

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

А.А.Вакарина, Л.В.Катаева, Т.Ф.Степанова

### ВЛИЯНИЕ БАКТЕРИОФАГОВ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Тюменский НИИ краевой инфекционной патологии

*Цель.* Изучение влияния бактериофагов на формирование резистентности условно патогенных бактерий к антибактериальным препаратам. *Материалы и методы.* В работе изучена чувствительность 108 штаммов *Staphylococcus aureus* к стафилококковому бактериофагу, 97 штаммов бактерий рода *Klebsiella* к бактериофагу клебсиелл поливалентному, а также к антибактериальным препаратам до и после взаимодействия со специфическим бактериофагом. *Результаты.* Чувствительность бактерий *S.aureus* к стафилококковому бактериофагу составила 66,7%, литическая активность бактериофага клебсиелл поливалентного в отношении штаммов бактерий рода *Klebsiella* — 83,5%. После взаимодействия со специфическим бактериофагом зарегистрировано снижение числа чувствительных и умеренно устойчивых штаммов *S.aureus* к антибактериальным препаратам. Количество чувствительных к антибиотикам бактерии рода *Klebsiella* увеличилось под влиянием клебсиеллезного бактериофага. *Заключение.* Результаты исследования свидетельствуют о разнонаправленном влиянии бактериофагов на антибиотикочувствительность условно патогенных культур и необходимости дополнительного изучения механизмов данного воздействия с помощью современных молекулярно-генетических методов исследования.

Журн. микробиол. 2019, № 2, С. 3—7

Ключевые слова: условно патогенная микрофлора, бактериофаги, чувствительность к антибиотикам

А.А.Vakarina, L.V.Kataeva, T.F.Stepanova

### INFLUENCE OF BACTERIOPHAGES ON SENSITIVITY OF CONDITIONALLY PATHOGENIC BACTERIA TO ANTIBACTERIAL PREPARATIONS

Tyumen Research Institute of Region Infection Pathology, Russia

*Aim.* Study of the influence of bacteriophages on the formation of resistance of opportunistic bacteria to antibacterial drugs. *Materials and methods.* The sensitivity of 108 strains of *Staphylococcus aureus* to the staphylococcus bacteriophage, 97 strains of bacteria of the genus *Klebsiella* to the bacteriophage *Klebsiella* polyvalent, and also to antibacterial preparations before and after interaction with a specific bacteriophage has been studied. *Results.* The sensitivity of *S. aureus* bacteria to the staphylococcus bacteriophage was 66.7%, the lytic activity of the *Klebsiella* bacteriophage was polyvalent for strains of the *Klebsiella* genus, 83.5%. A decrease in the number of sensitive and moderately resistant strains of *S. aureus* to antibacterial drugs after interaction with a specific bacteriophage has been reported. The number of bacteria sensitive to antibiotics of the genus *Klebsiella* increased under the influence of the *Klebsiella* bacteriophage. *Conclusion.* The results of the study testify to the multidirectional influence of bacteriophages on the antibiotic susceptibility of opportunistic cultures and the need for additional study of this issue with the help of modern molecular genetic methods of research.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 3—7

Key words: conditionally pathogenic microflora, bacteriophages, antibiotic resistance

## ВВЕДЕНИЕ

Известно, что бактериофаги играют важную роль в эволюции бактерий и приобретении ими новых свойств благодаря феномену фаговой или лизогенной конверсии. Доказано, что фаги могут изменять морфологические признаки бактерий [1]. Присутствие большого числа фаговых частиц в популяции может привести к значительной интенсификации процессов передачи плазмид и в результате к формированию множественно устойчивых популяций [2]. Бактериофаги являются векторами для горизонтального переноса генов резистентности между бактериальными патогенами [6, 7, 10].

Бактериофаги представляют собой вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки. Антибактериальный эффект препаратов бактериофагов обусловлен внедрением генома фага в бактериальную клетку с последующим его размножением и лизисом инфицированной клетки [4]. Препараты бактериофагов могут использоваться в сочетании с любыми другими лечебными препаратами [3].

