

УДК 616.921-036.22:614.21(470.341)

СОСТОЯНИЕ ФАГОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ СТАФИЛОКОККОВ – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ В МЕДИЦИНСКИХ ОРГАНИЗАЦИЯХ НИЖЕГОРОДСКОЙ ОБЛАСТИ

Р.Ф. Чанышева, О.В. Ковалишена,

ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия»

Ковалишена Ольга Васильевна – e-mail: kovalishena@mail.ru

Целью исследования была оценка состояния чувствительности к препаратам стафилококковых бактериофагов, клинических штаммов *Staphylococcus* spp., выделенных от пациентов с инфекцией в ходе регионального микробиологического мониторинга. Авторами была оценена чувствительность 289 штаммов *Staphylococcus* spp. (239 *S. aureus* и CoNS) из 6 медицинских организаций к 3 коммерческим препаратам методом «стерильного пятна». Всего 1200 исследований. Установлена широкая распространенность устойчивости: от 41,6% (95% ДИ 35,8–47,4%) для «Бактериофага стафилококкового жидкого» до 48,7% (95% ДИ 42,2–54,7%) для «Интести-бактериофага». Доля устойчивых штаммов CoNS была в среднем в 2 раза больше, чем у *S. aureus* ($p=0,01$), и составила 74,0–82,2%, только от 29,4% до 36,4% штаммов *S. aureus* являлись чувствительными. Авторы делают заключение о необходимости выделения и создания специфического коагулазонегативного стафилококкового препарата бактериофага, актуализации выпускаемых коммерческих препаратов бактериофагов на основе клинических штаммов *S. aureus* и осуществление регулярной оценки чувствительности к бактериофагам клинических штаммов в рамках микробиологического мониторинга на территориальном уровне.

Ключевые слова: стафилококки, стафилококковые бактериофаги, устойчивость к бактериофагам.

The assessment of a condition of sensitivity to preparations of staphylococcal bacteriophages, clinical strains of *Staphylococcus* spp was a research objective. allocated from patients with an infection during regional microbiological monitoring. Authors estimated sensitivity of 289 strains of *Staphylococcus* spp. (239 *S. aureus* and CoNS) from 6 medical organization to 3 commercial preparations a method of «a sterile spot». Only 1200 researches. Prevalence of stability is established: from 41,6% (95% CI 35,8–47,4%) for «A bacteriophage staphylococcal liquid» to 48,7% (95% CI 42,2–54,7%) for «Intestibakteriofag». The share of steady strains of CoNS was average twice bigger, than at *S. aureus* ($p=0,01$), and made 74,0–82,2%, only from 29,4% to 36,4% of strains of *S. aureus* were sensitive. Authors do the conclusion about need of allocation and creation of a specific CoNS preparation of a bacteriophage, updating of let-out commercial preparations of bacteriophages on the basis of clinical strains of *S. aureus* and implementation of a regular assessment of sensitivity to bacteriophages of clinical strains within microbiological monitoring at territorial level.

Key words: *Staphylococcus* spp., staphylococcal bacteriophages, resistance to bacteriophages.

По заявлению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), лекарственная устойчивость микроорганизмов может в скором времени нивелировать достижения современной медицины, в том числе в борьбе с инфекционными заболеваниями, сделав их неуправляемыми [1].

В условиях роста резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам (АМП), прежде всего, антибиотикам, становится актуальным применение с лечебной и профилактической целью препаратов бактериофагов (БФ) [2, 3]. Особую значимость приобретает применение БФ при инфекциях, связанных с оказанием медицинской помощи населению (ИСМП), лидирующее положение среди которых занимают инфекции, вызываемые *Staphylococcus spp.* (*S. aureus* и коагулазоотрицательными стафилококками – CoNS) [4, 5, 6].

БФ, гомологичные *S. aureus*, достаточно широко распространены. Так, выделяют 3 семейства, самое представительное из которых – Siphoviridae, включает 52 вида. По сравнению с ними фаги, активные в отношении коагулазонегативных стафилококков (CoNS), стали активно изучаться относительно недавно. Число фагов, гомологичных CoNS, насчитывает 9 представителей, относящихся к одному семейству (Siphoviridae) [7].

К настоящему моменту накоплен определенный опыт применения стафилококковых БФ на территории Нижегородской области. Эффективность фаготерапии пациентов с первичными гнойно-септическими инфекциями в поликлинических условиях была доказана в контролируемом эпидемиологическом эксперименте: повышение эффективности лечения, снижение степени контаминации ран и длительности выделения возбудителя, что в свою очередь уменьшило эпидемиологическую значимость таких пациентов как источников инфекции [8]. Показателен положительный опыт широкого применения стафилококковых фагов в период эпидемического неблагополучия, вызванного метициллинчувствительным *S. aureus*, несущим комплекс генов, кодирующих синтез PVL (MSSA-PVL) в условиях родильного дома (2009–2010 гг.) Стафилококковый БФ применялся для санации носителей среди медицинского персонала, лечения и экстренной профилактики инфекции у пациентов, обработки внешней среды, что в комплексе с другими мероприятиями позволило остановить циркуляцию MSSA-PVL [9].

