

Т. М. Шевченко, О. С. Воронкова, А. І. Вінніков

Характеристика чутливості до антибіотиків та фагів штамів стафілококів, що виділені з репродуктивного тракту мишей

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара

Ключові слова: стафілококи, антибіотикочутливість, фагочутливість.

Дослідження біологічних властивостей штамів стафілококів, зокрема і спектра їх чутливості до антибіотиків, має велике значення для призначення ефективної терапії. З метою дослідження чутливості до антибіотиків і фагів штамів стафілококів, які здатні та нездатні до утворення біоплівки, використали штами стафілококів, що виділені з піхви мишей зі штучно створеним дисбактеріозом. Для ідентифікації бактерій використовували тест-систему Api-Staph, щоб визначити стійкість до антибіотиків застосували диско-дифузійний метод, чутливість до фагів – крапельний метод на твердому середовищі. Виявили серед штамів представників видів *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. lentus* та *S. carnosus*. Найбільш часто виділяли *S. aureus* (61,3%). Чутливість останнього до метіциліну, гентаміцину, офлоксацину, амікацину та цефтриаксону перевищувала 73% штамів. До пеніциліну чутливі 63,2% штамів. Зі штамів *S. aureus* до препаратів фагів до піобактеріофагу полівалентного чутливі 94,7%, бактеріофагу стафілококового рідкого – 100% та інтестифагу – 63,2%. Здатністю до плівкоутворення володіли 57,9% штамів *S. aureus*.

Характеристика чувствительности к антибиотикам и фагам штаммов стафилококков, выделенных из репродуктивного тракта мышей

Т. М. Шевченко, О. С. Воронкова, А. И. Винников

Изучение биологических свойств штаммов стафилококков, в том числе и спектра их чувствительности к антибиотикам, имеет большое значение для назначения эффективной терапии. С целью исследования чувствительности к антибиотикам и фагам штаммов стафилококков, способных и неспособных к образованию биопленки, использовали штаммы стафилококков, выделенных из влагалища мышей с искусственно созданным дисбактериозом. Для идентификации штаммов использовали тест-систему Api-Staph, для определения устойчивости к антибиотикам – диск-диффузионный метод, для определения чувствительности к фагам – капельный метод на плотной среде. Среди штаммов выделены представители видов *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. lentus* и *S. carnosus*. Чаще всего выделяли *S. aureus* (61,3%). Чувствительность последнего к метициллину, гентамицину, офлоксацину, амикацину и цефтриаксону превышала 73% штаммов. К пенициллину чувствительными были 63,2% штаммов. Из штаммов *S. aureus* к препаратам фагов к пиобактериофагу поливалентному чувствительны 94,7%, бактериофагу стафилококковому жидкому – 100% и интестифагу – 63,2%. Пленкообразующими были 57,9% штаммов *S. aureus*.

Ключевые слова: стафилококки, фагочувствительность.**Патология.** – 2014. – №3 (32). – С. 68–72

Characteristic of sensitivity to antibiotics and phages of staphylococci strains, isolated from mice reproductive tract

T. N. Shevchenko, O. S. Voronkova, A. I. Vinnikov

Aim. To study the characteristic of sensitivity to antibiotics and phages of staphylococci strains, isolated from mice reproductive tract. Methods and results. Isolated from the mice vagina staphylococci strains were identified as species *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. lentus* and *S. carnosus*. *Staphylococcus aureus* was mostly isolated; the frequency of its detection was 61.3%. Its sensitivity to antibiotics was high: more than 73% of strains were sensitive to methicillin, gentamicin, ofloxacin, amikacin and ceftriaxone. 63.2% of strains were susceptible to penicillin.

Conclusion. Sensitivity to phage drugs: 94.7% of *S. aureus* strains were sensitive to polyvalent pyobacteriophage, 100% – to staphylococcal liquid bacteriophage, and 63.2% – to intestiphage. 57.9% of *S. aureus* strains had the film formation ability.

