

**ЧУТЛИВІСТЬ ДО ФАГІВ ЛІКУВАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ ШТАМІВ
СТАФІЛОКОКІВ, ВИДІЛЕНИХ ПРИ ДИСБІОЗІ ШКТ**

Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара (м. Дніпро)

voronkova_olga@i.ua

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дослідження виконані у рамках реалізації завдань держбюджетної теми № 1-294-15 «Структурно-функціональні властивості природних мікробіоценозів та механізми біологічної дії мікробних препаратів».

Вступ. Нормальна мікрофлора є необхідним компонентом макроорганізма, який забезпечує його ефективне функціонування [4,8]. Мікрофлора не є стабільним угрупованням, однак має здатність до підтримання динамічної рівноваги з переважанням певних груп сапрофітних мікроорганізмів порівняно зі здійсненням явища колонізаційної резистентності для запобігання проникненню на біотоп патогенних та умовно-патогенних видів [1,2].

Значний комплекс зовнішніх факторів може негативно впливати на динамічну рівновагу між макроорганізмом та його мікробіоценозом. Зміни у складі мікробних екосистем порожнин тіла людини з відхиленням від норми називають дисбактеріозом. Найпоширенішим є дисбактеріоз кишечника [2,8].

Бактеріофаги сьогодні розглядаються як безпечно та ефективно доповнення до заходів корекції складу мікрофлори, адже висока специфічність фагів щодо конкретних мікроорганізмів дозволяє вирішити проблему з негативним впливом ряду препаратів, зокрема антибіотиків, на сапрофітні бактерії [3,10,11].

Метою роботи було дослідити чутливість виділених при дисбіозі ШКТ ізолятів стафілококів до лікувальних препаратів бактеріофагів.

Об'єкт і методи досліджень. Об'єктом дослідження була чутливість до лікувальних фагових препаратів ізолятів стафілококів, що виділені при дисбактеріозі шлунково-кишкового тракту (ШКТ) дорослих. Для виділених ізолятів проводили ідентифікацію до виду, вивчали їх чутливість до антибіотиків та бактеріофагів з комерційних лікувальних препаратів.

Досліджували зразки випорожнень від осіб із ознаками дисбактеріозу (n=52).

Дослідження матеріалу з підозрою на стафілокок проводили за схемою, що наведена у Наказі МОЗ № 535 [7]. Вивчали ріст грампозитивних коків на середовищі Чистовича, ферментацію глюкози в анаеробних умовах з утворенням кислоти. Для встановлення видової належності виявлених стафілококів проводили тести: *S. aureus* – на виявлення плазмокоагулази, ферментацію маніту в анаеробних умовах з утворенням кислоти; *S. epidermidis* та

S. saprophyticus – визначення стійкості до новобіоцину, наявність фосфатази, здатність окислювати маніт. Ізоляти чутливі до новобіоцину, що мали фосфатазу і здатні окислювати маніт, відносили до виду *S. epidermidis*, а такі, що мали протилежні ознаки – до виду *S. saprophyticus*.

Чутливість виділених від пацієнтів ізолятів встановлювали у лабораторії за допомогою диск-дифузійного методу. Використовували тільки чисті культури виділених штамів. Вибір антибіотиків ґрунтувався на матеріалах наказу МОЗ України № 167 від 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» [6]. З добової культури отримували суспензію із вмістом клітин 1×10^6 клітин/мл. На стерильну чашку з МПА наносили 0,1 мл отриманої суспензії. Шпателем розтирали краплю по поверхні для рівномірного розподілення матеріалу. Стерильним пінцетом брали диски з антибіотиками та розкладали по поверхні поживного середовища. У дослідженні використовували диски з цефтріаксоном, цефепімом, гатіфлоксаціном, амоксицилін/клавуланатом, азитроміцином, гентаміцином. Облік результатів проводили через 18 годин після розкладання дисків. Встановлення резистентності штаму проводили на основі вимірювання зони відсутності росту навколо диску. Чутливість штамів встановлюють відповідно до таблиці зон затримання росту для стандартних дисків з антибіотиками.

Для визначення фагочутливості готували суспензію клітин стафілокока добової агарової культури, яка містила 1×10^5 мікробних клітин у 1 мл. Отриману суспензію у об'ємі 0,5 мл наносили на поверхню добре підсушеного МПА і розтирали шпателем. Підсушували за кімнатної температури протягом 20-30 хвилин. На отриманий газон із нанесеною культурою шприцем по одній краплі (близько 0,05 мл) наносили зразки препаратів фагів. Чашку ділили на 3 сектори. На кожен з секторів наносили окремий фаг. Після підсихання крапель фагів чашки інкубували у термостаті при 37°C протягом 18-24 годин. Наявність зони лізиса (за чотириплюсовою системою) свідчила про ступінь чутливості вивчаємого ізолята до лікувально-профілактичного фага [3,10].

