

**Пинчук А. Н.**

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,  
Беларусь*

**Окулич В. К.**

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,  
Беларусь*

**Шилин В. Е.**

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,  
Беларусь*

**Плотников Ф. В.**

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,  
Беларусь*

**Какойченкова А. К.**

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,  
Беларусь*

**Земко В. Ю.**

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,  
Беларусь*

## **КОМПЛЕКСНАЯ АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СИСТЕМА ИДЕНТИФИКАЦИИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ СТРЕПТОКОККОВ**

Ведущими патогенами гнойно-септических инфекций являются грамположительные кокки — 61,1 %, одна треть которых представлена стрептококками. Среди  $\beta$ -гемолитических стрептококков наиболее значимую роль играет *S. pyogenes* (65,4 % всех выделенных стрептококков) [2].

Стрептококки вызывают такие специфические заболевания, как рожистое воспаление кожи, ревматизм, скарлатину, а также другие гнойно-септические инфекции (фурункулы, абсцессы, флегмоны, панариции, сепсис, остеомиелит). Так, например, при изучении микробного спектра у лиц с гнойно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области было установлено, что одними из наиболее часто выделяемых микроорганизмов были стрептококки (33,2 %) [1], а при ангине в 50–80 % случаев обнаруживался  $\beta$ -гемолитический стрептококк группы А.

Интерес к роли стрептококков в развитии гнойно-воспалительных заболеваний обусловлен рядом причин: в настоящее время кроме *S. pyogenes* патогенами септических инфекций все чаще становятся другие  $\beta$ -гемолитические стрептококки; наблюдается увеличение роста инвазивных стрептококковых инфекций, что связано со снижением иммунитета и наличием предрасполагающих заболеваний у пациентов; отмечается распространение антибиотикорезистентности среди возбудителей стрептококковых инфекций [3].

Формирование микроорганизмами структурированных сообществ — биопленок — является одним из механизмов приобретения антибиотикорезистентности. Таким образом, изучение изменения чувствительности к антибиотикам стрепто-

кокков и энтерококков при формировании ими биопленки представляет собой актуальное направление.

В связи с этим возникает необходимость идентификации и определения чувствительности к антибиотикам стрептококков с учетом способности микроорганизмов формировать биоплёнку с целью рационализации эмпирического выбора антибиотиков для выявления резистентности к новым антибактериальным препаратам для оценки возможности их использования в клинической практике.

**Цель:** разработать комплексную автоматизированную систему идентификации и определения чувствительности к антибиотикам стрептококков с учетом способности микроорганизмов формировать биоплёнку.

**Материалы и методы.** Выбор вида биологического материала осуществлялся с учетом клинического диагноза. Взятие материала производили в первые сутки после поступления пациента в стационар до назначения антибактериальной терапии.

Выделяли чистую культуру микроорганизма согласно инструкции по применению № 075-0210 «Микробиологические методы исследования биологического материала», утвержденной Министерством здравоохранения Республики Беларусь 13.03.2010 г. Для обнаружения стрептококков использовали 5 % кровяной Колумбия-агар. Учет осуществлялся автоматически с помощью АТВ Expression фирмы bioMérieux. Для идентификации использовались стрипы rapid ID32 STREP.

Индикация биопленки производилась спектрофотометрически с помощью окраски раствором кристаллического фиолетового с определением массы микробной биоплёнки [1].

Определение чувствительности к антибиотикам для планктонных форм производилось методом серийных разведений, для микробов в составе матрикса — после формирования его в полистироловом планшете [1].

Для определения массы полученные на спектрофотометре значения оптической плотности ( $E_{оп}$ ) переводили в вес микробной по формуле

$$X = 226,28 * E_{оп} 1,28,$$

где  $X$  — искомая масса биопленки в лунке,  $E_{оп}$  — оптическая плотность лунки.

**Результаты и обсуждение.** Определен список возможных для идентификации стрептококков тест-системой «ИД-СТРЕП» с использованием иммуноферментного анализатора Ф300 и программы bactoSTREP, который включает 38 наиболее клинически значимых микроорганизмов родов: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Gardnerella*, *Lactococcus*, *Aerococcus*.