Преимущества БФ хорошо известны, среди них сохранность нормофлоры, низкая частота побочных эффектов, минимальный перечень противопоказаний, возможность сочетания с антибиотиками, эффективность в отношении антибиотикорезистентных штаммов и другие [2, 3]. Среди факторов, ограничивающих применение БФ, в том числе стафилококковых БФ, следует отметить способность БФ обеспечивать горизонтальный и вертикальный перенос генов и способствовать возникновению штаммов, обладающих патогенным потенциалом. Известно, что штаммы стафилококков имеют в своем составе гены БФ, кодирующих эксфолиативный токсин А (eta), энтеротоксины (see, sel, sea), стафилокиназу (sak) и др. [10, 11, 12]. Кроме того, появление фагоустойчивых бактериальных штаммов также ограничивает их применение.

Однако и при возникновении фагоустойчивых штаммов подбор новых фагов, активных в отношении устойчивых штаммов, возможен в силу их высокой пластичности и огромной распространенности в природе. Другим путем решения проблемы фагоустойчивости бактерий является применение «фаговых коктейлей» – смесь нескольких литических фагов, активных против одного штамма микроорганизма [3].

Таким образом, при практическом применении препаратов БФ для лечения и профилактики инфекций требуется своевременное реагирование на возникновение устойчивости микроорганизмов к применяемым БФ и другие изменения, особенно этиологической структуры, вирулентности штаммов, резистентности к другим АМП. Это диктует необходимость обязательной оценки чувствительности к препаратам БФ как перед их массовым применением как противоэпидемического мероприятия, так и в индивидуальной терапии, а также актуализацию выпускаемых препаратов БФ в соответствии с распространенностью фагорезистентности среди возбудителей инфекций. В этой связи актуальным является обладание оперативной информацией о фагочувствительности штаммов, циркулирующих в медицинских организациях на территории.

Целью исследования явилась оценка состояния чувствительности к стафилококковым БФ, используемым в качестве лекарственных препаратов, клинических штаммов *Staphylococcus spp.*, выделенных от пациентов с инфекцией в ходе регионального микробиологического мониторинга в ЛПО.

Материалы и методы

В исследование были включены 289 штаммов *Staphylococcus spp.*, выделенных из клинического материала пациентов с инфекцией, преимущественно ИСМП, из 6 ЛПО Н. Новгорода и Нижегородской области (городская детская больница, родильный дом, 2 центральные районные больницы, 2 медицинских центра). Культуры были выделены и исследованы в рамках регионального микробиологического мониторинга в Проблемной научной лаборатории НИИ профилактической медицины НижГМА. Всего была оценена фагочувствительность 239 изолятов *S. aureus* и 50 – CoNS. Была проведена оценка литических свойств коммерческих препаратов БФ, включая монопрепарат «Бактериофаг стафилококковый жидкий» (СБФ), и комплексные препараты со стафилококковым компонентом – «Интести-бактериофаг» (ИБФ) и «Пиобактериофаг комбинированный» (ПБФ). Всего 1200 исследований.

Оценка литической активности фагов была проведена методом «стерильного пятна», учет результатов – по пятибалльной шкале (по количеству «крестов»). В нашем исследовании культуры стафилококков по их чувствительности к применяемым коммерческим препаратам БФ были разделены на чувствительные с интенсивностью лизиса «++++», «+++», «++», слабочувствительные – «+» и нечувствительные – с отсутствием лизиса культуры. Распространенность чувствительности/нечувствительности рассчитывалась на 100 исследованных культур (%) с определением доверительных границ колебаний показателей с вероятностью безошибочного прогноза 95% (95%ДИ).

Результаты и их обсуждение

При оценке фагочувствительности всей популяции *Staphylococcus spp.* были получены результаты, свидетельствующие о широкой распространенности устойчивости этиологически значимых стафилококков, циркулирующих в ЛПО, к применяемым коммерческим препаратам стафилококкового БФ. Преобладание устойчивых культур отмечено по отношению к каждому из тестируемых препаратов БФ. Доля нечувствительных штаммов *Staphylococcus spp.* колебалась от 41,6% (95% ДИ 35,8–47,4%) для СБФ до 48,7% (95% ДИ 42,2–54,7%) для ИБФ. Относительно большую активность показал препарат СБФ, чувствительными к которому оказались 31,8% (95% ДИ 26,4–37,2%) vs 28,2% (95% ДИ 22,8–33,6%) у ПБФ и 26,0% (95% ДИ 20,6–31,4%) у ИБФ; однако, различия статистически недостоверны.