Key words: *Staphylococcus*, Antibiotic Resistance, *Streptococcus Phages*.**Pathologia.** 2014; №3 (32): 68–72

Відомо, що патологічні зміни у стані мікробіоценозу найбільш часто визначаються як збільшення кількості умовно-патогенних мікроорганізмів; заселення ними певних біотопів є патологічним проявом, що призводить у свою чергу до зниження кількості лактобактерій та інших представників індигенної мікрофлори піхви та навіть до повного їх зникнення [5]. Такі зміни визначаються як дисбактеріози, їх виникнення пов'язане із низкою негативних наслідків. Так, дисбіотичні явища, як правило, посилюють паралельні патологічні процеси у організмі, знижують ефективність природних захисних механізмів, створюють загрозу розвитку запальних

захворювань [1]. Умовно-патогенні мікроорганізми є компонентами нормальної мікрофлори людини, зокрема і репродуктивного тракту. Водночас їх перебування у складі мікрофлори стає загрозливим лише при досягненні певного кількісного порогу або при набутті виражених патогенетичних властивостей на тлі зниження імунного статусу. Встановлено, що дисбіоз репродуктивного тракту може мати місце поряд з інфекціями бактеріальної та вірусної етіології. Серед бактерій при розвитку уражень репродуктивного тракту значну роль відіграють стафілококи, з яких найбільше значення мають *S. aureus* та *S. epidermidis* [2,5].

Боротьба зі стафілококовими хворобами ускладнена активним проявом у стафілококів факторів персистенції та поширенням детермінант стійкості до антибіотиків, що ускладнює лікування. Одним із таких факторів ускладнення є здатність до утворення біоплівки штамми бактеріальних збудників, що передусім стосується і стафілококів [10]. Пошук альтернативних антибіотикам і безпечних засобів лікування дасть змогу збільшити ефективність терапевтичних схем, що застосовуються. У цьому сенсі перспективним є застосування препаратів бактеріофагів. Ці віруси здатні специфічно лізувати чутливі до них бактерії, не завдаючи шкоди іншим мікроорганізмам, які представляють нормальну мікрофлору [7]. Чутливість до фагів також є важливою ознакою штамів. Цікавість до препаратів бактеріофагів також аргументується ефективністю їхнього впливу на біоплівкову організацію бактерій. Якщо антибіотики здатні знищувати біоплівку в концентраціях, що значно перевищують МПК для планктонних культур, і можуть бути небезпечними для людини, то вплив фагів проявляється навіть при застосуванні звичайних терапевтичних доз і, крім того, навіть підвищення їх кількості у кілька разів не шкодить людині [9].

Сьогодні існує багато препаратів бактеріофагів, що містять і стафілококові фаги: стафілофаг, піобактеріофаг, інтестіфаг тощо. Показано, що їх застосування є безпечним для людини і ефективним. Однак ефект проявляється тільки за умови відповідності наявних у препараті вірусів штамам бактерій, які потрібно видалити. Тому перед початком лікування обов'язково необхідно перевірити виділений від хворої людини штам на чутливість до бактеріофагів [6].

Можливим напрямом для дослідження ефективності експериментальних схем лікування стафілококових уражень можуть бути моделі інфекційної патології на лабораторних тваринах, для цього можна використовувати мишей.

Мета роботи

Дослідити чутливість до антибіотиків та фагів штамів стафілококів, що виділені від мишей, здатних та нездатних до утворення біоплівки.

Матеріали і методи дослідження

Для досліджень використовували штамми стафілококів, що виділені з піхви мишей зі штучно створеним дисбактеріозом. Дисбактеріоз піхви отримували відповідно до моделі, котра описана у наших попередніх роботах [2]. Наявність дисбактеріозу констатували за ознаками зниження відношення аероби : анаероби, зниження кількості лактобацил та зростання кількості умовно-патогенних бактерій. Матеріал від мишей відбирали з піхви стерильним уніфікованим ватним тампоном. Бактеріологічні дослідження здійснили на базі лабораторії мікробіології НДІ гастроентерології НАМН України (м. Дніпропетровськ).

Для дослідження відбирали штамми мікроорганізмів, що належать до роду *Staphylococcus*. Отримали чисту культуру шляхом висіву матеріалу на сольовий агар

(вміст натрію хлориду 10%). Матеріал зі зрослих колоній мікроскопіювали. При виявленні грам-позитивних коків здійснювали їх ідентифікацію до виду з використанням тест-системи API Staph (bioMérieux, Франція).

Здатність до плівкоутворення визначали з використанням методу культивування на пластикових планшетах [3]. Використовували такі кількісні відношення мікроорганізмів та середовища: завись добової культури штаму (50 мкл із вмістом клітин 1×10^5 КУО/мл) вносили у лунку з м'ясо-пептонним бульйоном (100 мкл). Культивували у вологій камері протягом 72 год, за необхідності додаючи середовище. Здатність до плівкоутворення визначали при видаленні решток середовища: завислу на стінках плівку вважали позитивною відповіддю.

