; 70–90 % ангины, каждый шестой случай — острый нефрит/гломерулонефрит, каждый десятый случай — заболевания кожи и подкожной клетчатки также связаны со стрептококковой этиологией [4].

Недостаточная эффективность проводимого лечения гнойно-воспалительных инфекций в определенной мере объясняется наличием у стрептококков действенных механизмов защиты от внешних повреждающих факторов. Широкое применение антисептиков и дезинфектантов в лечебных учреждениях, профильных лабораториях биотехнологических и пищевых производств, а также в повседневной жизни обеспечивает выраженное селективное действие на популяции микроорганизмов и способствует отбору резистентных штаммов в составе биопленки [5].

Таким образом, образование биопленок госпитальными изолятами дают основания для совершенствования методов лабораторной диагностики стрептококковых инфекций, разработки новых подходов для идентификации и изучения биопленок, изменения тактики антибиотикотерапии, а также поиска ингибиторов межклеточной сигнализации, ферментов и других методов разрушения биопленок [6].

Использование разработанных нами тест-систем «ИД-СТРЕП» и «АБ-СТРБ» позволит максимально быстро идентифицировать выделенные штаммы микроорганизмов, определить устойчивость к тем или иным антибиотикам (с учетом формирования стрептококками биопленок), своевременно назначить рациональную этиотропную антибактериальную терапию, а следовательно, предупредить развитие постстрептококковых осложнений и обеспечить благоприятный прогноз заболевания.

**Цель работы** — разработка автоматизированных тест-систем для идентификации стрептококков и определения их чувствительности к антибиотикам с учетом способности образовывать биопленку.

**Материалы и методы.** До назначения антибактериального лечения сбор патологического материала из гнойно-некротического очага осуществляли ватным тампоном, который помещали в стерильную пробирку со средой для накопления неспорогенных анаэробов. Материалами также явились биоптаты глубоких тканей, которые являются более информативным материалом по сравнению с мазками и соскобами. Далее, используя 5 %-й кровяной Колумбия-агар, выделяли чистые культуры микроорганизмов или материал изолированных колоний с плотных питательных сред после первичного посева образца клинического материал.

Для тест-системы «ИД-СТРЕП», предназначенной для идентификации и дифференциации микробов рода *Streptococcus*, с учетом коммерческих характеристик реагентов были отобраны 22 хромогенных субстрата, которые в зависимости от проявленной активности были разделены на следующие группы:

а) тесты на способность утилизировать углеводы (D-рибоза, D-маннит, D-лактоза, D-трегалоза, D-раффиноза, D-сахароза, L-арабиноза,  $\alpha$ -циклодекстрин, пуллулан, D-мальтоза, D-мелибиоза, D-мелицитоза, метил- $\beta$ D-глюкопиранозид, D-тагатаза);

б) тест на определение активности щелочной фосфатазы (4-нитрофенил- $\beta$ D-галактопиранозид);

в) тесты для определения  $\alpha$ -,  $\beta$ -галактозидазной,  $\beta$ -глюкозидазной, пироглютаминат-ариламидазной активностей (4-нитрофенил- $\alpha$ D-галактопиранозид, 2-нафтил- $\beta$ D-галактопиранозид, резорифин- $\beta$ D-галактопиранозид, резорифин- $\beta$ D-глюкопиранозид, пироглютаминат- $\beta$ -нафтиламид);

- г) тест на образование ацетоина (натрия пируват);
- д) тест на определение способности гидролизовать натрия гиппурат.

Взвешенные субстраты растворяли в соответствующих буферных растворах с добавлением индикатора фенолового красного (или без него), после чего полученные растворы вносили в лунки планшета с последующим их дегидрированием в течение суток. Непосредственно для проведения идентификации стрептококков готовили суспензии исследуемых суточных культур на  $(2 \pm 0,1)$  мл стерильной деионизированной воде с плотностью 3 оптические единицы *McFarland*, после чего полученную взвесь микроорганизмов вносили по 135 мкл в лунки планшета. Затем планшет накрывали крышкой и инкубировали при температуре  $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$  в течение 18–24 ч в аэробных условиях и производили визуальный/инструментальный учет.

На основе запатентованной разработки «Способ определения минимальной подавляющей концентрации антибиотика для бактерий, способных формировать биопленку» разработана тест-система «АБ-СТРБ», состоящая из двух иммунологических планшетов с лиофильно высушенными антибиотиками и включающая два этапа исследований.