Результати досліджень та їх обговорення. З досліджених 52 зразків біологічного матеріалу від осіб з підозрою на дисбактеріоз наявність грампозитивних коків підтверджено у 88,4% випадків (46 зразків). Домінуючою групою мікроорганізмів стафілококи виявилися у 53,8% випадків (28 зразків),

коли вони виділялися у найбільшій кількості порівняно із іншими мікроорганізмами.

Видовий спектр стафілококів, що виділені при дисбіозі ШКТ, представлено на **рисунку 1**.

Отже, виділені ізоляти належали до одного з трьох видів: переважна більшість – до виду *S. aureus* (78,6%), значно менше – до видів *S. epidermidis* (7,1%) та *S. saprophyticus* (14,3%).

Сапрофітний та епідермальний стафілококи виявляли у випадках, коли кількість цієї групи бактерій не перевищувала лабораторної норми, натомість в усіх випадках, коли стафілококи було визнано домінуючою групою, виділяли тільки ізоляти золотистого стафілокока.

Нами було поставлено антибіотикограми для всіх 28 ідентифікованих ізолятів стафілококів. Тестували чутливість до цефтріаксону, цефепіму, гатіфлоксацину, амоксицилін/клавуланату, азитроміцину та гентаміцину ізолятів ідентифікованих як стафілококи (**рис. 2**).

У результаті вивчення чутливості до антибіотиків встановлено, що жоден з ідентифікованих як *S. aureus* штамів не був полірезистентним. Для всіх штамів *S. aureus* показано, що більше 72,7% з них були чутливими до всіх досліджених препаратів, що є доброю прогностичною ознакою для лікування пацієнтів. Найменш ефективними з препаратів виявилися гентаміцин, цефепім та цефтріаксон, до яких чутливими були по 72,7% ізолятів. З усіх препаратів найбільш ефективним був гатіфлоксацин, до якого чутливими були понад 95,5% ізолятів.

Вивчення чутливості штамів *S. epidermidis* до антибіотиків дозволило виявити, що більшість штамів

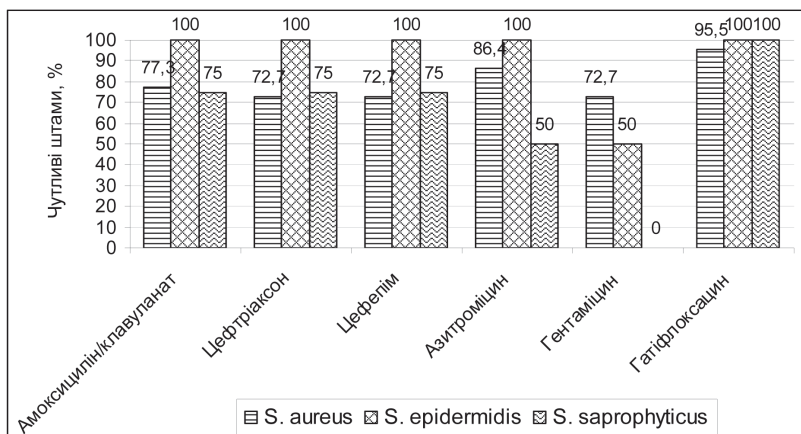


Рис. 2. Частка чутливих до антибіотиків штамів стафілококів.

були чутливі до всіх вивчених препаратів. Полірезистентних штамів серед ізолятів, ідентифікованих як епідермальний стафілокок виявлено не було. Переважна більшість ізолятів були чутливими до всіх застосованих препаратів за винятком єдиного випадку стійкості в одного з двох штамів до гентаміцину, що дозволяє рекомендувати всі препарати, крім останнього, для лікування пацієнтів в першу чергу.