Дослідження чутливості до антибіотиків здійснили диск-дифузійним методом відповідно до методики з наказу МОЗ України № 167 від 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» [4]. Вивчали чутливість до пеніциліну, метіциліну, гентаміцину, офлоксацину, амікацину та цефтриаксону.

Для визначення чутливості до бактеріофагів використовували лікувальні препарати Піобактеріофаг полівалентний (Секстафаг), Інтестіфаг і Бактеріофаг стафілококовий рідкий (Мікроген, РФ).

Для дослідження чутливості до фагів використовували 3–6-годинні бульйонні культури, які висівали «газоном». Чашку поділяли на три сектори і на підсушену поверхню посіву (30–40 хв у термостаті) по секторах наносили краплями фагові препарати. Інкубували за температури 37°C 18–24 год. Повна відсутність росту культури в місці потрапляння краплі фільтрату (активний бактеріофаг) або поява в цій ділянці дрібних стерильних п'ятен-колоній бактеріофага (бактеріофаг слабкої активності) свідчили про чутливість до фагів [6].

Результати та їх обговорення

Як показано у попередніх дослідженнях зі створення експериментального дисбактеріозу піхви мишей [2], стафілококи є одними з найбільш ефективно зростаючих кількісно груп мікроорганізмів, які завдяки значній кількості факторів патогенності становлять конкуренцію представникам нормальної мікрофлори. Перебування мікроорганізмів у стані біоплівки посилює їхній патогенний потенціал унаслідок більшої виживаності при впливі факторів довкілля. Насамперед це має значення для терапії інфекцій, що здійснюється антибіотиками. Водночас сьогодні з'являється все більше матеріалів про набуття мікроорганізмами резистентності до антибіотиків, тому виникає потреба пошуку додаткових можливостей терапії таких інфекцій. Дослідили видовий склад і властивості 31 штаму стафілококів, котрі виділені з піхви мишей.

Встановили видову належність 31 штаму бактерій (рис. 1), що виділені від мишей із дисбактеріозом піхви (n=8).

За результатами фізіолого-біохімічних ідентифікаційних тестів визначили такий видовий склад стафілококів: 19 (61,3%) штамів належали до виду *S. aureus*, 5 (16,1%)

– до *S. saprophyticus*, 6 (19,3%) – до *S. lentus* і 1 (3,3%) – до *S. carnosus*. Отже, очевидним є переважання *S. aureus*. Коагулазонегативні стафілококи були у меншості.

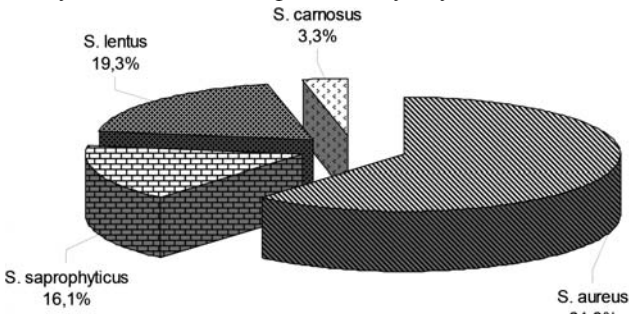


Рис. 1. Види стафілококів, що виділені від мишей із дисбактеріозом піхви.

Дослідження здатності до плівкоутворення дало можливість визначити, що серед штамів плівкоутворювальними були *S. aureus* – 11 (57,9%) штамів та *S. lentus* – 1 (16,7%) штам. Інші штами плівкоутворення не давали. Тобто 38,7% штамів стафілококів, котрі виділили, були здатними до утворення біоплівки.

Вважається [10], що значна кількість клінічних випадків виявлення стафілококів, особливо при тяжких та затяжних ураженнях, збігається зі здатністю цих мікроорганізмів до утворення біоплівки. Особливо це стосується інфекційних уражень ранових поверхонь, коли частка плівкоутворювальних штамів стафілококів може становити 50–65%. Менше така здатність до плівкоутворення притаманна штамам, що виділені при ринітах, із зубної бляшки, медичного обладнання.