Первый этап позволяет определить чувствительность планктонной формы стрептококков к антибактериальным лекарственным средствам, а также выявить способность микроорганизмов формировать биопленку. На основании литературных источников были отобраны 19 антибиотиков, рекомендованных EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA), инструкцией Министерства здравоохранения Республики Беларусь при определении чувствительности стрептококков и энтерококков к антибиотикам: амикацин, амоксициллин+клавулат, ампициллин+сульбактам, бензилпенициллин, имипенем, линезолид, меропенем, моксифлоксацин, ципрофлоксацин; ампициллин Е, ванкомицин Е, гентамицин Е, левофлоксацин Е, стрептомицин Е, тетрациклин Е, тигециклин Е, фосфомицин Е, хлорамфеникол Е, эритромицин Е (АБ-СТРБ № 1).

Если микроорганизм формирует биопленку, то следует переходить ко второму этапу, в ходе которого с помощью тест-системы определяется чувствительность стрептококков в составе биопленки к антибактериальным средствам. На основании данных литературы и результатов наших собственных исследований для данной тест-системы были подобраны те антибиотики, которые в той или иной степени способны проникать через матрикс биопленки: фторхинолоны (левофлоксацин, ципрофлоксацин, моксифлоксацин), а также тигециклин, линезолид, фосфомицин (АБ-СТРБ № 2).

Для постановки опыта по определению чувствительности готовили взвесь микроорганизмов. Для этого бактериологической петлей вносили одну или более колоний, выращенных в течение 18–24 ч при  $37^\circ\text{C}$  на среде для роста стрептококков или селективной для роста энтерококков в ампулу (флакон) с 2 мл стерильного раствора хлорида натрия с массовой долей 0,9 %. Оптическая плотность взвеси в ампуле после внесения микроорганизма должна была соответствовать 0,5 оптических единиц *McFarland*. Далее переносили в ампулу с питательной средой для определения чувствительности стрептококков к антибиотикам 200 мкл приготовленной взвеси бактерий и тщательно перемешивали. Вносили в каждую лунку планшета по 135 мкл приготовленной питательной среды с микроорганизмами (конечная концентрация бактерий  $3,0 \cdot 10^6$  КОЕ/мл). Планшет накрывали крышкой и инкубировали 18–24 ч при  $35\text{--}37^\circ\text{C}$  в термостате в капнофильных условиях (5–10 %  $\text{CO}_2$ ).

Непосредственно индикацию биопленки проводили с использованием раствора кристаллического фиолетового. Фиксировали пленку в первых двух лунках каждого ряда путем добавления в них по 160 мкл 2,5%-го раствора глютаральдегида (экспозиция в течение 5 мин). Затем от раствора глютаральдегида четырехкратно отмывали с помощью автоматической мойки или вручную, используя по 200 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл. Затем для окраски пленки в лунки планшета вносили по 180 мкл 0,25%-го раствора кристаллического фиолетового на 5 мин, после чего планшет снова четырехкратно отмывали, используя по 200 мкл дистиллированной воды на одну лунку на один цикл, и высушили в течение 10 мин. Для экстракции раствора красителя из клеток в лунки добавляли по 200 мкл 33%-й раствор уксусной кислоты (экспозиция при комнатной температуре 10 мин). Измерение оптической плотности ( $E_{\text{оп}}$ ) в лунках планшет определяли в многоканальном спектрофотометре при длине волны 620 нм. Для определения способности изолята формировать биопленку определяли количество биопленки для лунок с микроорганизмами, образующими биопленку, по формуле

$$X = 226,28 \cdot [E_{\text{оп пробы}} - E_{\text{оп контроля}}]^{1,2755},$$

где  $X$  — масса биопленки.



Оценка качества и воспроизводимости проводилась с применением стандартного штамма *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813 (ATCC — Американская коллекция типов культур). Для сравнения результатов наряду с тест-системами «ИД-СТРЕП» и «АБ-СТРБ» параллельно использовались коммерческие тест-системы rapid ID32 STREP и ATB Expression фирмы BioMerieux (Франция) с помощью программы bactoSTREP (№ 954 от 6 июня 2017 г., зарегистрированная в Национальном центре интеллектуальной собственности).