Вивчення рівня чутливості до антибіотиків ізолятів *S. saprophyticus* дозволило виявити, що з усіх

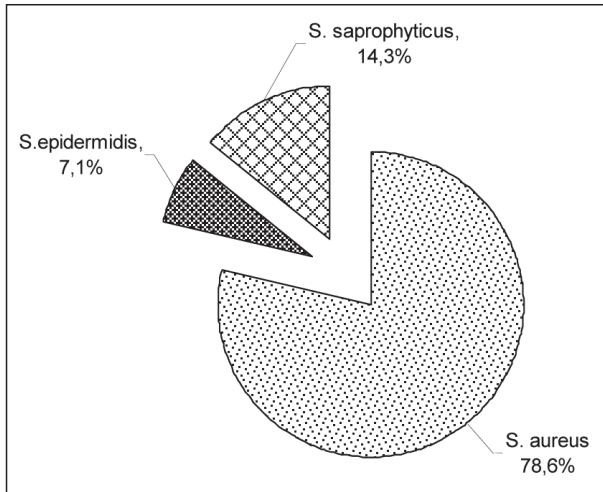


Рис. 1. Частота виявлення різних видів стафілококів.

штамів, які належали до цього виду, єдиний мав ознаки множинної резистентності до застосованих у тесті препаратів. Для інших штамів, як і для золотистого та епідермального стафілокока, було показано, що найбільшу чутливість вони мали до гатіфлоксацину – 100% штамів чутливі. Чутливих до гентаміцину штамів не було. Однак, з огляду на малу кількість досліджених штамів результати неможливо вважати цілком достовірними та можливими для екстраполяції на всі клінічні штами сапрофітного стафілокока.

Аналіз даних літератури щодо спектру чутливості стафілококів до антибіотиків показав, що серед цих мікроорганізмів найбільш часто виявляються форми резистентні до пеніцилінів та цефалоспоринів, що частково підтверджено і даними нашого аналізу. Крім того, у нашому дослідженні відмічено тенденцію до зниження чутливості до гентаміцину, про що є вказівки у багатьох джерелах. Окремі автори [5] наголошують, що саме коагулазонегативні стафілококи (*S. epidermidis*), власне і відрізняються більш високим рівнем резистентності, порівняно із *S. aureus*. Аналіз отриманих нами даних навпаки вказує на більшу резистентність до антибіотиків серед штамів, ідентифікованих як *S. aureus*.

Для всіх виділених ізолятів стафілококів (всього 28) вивчали чутливість до бактеріофагів з трьох комерційних препаратів: бактеріофаг стафілококовий (стафілофаг), інтесті-фаг та секстафаг (піобактеріофаг).

Результати вивчення чутливості до бактеріофагів з комерційних препаратів представлені у **таблиці**.

З результатів, представлених у **таблиці**, можна побачити, що найбільшою чутливістю до фагів відрізнялися ізоляти золотистого стафілокока, не менше 63,6% з яких були чутливими до всіх використаних препаратів.

Чутливість до бактеріофагів виділених ізолятів стафілококів

Ізоляти	Фаговий препарат	Частка чутливих ізолятів, %		
		Стафілофаг	Інтесті-фаг	Секстафаг
<i>S. aureus</i> , n=22		95,5	77,2	63,6
<i>S. epidermidis</i> , n=2		0	0	0
<i>S. saprophyticus</i> , n=4		25	0	25

Серед фагових препаратів найбільш ефективним виявився препарат стафілофага (бактеріофаг стафілококовий полівалентний): до нього виявилися чутливими майже всі досліджені ізоляти золотистого стафілокока (95,5%). До фагів з препарату Інтесті-фаг виявилися чутливими лише 77,2% ізолятів золотистого стафілокока, однією з вірогідних причин чого може бути те, що вказаний препарат є сумішшю фагів проти різних бактерій і загальна частка стафілококового фага недостатньо велика, що є типовим для багатьох фагових препаратів [9]. Чутливість до препарату секстафаг мала найменше значення – 63,6% чутливих ізолятів, що, вірогідно, може бути пояснено попередніми міркуваннями про неповну спрямованість препаратів проти стафілококів.

Серед ізолятів епідермального стафілококу обидва виявилися нечутливими до всіх фагів, а серед ізолятів сапрофітного стафілококу чутливість до бактеріофагів мала одиничний характер (2 штами чутливі до одного з тестованих фагів), вірогідно з-за того, що більшість препаратів не містить специфічних до них фагів. Так, є навіть відомості про те, що бактерії двох вказаних видів навіть не типуються стандартними фагами [3]. Отже, за результатами досліджень чутливими виявилися лише по одному з ізолятів епідермального (до стафілофага) та сапрофітного (до секстафага) стафілококів.

Таблиця.

Для множиннорезистентних до антибіотиків ізолятів показано відсутність стійкості до фагів, що дозволяє рекомендувати їх для терапії дисбактеріозу і сподіватися на високу ефективність такої терапевтичної схеми. За результатами дослідження виявлено, що резистентність до антибіотиків ніяк не співвідноситься із стійкістю до дії бактеріофагів: всі випадки стійкості до фагів серед ізолятів золотистого стафілокока були пов'язані зі стійкістю до різних антибіотиків та їх поєднань.

