

И.В. Строк, В.С. Пикулова

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ И К ПОЛИВАЛЕНТНОМУ
БАКТЕРИОФАГУ ЛЕЦИТИНАЗОПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ СТАФИЛОКОККОВ,
ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ СТУДЕНТОВ МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА**

Научный руководитель: канд. мед. наук, доц. Т.А. Канашкова

Кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

I.V. Strok, V.S. Pikulova

**SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS AND TO POLYVALENT BACTERIOPHAGE
OF LECITHINASE-POSITIVE STAPHYLOCOCCI, ISOLATED FROM
MEDICAL UNIVERSITY STUDENTS**

Tutor: PhD, associate professor T.A. Kanashkova

Department of Microbiology, Virology, Immunology

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме. В статье рассмотрен вопрос носительства стафилококка в носовой полости студентов медицинского университета, а также эффективность лечения стафилококковой инфекции с помощью антибиотиков и поливалентного бактериофага.

Ключевые слова: лецитиназоположительный стафилококк, антибиотики, поливалентный бактериофаг.

Resume. The article deals with the issue of carriage of staphylococcus in the nasal cavity of medical university students, as well as the effectiveness of the treatment of staphylococcal infection with antibiotics and polyvalent bacteriophage.

Keywords: lecithinase-positive staphylococcus, antibiotics, polyvalent bacteriophage.

Актуальность. Возврат интереса к фаготерапии и фагопрофилактике гнойно-воспалительных заболеваний (ГВЗ) обусловлен широким и неуклонно возрастающим распространением антибиотикорезистентности бактерий, следствием чего является более продолжительная госпитализация, рост медицинских расходов и увеличение смертности пациентов [1]. В случае тяжелых инфекционных заболеваний используются также комбинации из бактериофагов и антибиотиков, увеличивающие эффективность лечения [2]. С целью преодоления узкой специфичности фагов и более полного охвата возбудителей ГВЗ, в настоящее время в основном применяются так называемые «фаговые коктейли» (из нескольких бактериофагов), каковым, в частности, является лекарственный препарат «Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный» производства ФГУП «НПО «Микроген» (Россия, Пермь), содержащий стерильные очищенные фильтраты фаголизатов бактерий *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Proteus (P.vulgaris, P.mirabilis)*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *E.coli* (с активностью по Аппельману не менее 10^{-5} /мл). Препарат рекомендуется для лечения и профилактики гнойно-воспалительных и энтеральных заболеваний, вызываемых стафилококками, стрептококками, протейями, клебсиеллами, синегнойной и кишечной палочками.

Цель: изучить *in vitro* чувствительность к антибиотикам и к поливалентному бактериофагу «Секстафаг®» коагулазоположительных и коагулазоотрицательных стафилококков, выделенных из носовой слизи студентов медицинского университета,

и оценить возможность применения бактериофага для лечения стафилококковых инфекций.

Задачи:

1. Выполнить забор слизи из носовой полости студентов 3 курса медико-профилактического факультета.

2. Выделить культуры стафилококков на ЖСА и провести их идентификацию по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам (активность ферментов лецитиназы и плазмокоагулазы).

3. Определить чувствительность лецитиназа+ стафилококков к антибиотикам и к поливалентному бактериофагу «Секстафаг®».

4. Провести сравнительную оценку антибиотико- и фагочувствительности исследованных изолятов стафилококков и оценить возможность практического использования полученных данных.

Материал и методы. Материал для исследования – носовая слизь.

Слизь забирали стерильным ватным тампоном из нижней носовой раковины и засекали на чашки с ЖСА для выделения стафилококков. Чашки культивировали в термостате при 37°C в течение 2 суток. Затем оценивали характер роста лецитиназа+ колоний (рисунок 1), микроскопировали и пересевали на скошенный МПА для накопления. Через 20-24 часа с выделенными культурами ставили пробу на плазмокоагулазу.

Всего нами было обследовано 66 студентов 3-го курса медико-профилактического факультета без признаков респираторной инфекции. Лецитиназа+ стафилококки выделены от 22 (33,3%). 14 изолятов стафилококков относились к коагулазоположительным (КПС), 8 – к коагулазоотрицательным (КОС). Для изучения антибиотико- и фагочувствительности выделенных изолятов использовали суспензии суточных культур бактерий, выращенных на скошенном мясо-пептонном агаре, стандартизованные по МакФарланд до 10^6 КОЕ/мл. Чувствительность к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом в соответствии с рекомендациями Европейского комитета по тестированию чувствительности микроорганизмов (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST); использовали стандартные бумажные диски с антибиотиками производства Научно-исследовательского центра фармакотерапии (Санкт-Петербург, РФ) и Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (рисунок 2).