Полученные данные подвергались статистической обработке с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0 Advanced и Excel. Перед использованием методов описательной статистики определяли тип распределения количественных признаков с использованием критерия Шапиро — Уилка. Для признаков с нормальным распределением рассчитывали среднюю арифметическую ( $M$ ) и стандартное отклонение ( $\delta$ ). При распределении признака, отличного от нормального, вычисляли медиану ( $Me$ ), нижний 25-й ( $LQ$ ) и верхний 75-й квантили ( $UQ$ ). Оценку статистической значимости различий между зависимыми группами проводили с учетом распределения признака с использованием дисперсионного анализа по Фридмену и непараметрического теста Вилкоксона с учетом поправки Бонферони ( $p \times 6$ ). Для оценки статистической значимости между несвязанными группами использовался критерий Манна — Уитни ( $U$ ). Различия признавались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** С помощью разработанных нами тест-системы «ИД-СТРЕП» и программного обеспечения bactoSTREP было идентифицировано 43 штамма. Визуальный учет результатов оценивался на основании цветовых переходов проб, образовавшихся в результате биохимических реакций под действием ферментов микроорганизмов. Штаммы, обладающие ферментативной активностью, расщепляли соответствующие субстраты с изменением цвета содержимого лунок планшета, при ее отсутствии — изменения цвета содержимого лунок не происходило. Инструментальный учет производили с помощью комплексной автоматизированной системы, состоящей из фотометра универсального Ф300 и компьютера с программным обеспечением bactoSTREP, разработанным совместно с производственным объединением «Витязь».

В результате установлено, что в опытной серии идентификаций контрольного образца тест-система «ИД-СТРЕП» (испытано 16 изолятов стрептококков и энтерококков) соответствует заявленным требованиям по параметру оценки качества и воспроизводимости тест-систем в идентификации микроорганизмов с расчетом различий по точному критерию Фишера, так как различия недостоверны ( $p > 0,05$ ), а также по параметру диагностической специфичности (92 %) по сравнению с референс-методом, так как процент расхождения результатов не более 10 %.

Параллельная постановка тест-системы «ИД-СТРЕП» и rapid ID32 STREP показала, что полное совпадение результатов с точностью до вида составило 86 %. При анализе результатов процент совпадений с точностью до рода и вида в двух программах — 96 %. Полное несовпадение результатов идентификации в обеих программах пришлось на 4 %.

Разработанную тест-систему «ИД-СТРЕП» выпустили в виде комплектов с дегидрированными субстратами, что позволяет осуществлять постановку опыта сразу же после вскрытия комплекта, а также увеличить срок годности тест-систем до года с момента выпуска, что создает возможности по организации промышленного производства (таблица 1).

Таблица 1 — Компоненты тест-системы «ИД-СТРЕП» для определения видовой принадлежности стрептококков и энтерококков

Компонент	Количество
Планшет с дегидрированными субстратами	1 шт.
Стерильный раствор хлорида натрия с массовой долей 0,9 %, объемом ( $5 \pm 0,1$ ) мл	4 флакона или стандартные ампулы
Наконечники полипропиленовые стерильные для автоматических дозаторов объемом 200 мкл	4 шт.

Визуальный учет тест-системы «АБ-СТРБ» оценивался по помутнению в лунке планшета на основании роста микроорганизма (резистентный штамм) либо его отсутствия под действием различных концентраций антибиотиков (чувствительный штамм к определенному антибиотику). Инструментальный учет производился с помощью многоканального спектрофотометра Ф300 на длине волны 450 нм и компьютера с программным обеспечением «bactoSTREP». Положительным считается результат при оптической плотности  $\geq 0,2$  OD, а отрицательным  $< 0,13$  OD. «Серая зона» располагается



в интервале  $<0,2 - \geq 0,13$  — тест считается спорным и требуется для учета визуальное подтверждение. При отсутствии роста в контрольной лунке тест считается недействительным и его необходимо повторить. Определение массы образованной биопленки проводится программой автоматически. В случае превышения концентрации микробного матрикса для исследуемого изолята  $>4 \pm 1$  мкг/лунку штамм считается способным образовывать биопленку и для определения его чувствительности к антибиотикам необходимо воспользоваться планшетом № 2.

Тест-система «АБ-СТРБ» прошла предварительные внутренние медицинские испытания на оценку соответствия клиничко-аналитическим характеристикам для 12 клинических изолятов, которые показали, что тест-система соответствует заявленным требованиям: по параметру оценки качества и воспроизводимости в серии определений чувствительности контрольного образца к противомикробным препаратам с расчетом различий по точному критерию Фишера, так как различия недостоверны ( $p > 0,05$ ); по параметру диагностической специфичности (93 %) по сравнению с методом бумажных дисков и с тест-системами фирмы bioMerieux ATB STREP 5 и ATB ENTEROC 5 (процент расхождения результатов не более 10 %).

В состав тест-системы «АБ-СТРБ» входят компоненты, представленные в таблице 2, лист с указанием комплектности и инструкция по применению.