Наряду с лидированием нечувствительных культур в общей популяции *Staphylococcus spp.*, схожая картина была отмечена и среди *S. aureus* и CoNS (таблица). При этом доля устойчивых штаммов CoNS была в среднем в 2 раза больше, чем у *S. aureus* ($p=0,01$) и составила 74,0–82,2%. Удельный вес фагоустойчивых CoNS достоверно превосходил удельный вес чувствительных CoNS относительно всех 3 коммерческих препаратов. Такое подавляющее преобладание устойчивости к стафилококковым бактериофагам у CoNS в какой-то степени является ожидаемым, т. к. данные БФ создавались с учетом литической активности в отношении прежде всего *S. aureus*. Однако БФ позиционируются как активные в отношении рода стафилококков. Исходя из инструкции по применению исследуемых препаратов БФ (а именно при «инфекции стафилококковой этиологии»), можно было ожидать их одинаковую активность в отношении как *S. aureus*, так и CoNS. Однако результаты исследования показали значительно более низкую чувствительность в популяции CoNS (в 3,5 раза ниже, чем у *S. aureus*).

С учетом значительной доли CoNS в этиологической структуре ИСМП такая нечувствительность к стафилококковым БФ должна быть учтена. Требуется этиологическая расшифровка инфекции до вида стафилококка для адекватного выбора терапии и назначения БФ, особенно при инфекциях, традиционно рассматриваемых как стафилококковые.

Если распространенность устойчивости к БФ CoNS является закономерной, то преобладание нечувствительных к БФ *S. aureus* (удельный вес от 34,7 до 4890,1%) – это настораживающий факт, требующий более подробного рассмотрения. Широкая распространенность устойчивости отмечалась по отношению ко всем трем коммерческим препаратам. Достоверных отличий удельного веса чувствительных, слабочувствительных и нечувствительных штаммов нет. Однако только от 29,4 до 36,4% штаммов являлись чувствительными к БФ, что существенно ограничивает применение этих препаратов для борьбы с ИСМП.

Была проведена оценка перекрестной устойчивости культур к разным препаратам, содержащим стафилококковый бактериофаг [13]. Доля штаммов, характеризующихся отсутствием чувствительности к двум и более препаратам БФ, значительно выше как среди *S. aureus*, так и

в популяции CoNS, и составляет 75,2% (95% ДИ 67,0–83,4%) и 94,7% (95% ДИ 87,4–100%) соответственно. Удельный вес нечувствительных к действию одного и более БФ штаммов из числа CoNS составил 84,4% (95% ДИ 73,6–95,2%), что в 1,7 раза больше, чем у *S. aureus* – 49,6% (95% ДИ 43,0–56,2%) ($p=0,01$).

ТАБЛИЦА.

Спектр литической активности коммерческих препаратов БФ в отношении клинических штаммов *Staphylococcus spp.*

Препарат БФ	Доля <i>Staphylococcus spp.</i> , % (95% ДИ)					
	<i>S. aureus</i>			CoNS		
	чувствительные	слабочувствительные	нечувствительные	чувствительные	слабочувствительные	нечувствительные
СБФ	36,4 ¹ (30,2-42,6)	28,9 (23,1-34,7)	34,7 ¹ (28,5-40,9)	10 (1,6-18,4)	16 (5,6-26,4)	74,0 ³ (61,6-86,4)
ИБФ	29,4 ^{1,2} (23,4-35,4)	28,5 ^{1,2} (22,5-34,5)	42,1 ^{1,2} (35,5-48,7)	8,9 (0,5-17,3)	8,9 (0,5-17,3)	82,2 ³ (70,8-93,6)
ПБФ	32,0 ¹ (25,8-38,2)	29,4 ¹ (23,4-35,4)	38,6 ¹ (32,2-45,0)	8,9 (0,5-17,3)	11,1 (1,7-20,5)	80,0 ³ (60,0-92,0)

Примечание: ¹ – показатели *S. aureus* vs CoNS статистически достоверны ($p=0,01$); ² – показатели достоверно ниже доли нечувствительных штаммов *S. aureus* ($p=0,01$); ³ – показатели достоверно выше доли чувствительных штаммов CoNS ($p=0,01$).

Выводы

Полученные результаты с учетом накопленного положительного опыта применения бактериофагов в борьбе со стафилококковыми инфекциями подтверждают необходимость:

1. выделения и создания специфического коагулазонегативного стафилококкового препарата БФ, активного в отношении CoNS;
2. актуализации выпускаемых коммерческих препаратов бактериофагов БФ, содержащих стафилококковый компонент, на основе клинических штаммов *S. aureus*, циркулирующих на данной территории и в конкретной медицинской организации;
3. обязательного проведения лабораторного исследования литической активности назначаемых препаратов БФ до применения для эффективной фаготерапии и фагопрофилактики;
4. проведения анализа фагочувствительности стафилококков, вызывающих ИСМП в ЛПО, в рамках микробиологического мониторинга на территориальном уровне для своевременного обновления применяемых бактериофагов.