В настоящее время нельзя однозначно утверждать, что комбинированное использование фагов и антибиотиков будет полезным. Возможность передачи генетических детерминант резистентности к антибактериальным препаратам посредством бактериофагов показана во многих исследованиях [8 — 10]. В случаях, когда антибиотики мешают бактериальной клетке поддерживать репликацию фагов, комбинированное использование предположительно снижает эффективность лечения фагами и терапии в целом. Однако в других исследованиях, в которых фаги и антибиотики применялись одновременно (например, для лечения хронических легочных нагноений), показано, что данное сочетание улучшало результат терапии [Мозговая Ю.А., 2015]. Полагают, что использование фагов как в монотерапии, так и совместно с антибиотиками может препятствовать появлению антибиотикоустойчивых и фагоустойчивых бактериальных мутантов, так как механизмы возникновения антибиотикоустойчивости и фагоустойчивости различны [5].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния специфических бактериофагов на формирование резистентности условно патогенных бактерий к антибактериальным препаратам.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование чувствительности к антибиотикам и влияние бактериофагов на антибиотикорезистентность проведено на 108 штаммах *Staphylococcus aureus* и на 97 культурах бактерий рода *Klebsiella* (*K.pneumoniae* — 56 штаммов и 41 — *K.oxytoca*), выделенных из различных локусов новорожденных (слизистые зева, носа, глаза, анального отверстия, пупочного остатка, кожи). Выделенные штаммы первоначально исследовались на чувствительность к специфическим бактериофагам и антибиотикам. Определялась чувствительность каждого исследуемого штамма к специфическому бактериофагу: стафилококковый бактериофаг и бактериофаг клебсиелл поливалентный (ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ, г. Уфа). Чувствительность культуры к бактериофагу определяли по интенсивности мутности питательной среды. Литическую активность бактериофага оценивали как высокую, если мясо-пептонный бульон был прозрачен, как умеренную — если питательный бульон опалесцировал, как низкую, если культуральная среда после инкубации с бактериофагом оставалась мутной. В ходе проведения исследований ставился контроль стерильности питательной среды, бактериофага.

Изучение влияния бактериофага на чувствительность бактерий к антибактериальным препаратам проводилось по следующей схеме. Суточные культуры бактерий исследовали на чувствительность к антибиотикам, затем в течение 18-24 часов при 37 °С культивировали этот же штамм со специфическим бактериофагом в пробирке с мясо-пептонным бульоном (5 мл бульона + 5 капель бактериофага + петля суточной агаровой испытуемой культуры). После взаимодействия с бактериофагом из всех пробирок производился высеv на плотную питательную среду (мясо-пептон-

ный агар) с целью выделения оставшихся жизнеспособных бактериальных клеток. Выросшие колонии отивали на скошенный МПА. Через сутки культивирования при 37 °С готовили бактериальную суспензию ( $1,5 \cdot 10^8$  КОЕ/мл) и повторно исследовали на чувствительность к антибиотикам.

Чувствительность бактерий к антибиотикам определялась диско-диффузионным методом на среде Мюллер-Хинтон (HiMedia, Индия) в соответствии с действующими методическими указаниями [8, 9]. Изоляты бактерий рода *Klebsiella* исследовались на чувствительность к ампициллину (АМП), гентамицину (ГЕН), тетрациклину (ТЕТ), офлоксацину (ОФ), цефотаксиму (ЦТК), цефтазидиму (ЦАЗ). Штаммы бактерий *Staphylococcus aureus* исследовались на чувствительность к оксациллину (ОКС), цефалексину (ЦФЛ), цефуроксиму (ЦОС), гентамицину, офлоксацину, эритромицину (ЭРИ). В данном исследовании использовались диски антибиотиков производства Biorad (США).

Статистическая обработка результатов осуществлялась в программе «Excel» с вычислением показателей: средней арифметической, ошибки и достоверности полученных различий с использованием критерия Стьюдента. В исследовании использовались дискретные данные (типа Да/Нет — устойчивые/чувствительные). С применением лицензионной программы SPSS версия 14,0, предназначенной для научных исследований, проведен анализ таблиц сопряженности для расчета отношения шансов встречаемости исследуемых явлений в группах. Гипотеза о равенстве шансов встречаемости отвергалась, когда величина соответствующего критерия не равна 1, а его 95% доверительные интервалы не включали в себя 1.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделенные штаммы бактерий *S.aureus* первоначально были исследованы на чувствительность к стафилококковому бактериофагу, показатель составил 66,7 % (чувствительных штаммов 25; штаммов с промежуточной чувствительностью 47 и устойчивых — 36). Параллельно определяли чувствительность к антибактериальным препаратам. После взаимодействия с бактериофагом 38 культур не дали роста, поэтому повторно чувствительность к антибиотикам определялась у остальных 70 штаммов. Частота встречаемости резистентных (R) штаммов, штаммов с промежуточной чувствительностью (I) и чувствительных (S) в исследуемой популяции *S. aureus* представлена на рис. 1.