Рис. 1 – Рост лецитиназа+стафилококков на ЖСА



Рис. 2 – Диско-диффузионный метод

Чувствительность к бактериофагу определяли двумя методами: «фаговой дорожки» [3] и суспензионным.

Метод «фаговой дорожки»: приготовленные суспензии культур стафилококков вносили в чашки Петри с МПА в объеме 0,1 мл и рассеивали шпателем по всей поверхности среды. Чашки подсушивали в термостате в течение 15-20 минут, затем вносили по 2 капли бактериофага (0,1мл), немного наклонив чашку, чтобы капли стекали к противоположному краю среды.

Суспензионный метод: в пробирки с 4,5 мл МПБ вносили по 0,5 мл бактериофага и добавляли суспензии культур стафилококка в объеме 0,1 мл. Таким образом, соотношение бактерии/фаги на 1 см² плотной среды и на 1 мл МПБ было примерно одинаковым.

Изолят считали чувствительным при отсутствии роста культуры бактерий на плотной питательной среде в зоне нанесения бактериофага (рисунок 3) и при отсутствии помутнения в бульоне (рисунок 4).

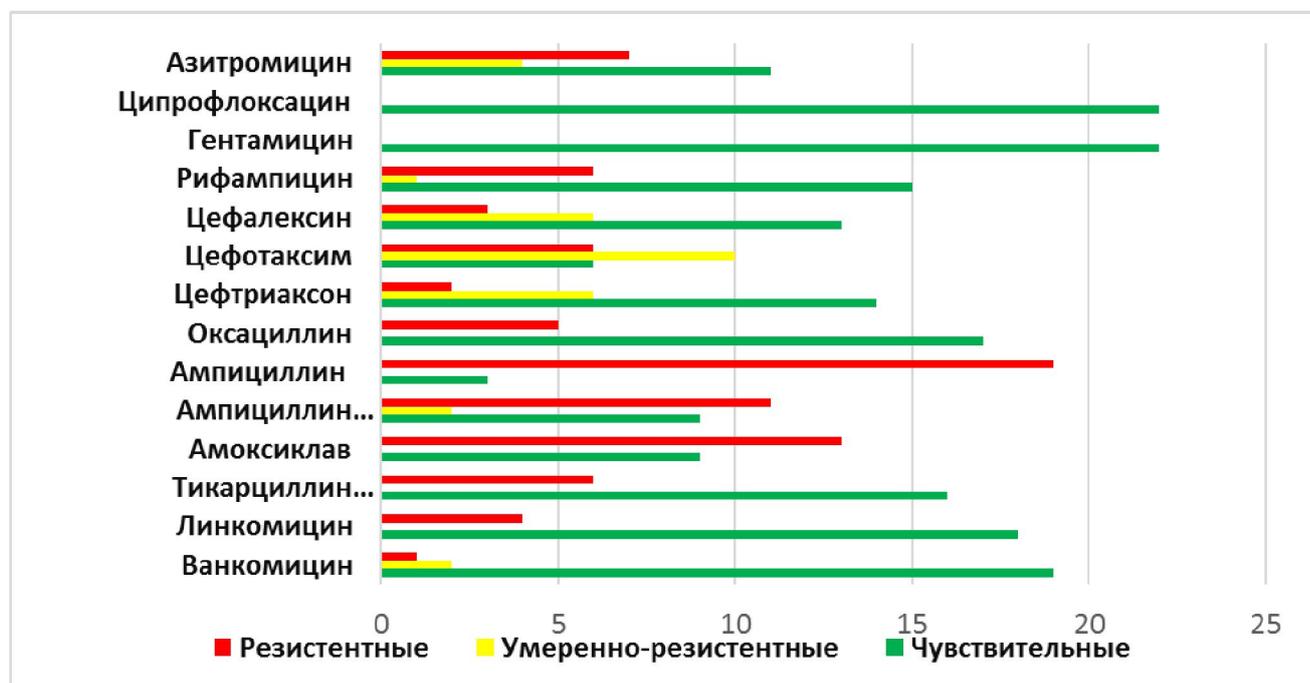


Рис. 3 – Метод «фаговой дорожки»



Рис. 4 – Суспензионный метод

Результаты и их обсуждение. Результаты определения чувствительности стафилококков к антибиотикам представлены на диаграмме 1.



Диагр. 1 – Чувствительность лецитиназа+ стафилококков к антибиотикам

Как видно на диаграмме, все 22 изолята лецитиназа+ стафилококков, выделенных из носовой слизи студентов, были чувствительными только к 2 из 14 исследованных антибиотиков (ципрофлоксацину и гентамицину), 19 изолятов (86,4%) были чувствительными к ванкомицину (1 устойчивый, 2 – умеренно устойчивых). К остальным антибиотикам, за исключением ампициллина, доля чувствительных изолятов колебалась от 27,3% (к цефотаксиму) до 77,3 % (к оксациллину). Высокий уровень устойчивости стафилококков был выявлен к ампициллину (19 из 22 изолятов - 86,4%) и довольно существенный ($\geq 50\%$ устойчивых изолятов) – к ингибиторозащищенным пенициллинам: к ампициллин/сульбактаму (11 из 22) и амоксиклаву (13 из 22).