Для определения видовой принадлежности стрептококков нами разработана тест-система «ИД-СТРЕП», в состав которой было включено 19 тестов для определения ферментативной активности микроорганизмов: D-рибоза, D-маннит, D-лактоза, D-трегалоза, D-раффиноза, D-сахароза, D-арабиноза,  $\alpha$ -циклодекстрин, пуллулан, D-мальтоза, D-мелибиоза, D-мелицитоза, метил- $\beta$ D-глюкопиранозид, D-тагатоза, 4-нитрофенил- $\alpha$ D-галактопиранозид, 2-нафтил- $\beta$ D-галактопиранозид, 4-нитрофенил- $\beta$ D-галактопиранозид-2-СНА, натрия пируват, натрия гиппурат. Для постановки тест-системы «АБ-СТРЕП» по определению чувствительности готовили взвесь микроорганизмов. Для этого бактериологической петлей вносили одну или более колоний, выращенных на 5 % кровяном Колумбия-агаре в течение 18–24

ч при 37 °С, в ампулу с 2 мл стерильного раствора NaCl с массовой долей 0,9 %. Оптическая плотность взвеси в ампуле после внесения микроорганизма должна была соответствовать 0,5 единиц МакФарланда. Приготовленную суспензию переносили в ампулу с питательных АБ средой 200 мкл приготовленной взвеси бактерий и тщательно перемешивали. Вносили в каждую лунку планшета по 135 мкл питательной среды АБ с микроорганизмами. Планшет накрывали крышкой и инкубировали 18–24 ч при  $36 \pm 2$  °С в микроаэрофильных условиях с добавлением 5–10 % CO<sub>2</sub>.

Учёт результатов возможен визуально или инструментально. Изоляты, имеющие ферментативную способность, расщепляют соответствующие субстраты с изменением цвета содержимого лунок планшета. При отсутствии ферментативной способности изменения цвета содержимого лунок не происходит.

Создана тест-система, состоящая из двух иммунологических планшетов с высушенными антибиотиками и включающая два этапа исследований. Первый этап исследования — определение способности микроорганизма формировать биопленку — позволяет определять чувствительность 4 микроорганизмов к 19 антибиотикам. Оценивалась чувствительность стрептококков к следующим антибактериальным препаратам: амикацин, амоксициллин + клавулат, ампициллин + сульбактам, ампициллин, бензилпенициллин, ванкомицин, гентамицин, имипенем, левофлоксацин, линезолид, меропенем, моксифлоксацин, стрептомицин, тетрациклин, тигециклин, фосфомицин, хлорамфеникол, цiproфлоксацин, эритромицин. Для определения чувствительности к антибиотикам у энтерококков использовались: ампициллин, ванкомицин, гентамицин, левофлоксацин, линезолид, меропенем, моксифлоксацин, стрептомицин, тетрациклин, тигециклин, фосфомицин, хлорамфеникол, эритромицин. Второй этап позволяет оценить чувствительность изолята к антибактериальным препаратам (моксифлоксацин, левофлоксацин, цiproфлоксацин, тигециклин, линезолид, фосфомицин) в составе биопленки.

#### **Выводы:**

1. Разработанная тест-система «ИД-СТРЕП», предназначенная для идентификации стрептококков, может использоваться в клинической практике после клинической апробации.

2. Разработанная тест-система «АБ-СТРЕП» позволяет одновременно определить чувствительность стрептококков к полному спектру антибактериальных препаратов, используемых в хирургической клинике, с целью назначения адекватной антибиотикотерапии для лечения гнойно-воспалительных заболеваний с учетом способности микроорганизмов формировать биопленку.

#### **ЛИТЕРАТУРА**

1. 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.
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология : учеб. / под ред. А. А. Воробьева. Москва : Медицинское информационное агентство, 2008. 791 с.
3. Руководство по инфекционным болезням / под ред. В. И. Покровского. Москва : Медицина, 1996. 464 с.