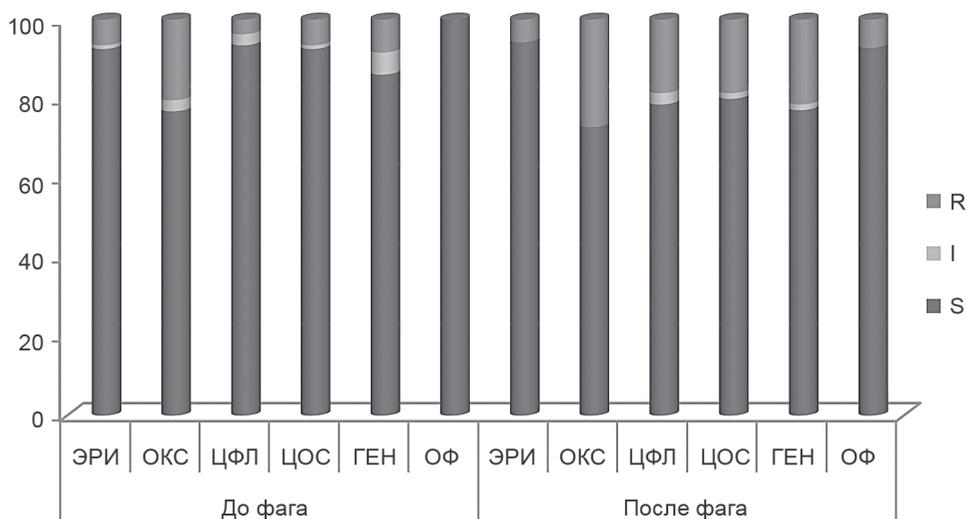


Рис. 1. Чувствительность к антимикробным препаратам бактерий *S. aureus* до и после взаимодействия со стафилококковым бактериофагом (%).

Сравнительная характеристика штаммов стафилококков по чувствительности к антибиотикам до и после взаимодействия с бактериофагом стафилококковым показала, что после взаимодействия с фагом увеличилось количество штаммов, резистентных к оксациллину и цефалоспорином (цефалексину, цефуроксиму), а также к гентамицину и офлоксацину. При этом статистически значимые различия выявлены только по гентамицину (критерий Мак-Немара).

Изучение литической активности бактериофага клебсиелл поливалентного в отношении штаммов бактерий рода *Klebsiella* показало следующие результаты: 59,8 % штаммов были чувствительными, 23,7% изолятов обладали промежуточной чувствительностью и 16,5% проявляли резистентность. Все штаммы исследованы на чувствительность к антибиотикам. Часть культур бактерий рода *Klebsiella* (50) после взаимодействия со специфическим бактериофагом лизировалась полностью, поэтому чувствительность к антибактериальным препаратам исследована у 47 штаммов. Результаты определения чувствительности клебсиелл к антибиотикам представлены на рис. 2. Статистически значимые отличия по отношению шансов регистрируются по тетрациклину — после взаимодействия бактерий с бактериофагом их чувствительность к этому антибиотику возрастает в 2 раза.

Известно, что бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, и в частности рода *Klebsiella*, обладают природной устойчивостью к ампициллину. В исследованной нами популяции клебсиелл до взаимодействия с бактериофагом выявлено 77% штаммов, обладающих природной резистентностью. После взаимодействия с бактериофагом количество резистентных штаммов в этой популяции составило 68%.

При суммировании количества чувствительных штаммов и штаммов с промежуточной чувствительностью к антибиотикам показано, что в популяции бактерий *S. aureus* после взаимодействия со специфическим бактериофагом количество штаммов S+I уменьшается, в то время как в популяции бактерий рода *Klebsiella* — увеличивается. Минимальные отличия в антибиотикограмме, скорее всего, являются проявлениями фенотипической вариабельности экспрессии определенного механизма резистентности.

Таким образом, проведенные исследования влияния бактериофагов на чувствительность бактериальных культур к антибиотикам свидетельствуют о разнонаправленных взаимодействиях в различных популяциях бактерий *in vitro*. Зарегистрирована тенденция снижения числа чувствительных и умеренно устойчивых штаммов *S.aureus* к антибактериальным препаратам после взаимодействия со

