**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ЦЕФТРИАКСОНА И БАКТЕРИОФАГА В ОТНОШЕНИИ ШТАММОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

**Коцарь Е. В.**

Ассистент, к. мед. н. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Харьковского национального медицинского университета, Харьков, Украина

**Кочнева Е. В.**

Старший преподаватель, к. мед. н. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Харьковского национального медицинского университета, Харьков, Украина

**Венжега К. А., Ладыка Т. Н., Сова К. С.**

Студенты ІІ курса медицинского факультета Харьковского национального медицинского университета, Харьков, Украина

**EFFICIENCY ASSESMENT OF COMBINED ACTION CEFTRIACON AND BACTERIOPHAGE ON STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS**

**Kotsar E. V.**

Assistant, PhD in Medicine. Department of microbiology, virology and immunology, Kharkiv national medical university, Kharkiv, Ukraine

**Kochneva E. V.**

Senior Lecturer, PhD in Medicine. Department of microbiology, virology and immunology, Kharkiv national medical university, Kharkiv, Ukraine

**Venhzega K., Ladyka T., Sova K.**

Students ІІ year of Kharkiv national medical university, Kharkiv, Ukraine

**Аннотация**

Стафилококковая инфекция – одна из важнейших проблем медицинской практики. *Staphylococcus aureus* занимает ведущее место в структуре кожной патологии, и различных гнойно-воспалительных заболеваний органов и систем человека. На сегодняшний день остается нерешенной проблема высокой степени антибиоткорезистентности этих микроорганизмов. Проведенное исследование показало, что комбинация цефтриаксона и бактериофага имеет высокую антимикробную активность в отношении клинических штаммов *S. аureus.* Также в ходе работы было установлено, что данная комбинация эффективна не только на планктонные клетки, но и на микроорганизмы в форме бипленок.

**Ключевые слова:** *Staphylococcus aureus*, антибиотикорезистентность, цефтриаксон, бактериофаги.

**Abstract**

Staphylococcal infection is one of the most important problems in medical practice. *Staphylococcus aureus* takes a leading place in the structure of cutaneous pathology, and various purulent-inflammatory diseases of human organs and systems. To date the problem of the high degree of antibiotic resistance of these microorganisms remains unsolved. The conducted research showed that the combination of ceftriaxone and bacteriophage has a high antimicrobial activity against the clinical strains of *S. aureus*. Also during the work it was found that this combination is effective not only on plankton cells, but also on microorganisms in the form of biofilms.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, antibiotic resistance, ceftriaxone, bacteriophages.

Актуальной проблемой современной медицины являются инфекций, вызванных золотистым стафилококком. Этот возбудитель наиболее значимый этиологический фактор в развитие гнойно-воспалительных заболеваний кожи и подкожно-жировой клетчатки [10]. *Staphylococcus aureus* также является одной из наиболее распространенных причин внутрибольничных инфекций [2]. Способность вырабатывать устойчивость к наиболее часто используемым антибиотикам и антисептикам характеризует особенность данного микроорганизма. Устойчивость бактерий к пенициллину опосредовано выработкой фермента пенициллиназы, относящегося к группе β-лактамаз [1]. Этот фермент способен разрушать β-лактамное кольцо, которое является важной частью структуры молекул многочисленных антибиотиков. В настоящее время установлено, что более 80% всех штаммов микроорганизмов, иccледованных в лабораториях, обладают полирезистентностью к антимикробным препаратам [8]. Особое значение имеет распространение стафилококков, резистентных к метициллину (или к оксациллину), и стафилококков со сниженной чувствительностью к ванкомицину [6].

Одним из факторов, повышающих устойчивость бактерий к неблагоприятному действию окружающей среды, является формирование специфически организованных биопленок на поверхности кожи. Биопленка имеет сложную архитектуру, а патогенные микроорганизмы в ее составе обладают более высокой резистентностью к действию антибактериальных препаратов [9].

Эти особенности стафилококков служат причиной существенного ограничения выбора антибактериальных препаратов для лечения инфекций, вызванных этими штаммами микроорганизмов.

В последние годы отмечается тенденция роста антибиотикорезистентных штаммов, и в современной медицине не имеется достаточно средств для сдерживания этого процесса [16].

Возможной альтернативой антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам на современном этапе представляются лечебные бактериофаги с широким спектром антимикробной активности, подавляющие как чувствительные, так и антибиотикоустойчивые штаммы бактерий [3, 15].

Следует отметить, что вирусы бактерий, активные в отношении многочисленных возбудителей гнойно-воспалительных процессов, вызывающих респираторные, кишечные и урогенитальные инфекции, известны с начала ХХ века [4, 13]. Циклы репродукции специфических бактериофагов с их накоплением в месте локализации воспалительного процесса являются важной особенностью фаготерапии, отличающей ее от применения этиотропных химиотерапевтических средств, обладающих широким антимикробным спектром и часто затрагивающих нормальную микрофлору организма хозяина [14, 17].

Для лечения стафилококковых инфекций также широко используют антибиотики различных групп. Цефтриаксон – цефалоспориновый антибиотик ІІІ поколения, который часто применяют в хирургической, гинекологической практике, а так же для лечения многих гнойно-воспалительных заболеваний кожи и подкожно-жировой клетчатки. Возможно, что комбинированное использование цефтриаксона и бактериофага повысит эффективность лечения заболеваний, этиологическим фактором которых является золотистый стафилококк.