Видавалось необхідним вивчити чутливість виділених штамів до антибіотиків, що є важливим у зв'язку із посиленням рівня стійкості до антибіотиків серед бактерій, особливо серед тих, що здатні до утворення біоплівки [7]. Так, лише доза у 100–1000 разів більша за звичайну лікувальну може виявитись ефективною проти

біоплівки. Але такі кількості антибіотика можуть завдати токсичного впливу на макроорганізм, що зумовлює потребу пошуку іншого підходу до терапії інфекцій, які викликані плівкоутворювальними штамми. У цьому сенсі вірогідною альтернативою можуть стати бактеріофаги [9], які характеризуються специфічністю дії проти бактерій і вважаються безпечними для людини та її сапрофітної мікрофлори [6].

Вивчили чутливість до антибіотиків (пеніциліну, метіциліну, гентаміцину, офлоксацину, амікацину та цефтриаксону), які призначають найчастіше.

Показано (рис. 2), що частота виявлення стійкості до антибіотиків серед виділених штамів – доволі низька.

Встановили, що знижена чутливість мала місце лише до пеніциліну (63,2% чутливих штамів). Також показано дещо менші показники частоти виявлення чутливих штамів до гентаміцину (близько 73–83%) та амікацину (близько 80–90%).

Якщо порівнювати отримані нами на тваринних штаммах дані з результатами вивчення антибіотикорезистентності штамів, які виділені від людини, то можна відзначити низку тенденцій, що збігаються. У наших дослідженнях до цього антибіотика також визначили найнижчий показник чутливості. Для гентаміцину показано, що чутливі 73,8% штамів золотистого стафілокока, а у матеріалах порівняння наводяться дані про 72% чутливих штамів. Для фторхінолонів чутливих штамів 94% та більше при наведених даних 86%.

Серед штамів, що виділені від мишей із дисбактеріозом піхви і стійкі до дії антибіотиків, переважно були представники коагулазонегативних стафілококів (пеніцилін, цефтриаксон, амікацин). За даними літератури [9], саме коагулазонегативні стафілококи є більш резистентними до антибіотиків, і серед них явище мультирезистентності є більш відомим. Хоча у наших дослідженнях показали, що серед виділених від мишей

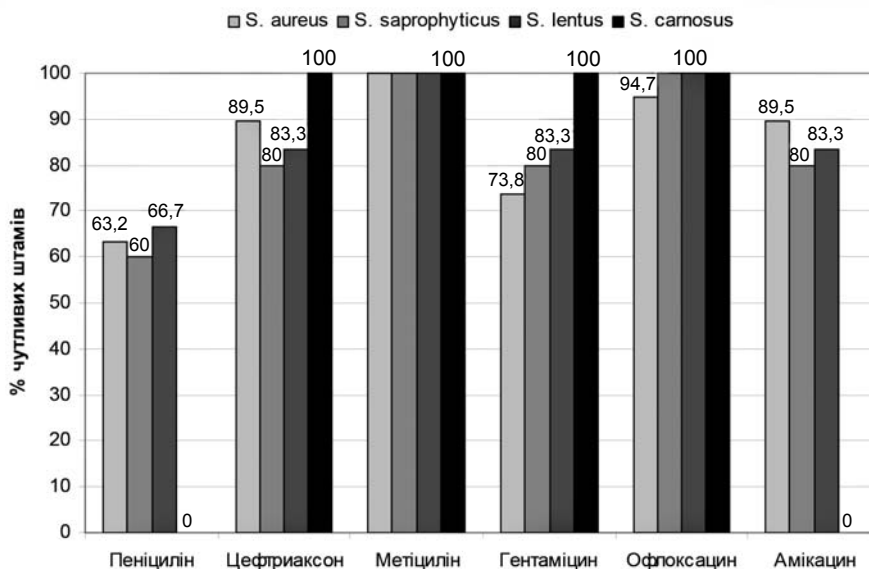


Рис. 2. Чутливість до антибіотиків штамів стафілококів, що виділені від мишей із дисбактеріозом піхви.

штамів коагулазонегативні стафілококи були більш стійкими до антибіотиків, натомість множиннорезистентних форм не виявили.

Поряд з антибіотиками, стійкість до яких у бактерій постійно зростає, слід застосовувати й інші препарати, серед них можна відмітити лікувальні препарати фагів. Для дослідження штамів щодо чутливості до бактеріофагів використовували три лікувальних препарати бактеріофагів – Піобактеріофаг полівалентний (секстафаг), Бактеріофаг стафілококовий рідкий та Інтестіфаг.