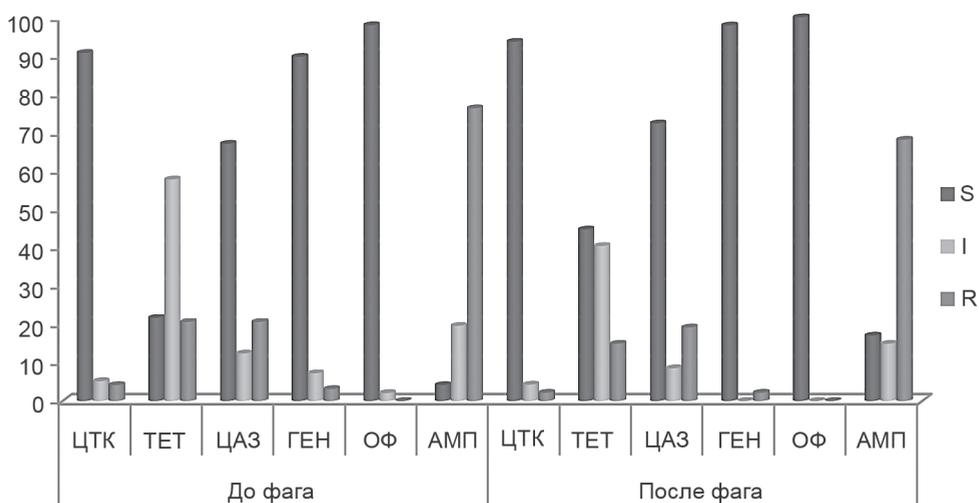


Рис. 2. Чувствительность к антимикробным препаратам бактерий рода *Klebsiella* до и после взаимодействия с бактериофагом клебсиелл поливалентным (%).

специфическим бактериофагом, достоверное снижение отмечено по гентамицину. Количество чувствительных к антибиотикам бактерий рода *Klebsiella* имеет тенденцию к увеличению под влиянием клебсиеллезного бактериофага. Выявлено достоверное увеличение штаммов чувствительных к тетрациклину. Скорее всего, это связано с морфофункциональными особенностями исследованных культур микроорганизмов.

Изучение процессов влияния бактериофагов на чувствительность к антибиотикам различных популяций бактерий будет способствовать решению важных практических проблем, связанных с успешной терапией бактериальных инфекций. Результаты исследования свидетельствуют о необходимости дополнительного изучения данного вопроса с помощью современных молекулярно-генетических методов исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Асланов Б.И., Долгий А.А., Гончаров А.Е., Архангельский А.И. Роль бактериофагов в горизонтальном генетическом обмене среди возбудителей инфекций в стационарах. Эпидемиология, микробиология, инфекционные и паразитарные болезни. 2012, 4(45):38-41.
2. Зуева В.С., Дмитриенко О.А., Клицунова Н.В. Роль профагов в формировании антибиотикоустойчивых популяций стафилококков в процессе трансформации, трансдукции и конъюгации. Антибиотики и химиотерапия. 1996, 41(10):35-42.
3. Карабелеш Е.Е., Ткаченко С.А., Панкратов С.М., Демедюк О.И. Применение бактериофагов, как концепция лечебного и профилактического направления в медицине. Актуальные проблемы транспортной медицины. 2008, 1(11):135-139.
4. Красильников И.В., Лыско К.А., Лобастова А.К. Лечебно-профилактические препараты бактериофагов: современное состояние применения и производства. Медицинский алфавит. Эпидемиология и санитария. 2010, 4:9-11.
5. Падруль М.М., Кобаидзе Е.Г., Олина А.А., Садыкова Г.К. «Ренессанс» фаготерапии воспалительных процессов. Современные проблемы науки и образования. 2015, 1:1358-1370.
6. Blahova J., Kralikova K., Kreméry V. et al. Low-Frequency transduction of imipenem resistance and high-frequency transduction of ceftazidime and aztreonam resistance by the bacteriophage AP-151 isolated from a *P.aeruginosa* strain. J. Chemother. 2000, 12.(6):482-486.
7. Colomer-Lluch M., Imamovic L., Jofre J. et al. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. Antimicrob. Agents. Chemother. 2011: 55(10):4908-4911.
8. Fancello L., Desnues C., Raoult D. et al. Bacteriophages and diffusion of genes encoding antimicrobial resistance in cystic fibrosis sputum microbiota. J. Antimicrob. Chemother. 2011, 66(11):2448-2454.
9. Mazaheri Nezhad Fard R., Barton M.D., Heuzenroeder M.W. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. Lett. Appl. Microbiol. 2011, 52(6):559-564.
10. Varga M., Kuntová I., Pantucek R. et al. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. FEMS Microbiol Lett. 2012, 332 (2):146-152.

*Поступила 07.09.18*

Контактная информация: Катаева Любовь Владимировна, к.м.н., 625026, Тюмень, ул. Республики, 147, р.т. (3452) 28-99-98, доб. 1123