Кроме того, среди исследованных изолятов стафилококков выявлено 5 множественно устойчивых к антибиотикам (к оксациллину, цефалоспорином, ингибиторозащищенным пенициллинам, азитромицину, рифампицину и линкомицину одновременно). Среди них 3 изолята были КПС (1 также был устойчивым и к ванкомицину) и 2 – КОС. Также необходимо обратить внимание на более высокую долю изолятов с промежуточным (умеренно устойчивым) уровнем чувствительности к цефалоспорином (цефалексину, цефотаксиму и цефтриаксону) по сравнению с другими антибиотиками. Существенных различий в антибиотикочувствительности КПС и КОС выявлено не было.

При исследовании чувствительности к бактериофагу методом «фаговой дорожки» выявлено 6 чувствительных изолятов лецитиназа+ стафилококков (все КПС), в то время как суспензионным методом – 12 (9-КПС и 3 - КОС) (таблица 1).

Табл. 1. Чувствительность лецитиназа+ стафилококков к поливалентному бактериофагу Секстафаг® при использовании суспензионного метода и метода «фаговой дорожки».

Исследованные изоляты стафилококков	n	Метод «фаговой дорожки»		Суспензионный метод	
		S	R	S	R
КПС	14	6	8	9	5
КОС	8	-	8	3	5
Всего:	22	6	16	12	10

При этом все 6 чувствительных изолятов, выявленных методом «фаговой дорожки», были чувствительными к бактериофагу и при использовании суспензионного метода, в т.ч. 1 КПС из множественно устойчивых к антибиотикам.

Активность бактериофага в отношении 4 чувствительных изолятов КПС, выявленных обоими методами, сохранялась и при снижении титра фага по Аппельману (суспензионный метод) до 10^{-7} , в отношении 2 – до 10^{-8} (таблица 2).

Табл. 2. Чувствительность лецитиназа+ стафилококков к поливалентному бактериофагу Секстафаг® при снижении титра фага.

Изоляты стафилококка	Титр фага по Аппельману:			
	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}
№ 13	S	S	S	R
№ 15	S	S	S	R
№ 16	S	S	R	R
№ 17	S	S	S	R
№ 19	S	S	R	R
№ 22	S	R	R	R

Таким образом, исходя из результатов проведенной работы, можно сделать вывод об актуальности и значимости применения лекарственного препарата «Секстафаг® Пиобактериофаг поливалентный» в клинической практике.

Выводы:

1. Лецитиназоположительные стафилококки обнаружены в 31,8 % исследованных образцов носовой слизи студентов 3 курса медицинского университета.

2. Большинство выделенных стафилококков были чувствительными только к ципрофлоксацину (100% изолятов), гентамицину (100%) и ванкомицину (86,4%); в 22,7 % (5 из 22 изолятов) выявлена множественная антибиотикорезистентность (к оксациллину, цефалоспорином, ингибиторозащищенным пенициллинам, азитромицину, рифампицину и линкомицину одновременно). Существенных различий в антибиотикочувствительности КПС и КОС не выявлено.

3. Поливалентный бактериофаг «Секстафаг®» проявлял активность в отношении 27,3% лецитиназа+ стафилококков (6 изолятов из 22, в т.ч. 1 множественно устойчивого к антибиотикам) при исследовании методом «фаговой дорожки» и 54,5% (12 изолятов) – при исследовании суспензионным методом. При этом чувствительность к фагу КПС была существенно выше, чем КОС, и сохранялась при снижении титра фага по Аппельману до 10^{-8} .

4. Таким образом, применение поливалентного бактериофага «Секстафаг®» в клинической практике для лечения ГВЗ стафилококковой природы вполне оправдано, однако важным условием эффективной фаготерапии является предварительное определение фагочувствительности выделенных возбудителей.

Литература

1. Борисов, П. Г. Фагопрофилактика и фаготерапия хирургических инфекций / П. Г. Борисов [и др.] // Мед. вестник МВД. 2017, № 2. С. 9-13.
2. Ильина, Т. С. Взгляд на фаготерапию через 100 лет после открытия бактериофагов / Т. С. Ильина, Э. Р. Толордава, Ю. М. Романова // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2019, № 3. С. 103-112.
3. Габрилович, И. М. Практическое пособие по бактериофагии / И. М. Габрилович. Мн. Высшая школа, 1968. 178 с.