ЛИТЕРАТУРА

1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/ru> – Всемирная организация здравоохранения (Дата обращения: 01.03.2014)
2. Послова Л.Ю., Ковалишена О.В. Бактериофаги и их применение в ЛПУ: методические рекомендации. Н. Новгород, 2012.
Poslova L. YU., Kovalishena O.V. Bakteriofagi i ih primeneniye v LPU: metodicheskie rekomendacii. N. Novgorod, 2012.
3. Бактериофаги: биология и практическое применение / под ред. Элизабет Каттер, Александра Сулаквелидзе // пер. с англ. М.: Научный мир, 2012. 640 с.: ил.
Bakteriofagi: biologiya i prakticheskoe primeneniye / pod red. E'lizabet Katter, Aleksandra Sulakvelidze // per. s angl. M.: Naucnyj mir, 2012. 640 s.: il.
4. Дерябин Д.Г. Стафилококки: экология и патогенность. Екатеринбург.: УрО РАН, 2000. 239 с.

Deryabin D.G. Stafilokokki: ekologiya i patogenost'. Ekaterinburg: UrO RAN, 2000. 239 s.

5. Благодравова А.С., Воробьева О.Н., Ковалишена О.В. и др. Эпидемиологические и микробиологические аспекты госпитальных гнойно-септических инфекций новорожденных, обусловленных коагулазоотрицательными стафилококками. Медицинский альманах. 2009. № 2. С. 72-75.

Blagonravova A.S., Vorob'eva O.N., Kovalishena O.V. i dr. Epidemiologicheskie i mikrobiologicheskie aspekty gospital'nyh gnojno-septicheskikh infekciy novorozhdennyh, obuslovlennyh koagulazootricatel'nymi stafilokokkami. Medicinskij al'manah. 2009. № 2. S. 72-75.

6. Martins A., Cunha Mde L. Methicillin resistance in Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. Microbiol Immunol. 2007. № 51 (9). P. 787-95.

7. Deghorain M., Van Melderen L. The Staphylococci Phages Family: An Overview. Viruses. 2012. December. № 4 (12). P. 3316-3335.

8. Благодравова А.С. Эпидемиологические особенности гнойно-септических инфекций у хирургических больных в условиях поликлиники: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Н. Новгород, 2004. 164 с.

Blagonravova A.S. Epidemiologicheskie osobennosti gnojno-septicheskikh infekcij u hirurgicheskikh bol'nyh v usloviyah polikliniki: avtoref. diss. kand. med. nauk. N. Novgorod, 2004. 164 s.

9. Иванова Н.Ю., Широкова И.Ю., Дмитренко О.А., Ковалишена О.В., Копассовская О.В. Эпидемическое неблагополучие в родильном доме,

вызванное метициллинчувствительным Staphylococcus aureus, несущим комплекс генов, кодирующих синтез лейкоцидина пантона-валентина // Инфекционные болезни: Материалы V Всероссийского конгресса по инфекционным болезням. 2013. Т. 11. Прил. № 1. С. 166-167.

Ivanova N. YU., Shirokova I. YU., Dmitrenko O.A., Kovalishena O.V., Kopassovskaya O.V. Epidemicheskoe neblagopoluchie v rodil'nom dome, vyzvanное meticillinchuvstvitel'nyim Staphylococcus aureus, nesushimi kompleks genov, kodiruyushchikh sintez lejkocidina pantone-valentina // Infekcionnye bolezni: Materialy V Vserossijskogo kongressa po infekcionnym boleznyam. 2013. T. 11. Pril. № 1. S. 166-167.

10. Canchaya C., Fournous G., Brussow H. The impact of prophages on bacterial chromosomes. Mol Microbiol. 2004. Vol. 53 (1). P. 9-18.

11. Brussow H., Canchaya C., Hardt W.D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. Microbiol Mol Biol Rev. 2004. Vol. 68 (3). P. 560-602.

12. Varga M., Kuntova L., Pantucek R. et al. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant Staphylococcus aureus USA300 clone. FEMS Microbiol Lett. 2012. Vol. 332 (2). P. 146-152.

13. Шкарин В.В., Благодравова А.С. Термины и определения в эпидемиологии: словарь. Н. Новгород: Издательство НГМА, 2010. 300 с.

Shkarin V.V., Blagonravova A.S. Terminy i opredeleniya v epidemiologii: slovar'. N. Novgorod: Izdatel'stvo NGMA, 2010. 300 s.