Серед штамів, що виділені з пихви мишей із дисбактеріозом, чутливість до бактеріофагів виявлено лише для золотистого та сапрофітного стафілококів. Показали, що більшість штамів золотистих стафілококів, котрі виділені від мишей, були чутливими до всіх препаратів фагів, які досліджували: Піобактеріофагу полівалентного – 94,7%, Бактеріофагу стафілококового рідкого – 100% та Інтестіфагу – 63,2%. Серед штамів сапрофітного стафілокока чутливими були тільки два. З них один (20%) виявився чутливим до всіх препаратів, а інший (20%) був чутливим лише до фагів із препарату Інтестіфаг. В обох випадках спостерігали слабку реакцію: виявлені поодинокі прозорі плями на місці лізованих колоній. Жоден зі штамів, що належали до видів, *S. lentus* та *S. carnosus*, не давав позитивної реакції з фагами із препаратів, що застосували.

Порівнюючи результати, які отримали для виділених штамів стафілококів, можемо відзначити: найбільше чутливих штамів було серед золотистих стафілококів, тоді як для коагулазонегативних стафілококів чутливості майже не виявили, що узгоджується з даними про наявність у цих бактерій різних рецепторів і чутливості до різних фагів [8]. З лікувальною метою застосовують переважно фаги проти золотистого стафілокока, який, власне, у більшості випадків є збудником уражень. Зважаючи на зростання ролі коагулазонегативних ста-

філококів у структурі патології людини та підвищену стійкість до антибіотиків серед них, слід розширяти спектр фагів, що входять до лікувальних препаратів.

Висновки

1. Видовий склад стафілококів, що виділені від мишей, включає *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. lentus* та *S. carnosus*. Найбільша частота виявлення визначена для *S. aureus* – 61,3%. Здатність до плівкоутворення мали 38,7% від усіх виділених штамів стафілококів.

2. Дослідження чутливості виділених штамів стафілококів до антибіотиків дало змогу виявити високу чутливість (більше ніж 73%) для всіх антибіотиків, що застосовували, за винятком пеніциліну (стійкі більше ніж 33% штамів).

3. Для всіх штамів золотистого стафілокока, котрі досліджували, була характерна висока чутливість до вивчених лікувальних препаратів фагів: Піобактеріофагу полівалентного – 94,7%, Бактеріофагу стафілококового рідкого – 100% та Інтестіфагу – 63,2%.

Перспективи подальших досліджень. Дослідження чутливості до антибіотиків, яке здійснюється в багатьох клінічних лабораторіях, є необхідним етапом вивчення збудників уражень, що виділені від людини, бо дає можливість призначити найбільш ефективний препарат для лікування. Водночас при застосуванні антибіотиків трапляються випадки невдачі терапії, певна частка з яких може бути зумовлена здатністю мікроорганізмів до плівкоутворення. В останньому випадку бактерії набувають підвищеного рівня стійкості до антибіотиків, виникає потреба пошуку нових засобів лікування. Отже, до схем дослідження властивостей виділених штамів слід включити вивчення чутливості до бактеріофагів, на користь цього свідчать дані про високий рівень чутливості ізолятів до лікувальних препаратів на їхній основі.

Список літератури

1. Белобородов В.Б. Стафилококковые инфекции / В.Б. Белобородов, С.Д. Митрохин // Инфекции и антимикробная терапия. – 2003. – №5. – С. 12–18.
2. Воронкова О.С. Модель экспериментального вагинального дисбиоза на белых лабораторных мышах / О.С. Воронкова, Е.А. Сирокваша, А.И. Винников // Микробиологічний журнал. – 2008. – №6. – С. 47–58.
3. Разрушение биопленок коагулазонегативных стафилококков катионным пептидом варнерином / В.П. Коробов, Л.М. Лемкина, Л.Б. Филатова, Т.В. Полюдова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т.3. – №5. – С. 156–159.
4. Наказ МОЗ України «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» від 05.04.2007 р. № 167. – К.: МОЗ України, 2007. – 63 с.
5. Сидорова И.С. Микробиоценоз половых путей женщин репродуктивного возраста / И.С. Сидорова, А.А. Воробьев, Е.И. Боровкова // Акушерство и гинекология. – 2005. – №2. – С. 7–9.
6. Справочник по применению бактериальных и вирусных препаратов / под ред. С.Г. Дзагурова, Ф.Ф. Резепова. – М.: Медицина, 1995. – 116 с.
7. Bacteriophage therapy for Staphylococcus aureus biofilm-infected wounds: a new approach to chronic wound care / A.K. Seth, M.R. Geringer, K.T. Nguyen et al. // Plast Reconstr Surg. – 2013. – Vol. 131(2). – P. 225–234.
8. Matsuzaki S. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases / S. Matsuzaki, M. Rashel, J. Uchiyama et al. // J. Infect. Chemother. – 2005. – №11. – P. 211–219.
9. Potera C. Phage renaissance: new hope against antibiotic resistance / C. Potera // Environ Health Perspect. – 2013. – Vol. 121(2). – P. a48–a53.
10. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation and roles in human disease / N.K. Archer, M.J. Mazaitis, W. Costerton et al. // Virulence. – 2011. – Vol. 2(5). – P. 445–459.