Висновки

1. Встановлено, що у 52 випадках дисбактеріозу стафілококи виділялися у 88,4%. Дисбіоз було визначено як стафілококовий у 53,8% випадків. До виду *S. aureus* належали 78,6% штамів, *S. epidermidis* – 7,1% та *S. saprophyticus* – 14,3%.

2. Більше 95% штамів були чутливими до гатіфлоксацину. Менш ефективними виявилися гентаміцин, цефепім та цефтріаксон, до яких чутливими були по 72,7% ізолятів.

3. До стафілофага чутливими були 95,5% ізолятів золотистого стафілокока, до Інтесті-фагу виявилися чутливими 77,2%, а до секстафагу – 63,6%.

Перспективи подальших досліджень. Проблема дисбіозів є доволі поширеною, тому існує потреба у розробці засобів профілактики та ефективної корекції подібних станів. З огляду на те, що дисбіози не можна коригувати з використанням антибіотиків гідним доповнення можуть стати лікувальні препарати бактеріофагів, що мають високу специфічність дії щодо окремих мікроорганізмів, не шкодячи іншим представникам мікрофлори. Отже, перспективним напрямом досліджень є вивчення чутливості ізолятів умовно-патогенних мікроорганізмів до фагів з лікувальних препаратів, що може надавати корекційній схемі додаткової ефективності.

Література

- Berezhnoy VV, Unich NK. Kishchnyy disbakterioz u detey. Perinatologiya i pediatriya. 2009;4:25-30. [in Russian].
- Bondarenko VM, Matsulevich TV. Disbakterioz kishchnika kak kliniko-laboratornyy sindrom: sovremennoye sostoyaniye problemy. Moscow: GEOTAR-Media; 2007. 304 s. [in Russian].
- Veselov AY, Karmanova SYu. Liticheskaya aktivnost' i spetsifichnost' kommercheskikh bakteriofagov. Klin Lab Diagn. 1992;9-10:55-7. [in Russian].
- Yershova IB, Vysotskiy AA, Tkachenko VI. Spornyye problemy disbakterioza: soveti prakticheskomu vrachu. Zdorov'ye rebenka. 2008;2:74-6. [in Russian].
- Makushenko RS, Avdyeyeva LV, Macheret YaYu. Vydovyy sklad ta chutlyvist' do antybiotyktiv oksatsylinrezystentnykh izolyativ stafilocokiv. AML. 2008;1-2:14-9. [in Ukrainian].
- Nakaz MOZ Ukrayiny 167 Pro zatverdzhennya metodychnykh vkazivok shchodo vyznachennya chutlyvosti mikroorhanizmv do antybakterial'nykh preparativ (05.04.2007). K: MOZ Ukrayiny; 2007. 63 s. [in Ukrainian].
- Nakaz MOZ USSR 535 Ob unifikatsii mikrobiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovaniya, primenyayemykh v kliniko-diagnosticheskikh laboratoriyakh lechbeno-profilakticheskikh uchrezhdeniy (22.04.1985). M.: MOZ USSR; 1985. 65 s. [in Ukrainian].
- Petrovskaya VG, Marko OP. Mikroflora cheloveka v norme i patologii. Moscow: B.i.; 1996. 189 s. [in Russian].
- Alves DR, Gaudion A, Bean JE, Perez Esteban P, Arnot TC, Harper DR, et al. Combined use of bacteriophage K and a novel bacteriophage to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation. Appl Environ Microbiol. 2014;80(21):6694-703.
- Idelevich EA, von Eiff C, Friedrich AW, Iannelli D, Xia G, Peters G, et al. In vitro activity against *Staphylococcus aureus* of a novel antimicrobial agent, PRF-119, a recombinant chimeric bacteriophage endolysin. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:4416-9.
- Klem J, Dömötör D, Schneider G, Kovács T, Tóth A, Rákhely G. Bacteriophage therapy against staphylococci. Acta Microbiol Immunol Hung. 2013;60(4):411-22.

ЧУТЛИВІСТЬ ДО ФАГІВ ЛІКУВАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ ШТАМІВ СТАФІЛОКОКІВ, ВИДІЛЕНИХ ПРИ ДИСБІОЗІ ШКТ

Куц К. Р., Воронкова О. С.