Таблица 2 — Компоненты тест-системы «АБ-СТРБ» для определения чувствительности стрептококков, образующих биопленку

Компонент	Количество
Планшет с антибиотиками № 1 с пакетиком силикагеля	1 шт.
Планшет с антибиотиками № 2 с пакетиком силикагеля	1 шт.
Питательная среда для культивирования стрептококков объемом $(4 \pm 0,1)$ мл	8 флаконов
Стерильный раствор хлорида натрия с массовой долей 0,9 %, объемом $(5 \pm 0,1)$ мл	8 флаконов (ампул)
Наконечники стерильные для автоматических дозаторов вместимостью 200 мкл упаковываются в стерильных условиях (ламинарный шкаф 34608 Logic) в пленку полиэтиленовую (ГОСТ 10354-82)	8 шт.

**Заключение.** Впервые на территории Евразийского экономического союза создан автоматизированный комплекс на основе многоканальных фотометров, изготовленных на РУПП «Витязь», включающий в себя фотометр (АИФ-Ф300, Ф300ТП), адаптированный для анализа результатов по цвету пробы в автоматическом режиме и персональный компьютер с программным обеспечением *bactoSTREP*. При помощи разработанных методик идентификации и определения чувствительности к антибиотикам стрептококков и энтерококков получены современные данные об этиологической значимости данных микроорганизмов в структуре возбудителей гнойно-септической инфекции, их резистентности к антибактериальным препаратам, с учетом способности образовывать биопленку. Полученные результаты позволяют на современном научно-методическом уровне в течение короткого периода времени разрабатывать схемы антибиотикотерапии стрептококковых инфекций с учетом способности микроорганизмов образовывать биопленку для многопрофильных стационаров Республики Беларусь.

В рамках ГНТП «Новые методы оказания медицинской помощи» (2016–2020 гг.) по заданию «Разработать тест-системы для идентификации и определения чувствительности к антибиотикам возбудителей стрептококковой инфекции с учетом способности формировать биопленку» было осуществлено финансирование, а также внедрение разработанных тест-систем «ИД-СТРЕП» и «АБ-СТРБ» в производство.

Получены регистрационные удостоверения Тест-система «ИД-СТРЕП» для идентификации стрептококков (рег. № Мн-7.1198642-2004) и Тест-система «АБ-СТРБ» для определения чувствительности к антибиотикам возбудителей стрептококковой инфекции с учетом способности формировать биопленку (рег. № Мн-7.113945/7.004-2004), выданные МЗ Республики Беларусь от 19.12.2019 г.

### Литература

1. Ермакова, Т. С. Видовая структура и антибиотикорезистентность возбудителей гнойно-септических инфекций / Т. С. Ермакова, В. А. Горбунов, Л. П. Титов // Здравоохранение. — 2011. — № 10. — С. 16–25.



2. Лямин, А. В. Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективы / А. В. Лямин, Е. А. Боткин, А. В. Жестков // Клин. микробиология и антимикроб. химиотерапия. — 2012. — Т. 14, № 1. — С. 17–22.
3. Окулич, В. К. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. / В. К. Окулич, А. А. Кабанова, Ф. В. Плотников — Витебск: ВГМУ, 2017 — 300 с.
4. Покровский, В. И. Стрептококки и стрептококкозы / В. И. Покровский, Н. И. Брико, Л. А. Ряпис. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 544 с.
5. Романова, Ю. М. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина / Ю. М. Романова, А. Л. Гинцбург // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. — 2011. — № 3. — С. 99–110.
6. Palmer, R. J. Jr. Biofilms 2007: broadened horizons and new emphases / R. J. Jr. Palmer, P. Stoodley // J. Bacteriol. — 2007. — Vol. 189, № 22. — P. 7948–7960.

## **Test systems for identification of Streptococcus with determination of their sensitivity to antibiotics taking into account the ability to form biofilm**

*Pinchuk A. N., Lepteeva T. I., Goncharova A. I., Shilin V. E., Okulich V. K.*

*Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus*

The article proposes to develop on the basis of domestic equipment and implement a comprehensive automated test system for identification and determination of antibiotic sensitivity of streptococcal pathogens, taking into account the ability to form biofilm. With the help of «ID-STREP» and the program «bactoSTREP» 43 strains were identified, which made it possible to determine the enzymatic activity of microorganisms to 22 chromogenic substrates. Taking into account the results showed that when the test system «ID-STREP» and rapid ID32 STREP were run in parallel, the results coincided with an accuracy of 86%, and the percentage of matches with an accuracy of genus and species in the two programs was 96 %. The test system «AB-STRB» includes two stages of research, meets the declared technical requirements for the parameter of diagnostic specificity (93 %) and operational properties.

**Keywords:** streptococci, purulent-septic infections, biofilms, test systems, antibiotics.

*Поступила 11.06.2021*