References

1. Beloborodov, V. B., & Mitrokhin, S. D. (2003). Stafylokokkovye infekcii [Staphylococcal infection]. *Infekcii i antimikrobnaya terapiya*, 5, 12–18. [in Russian].
2. Voronkova, O. S., Sirokvasha, E. A., & Vinnikov, A. I. (2008). Model' eksperimental'nogo vaginal'nogo disbioza na belykh laboratornykh myshakh [Experimental vaginal dysbiosis on the model of white laboratory mice]. *Mikrobiologichnyi zhurnal*, 70(6), 47–58. [in Ukrainian].

3. Korobov, V. P., Lemkina, L. M., Filatova, L. B., & Poludova, T. V. (2011) Razrushenie bioplenok koagulazonegativnykh stafilocokkov kationnym peptidom varnerinom [Destruction of coagulase-negative staphylococcal biofilms by cationic peptide Warnerin]. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*, 3(5), 156–159. [in Russian].
4. Nakaz Ministerstva okhorony zdorovia Ukrainy Pro zatverdzhennia metodychnykh vkazivok «Vyznachennia chutlivosti mikroorganizmiv do antybakterialnykh preparativ» vid 5 kvitnia 2007 roku № 167 [Order of the Ministry of Health of Ukraine «On Approval of guidance Determination of the sensitivity of microorganisms to antibiotics» from April 5 2007, № 167]. Kyiv. [in Ukrainian].
5. Sidorova, I. S., Vorob`yov, A. A., & Borovkova, E. I. (2005). Mikrobiocenozy polovykh putei zhenshin reproduktivnogo vozrasta [Microbiocenosis of genital tract of reproductive age women]. *Akusherstvo i ginekologiya*, 2, 7–9. [in Russian].
6. Dzagurov, S. H., Rezepov, F. F. (Eds.). (1995). *Spravochnik po primneniyu bakterijnykh i virusnykh preparatov [Handbook of bacterial and viral preparations application]*. Moscow: Medicine. [in Russian].
7. Seth, A. K., Geringer, M. R., Nguyen, K. T., Agnew, S. P., Dumanian, Z., Galiano, R. D., et al. (2013). Bacteriophage therapy for staphylococcus aureus biofilm-infected wounds: A new approach to chronic wound care. *Plastic and reconstructive surgery*, 131(2), 225–234. doi: 10.1097/PRS.0b013e31827e47cd.
8. Matsuzaki, S., Rashel, M., Uchiyama, J., Sakurai, S., Ujihara, T., Kuroda, M., et al. (2005). Bacteriophage therapy: A revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J. Infect. Chemother.*, 11, 211–219. doi: 10.1007/s10156-005-0408-9.
9. Potera, C. (2013). Phage renaissance: new hope against antibiotic resistance. *Environ Health Perspect*, 121(2), a48-a53.
10. Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, W., Leid, J. G., Powers, M. E., & Shirtliff, M. E. (2011). Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation and roles in human disease. *Virulence*, 2(5), 445-459. doi: 10.4161/viru.2.5.17724.

Відомості про авторів:

Шевченко Т.М., д. біол. н., доцент, зав. каф. клінічної лабораторної діагностики факультету біології, екології та медицини, Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара.

Воронкова О.С., к. біол. н., доцент каф. мікробіології, вірусології та біотехнології факультету біології, екології та медицини, Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара, E-mail: voronkova_olga@inbox.ru.

Вінніков А.І., д. біол. н., професор, зав. каф. мікробіології, вірусології та біотехнології факультету біології, екології та медицини, Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара.

Надійшла в редакцію 30.10. 2014 р.