Резюме. Встановлено, що дисбіоз з переважанням стафілококів мав місце у 53,8% випадків. Найбільш часто виявляли *S. aureus* – 78,6% штамів. Більше 95% штамів були чутливими до гатифлоксацину. Менш ефективними виявилися гентаміцин, цефепім та цефтріаксон, до яких чутливими були по 72,7% ізолятів. До стафілофага чутливими були 95,5% ізолятів золотистого стафілокока, до Інтесті-фагу виявилися чутливими 77,2%, а до секстафагу – 63,6%.

Ключові слова: дисбіоз, стафілококи, шлунково-кишковий тракт, лікувальні препарати фагів.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ФАГАМ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ШТАММОВ СТАФИЛОКОККОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ДИСБИОЗЕ ЖКТ

Куц К. Р., Воронкова О. С.

Резюме. Установлено, что дисбиоз с преобладанием стафилококков имел место в 53,8% случаев. Наиболее часто выявляли *S. aureus* – 78,6% штаммов. Более 95% штаммов были чувствительными к гатифлоксацину. Менее эффективными оказались гентамицин, цефепим и цефтриаксон, к которым чувствительными были по 72,7% изолятов. К стафилофагу чувствительными были 95,5% изолятов золотистого стафилококка, к Интести-фагу оказались чувствительными 77,2%, а к секстафагу – 63,6%.

Ключевые слова: дисбиоз, стафилококки, желудочно-кишечный тракт, лекарственные препараты фагов.

SENSITIVITY TO PHAGE PREPARATIONS OF STAPHYLOCOCCI STRAINS, ISOLATED DURING DYSBIOSIS OF GASTROINTESTINAL DISEASE

Kuts K. R., Voronkova O. S.

Abstract. Normal microflora is a necessary component of macroorganism, which ensures its effective functioning. Microbiome is not a stable group, but has the ability to maintain a dynamic equilibrium with the predominance of certain groups of saprophytic microorganisms in comparison with the implementation of the phenomenon of colonization resistance in order to prevent the pathogenic and pathogenic species from being infected on the biotope. A significant number of external factors can negatively affect on the dynamic balance between macroorganism and its microbiocenosis. Changes in the composition of microbial ecosystems of human body cavities with deviations from the norm are called dysbiosis. The most common is bowel dysbiosis. Today bacteriophages are considered as a safe and effective addition to the correction of the composition of the microbiota, because the high specificity of phages for specific microorganisms can solve the problem with the negative effects of a number of drugs, in particular antibiotics, on saprophytic bacteria.

The aim of the research was to investigate the sensitivity of staphylococcal strains, isolated during dysbiosis to phages from drugs.

The object of the study was the sensitivity to the phage drugs of staphylococcal strains, isolated from adults with dysbiosis of the gastrointestinal tract. For isolated strains, identification for the species was conducted, their sensitivity to antibiotics and bacteriophages from commercial therapeutic agents was studied. Among the 52 samples of biological material from individuals suspected of dysbiosis, the presence of gram-positive cocci was confirmed in 88.4% of cases (46 specimens). The dominant group of staphylococcal microorganisms was found in 53.8% of cases (28 specimens), when they isolated in the highest number compared with other microorganisms. Thus, isolated isolates belonged to one of three types: the vast majority – to the species *S. aureus* (78,6%), much less – to the species *S. epidermidis* (7,1%) and *S. saprophyticus* (14,3%).

As a result of the study of antibiotic susceptibility, it was found that none of the strains identified as *S. aureus* were polyresistant. For all strains of *S. aureus*, it has been shown that more than 72.7% of them were sensitive to all investigated drugs, which is a good prognostic sign for the treatment of patients. The least effective drugs were gentamicin, cefepime and ceftriaxone, to which 72.7% of isolates were susceptible. Of all the drugs, the most effective was gatifloxacin, to which more than 95.5% of isolates were susceptible. The greatest sensitivity to phages had isolates of *S. aureus*, at least 63.6% of which were sensitive to all used drugs. Among the phage drugs, the drug Staphylophage (bacteriophage staphylococcal polyvalent) was most effective: almost all isolated isolates of staphylococcus aureus (95.5%) were sensitive to it. Only 77.2% of isolates of *S. aureus* were found to be phages of the Intesty-Phage, one of the most likely reason for this is that the drug is a mixture of phages against different bacteria and the overall proportion of staphylococcal phage is not large enough, which is typical for many phage. The sensitivity to the drug, sekstaphage has the smallest value – 63.6% of sensitive isolates, which is likely to be explained by previous considerations about the incomplete orientation of drugs against staphylococci.

Key words: dysbiosis, staphylococci, gastrointestinal tract, phages drugs.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.
Стаття надійшла 24.12.2017 року