**Цель работы.** Изучить комбинированное действие цефтриаксона и бактериофага на планктонные клетки *S. аureus* и микроорганизмы находящиеся в експериментально смоделированной биопленке в исследованиях in vitro.

**Материалы и методы.** Исследования проводили на 20 штаммах *S. aureus*, выделенных от больных с различными проявленими гнойно-воспалительных процессов кожи и подкожно-жировой клетчаки и 2-х референтных штаммах (АТСС 25923 и АТСС 6538Р) в качестве контрольной группы.

Клинические штаммы стафилококков идентифицировали в соответствии рекомендаций 12-го издания «Определение бактерий Берджи» по комплексу культуральных и биохимических свойств (STAPHY test 16 Lachema, Чехия) [7].

Для изучения комбинированого действия цефтриаксона и бактериофага на планктонные клетки и биопленки клинических изолятов и референтных штаммов *S. аurеus* использовали полистироловые планшеты для иммуно-ферментного анализа.

Чувствительность штаммов *S. аurеus* определяли к стафилококковому бактериофагу (фармацевтический завод "Биофарм" г. Белая Церковь, Украина).

Разведенную культуру *S. aureus* в концентрации соответствующей суспензии 0,5 по Мак Фарланду, вносили в лунки планшета по 100 мкл. Для отрицательного контроля использовали стерильный МПБ, в качестве положительного использовали бактериальную смесь. В лунки 1 ряда вносили 100 мкл цефтриаксона с концентрацией 257 мкг/мл. В лунки 2 ряда 100 мкл бактериофага, в лунки 3 ряда сначала вносили 100 мкл бактериофага, через 10 минут добавляли 100 мкл цефтриаксона с такой же концентрацией. Планшет инкубировали при температуре 35 °С в течение 24 часов. Жизнеспособность микроорганизмов оценивали по оптической плотности и количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) после соответствующих разведений.

С целью изучения эффективности литического действия бактериофагов и антибиотика на штаммы *S. aureus* в биопленках было проведено моделирование биопленок (с учетом рекомендаций Тец Г. В. и Романовой Ю. М.) [11, 12]. Для изучения действия бактериофагов на биопленку вносили культуру *S. aureus* с концентрацией, соответствующей стандарту мутности 0,5 по Мак Фарланду. Лунки пластикового планшета оставляли на 24 часа при 35 ºС. На следующий день отбирали содержимое лунок, промывали трехкратно фосфатным буфером. В лунки 1 ряда к образовавшейся биопленке вносили 100 мкл цефтриаксона с концентрацией 257 мкг/мл, в лунки 2 ряда – 100 мкл бактериофага, в лунки 3 ряда сначала вносили 100 мкл бактериофага, затем добавляли 100 мкл цефтриаксона с концентрацией 257 мкг/мл. Планшет инкубировали при температуре 35 °С в течение 24 часов. После действия препаратов биопленки отмывали фосфатным буфером, добавляли 50 мкл мясо-пептонного бульона (МПБ) и гомогенезировали их. Полученные результаты оценивали по количеству КОЕ/мл и показателям средней оптической плотности.

Оптическую плотность измеряли с помощью микропланшетного ридера «Multiskan EX» (тип 355) при длине волны 540 нм. Полученные значения выражали в единицах оптической плотности (ед. ОП.)

Результаты исследований обрабатывали методом вариационной статистики с помощью программы MS Excel 2003 [5].

**Результаты исследования.** По результатам проведенного исследования было установлено, что действие противомикробных средств на планктонные клетки *S. аurеus* отличалась. Так, референтные штаммы были более (р<0,05) чувствительными, чем клинические в связи с утратой их патогенных свойств.

Концентрации веществ, которые использовали для определения противомикробного действия на планктонные клетки и биопленки являются минимальными терапевтическими дозами, которые известны из источников литературы [7].

При изучении антимикробного действия цефтриаксона на планктонные клетки *S. аurеus* средняя оптическая плотность составила (0,497±0,04) ед. ОП., что показывает его высокую эффективность по сравнению с показателями в конторольных образцах – (0,835±0,06) ед. ОП. Также отмечалось снижение количества КОЕ в исследуемых образцах по сравнению с конторолем. Достаточно высокое литическое действие в отношении клинических штаммов *S. аurеus* проявлялось к действию бактериофагов. Так, показатели средней оптической плотности были на уровне (0,548±0,03) ед. ОП., что является значительно меньшими значениями в сравнени с контролем – (0,940±0,08) ед. ОП. Также наблюдалось снижение количества КОЕ в исследуемых образцах.

Наиболее высокую антимикробную эффективность в отношении штаммов золотистого стафилококка проявляла комбинация цефтриаксона и бактериофага. Показатели средней оптической плотности составили (0,312±0,06) ед. ОП., что практически в 2,6 раза ниже, чем значения контрольных образцов – (0,820±0,04) ед. ОП. При определении количества КОЕ после комбинированного действия цефтриаксона и бактериофага рост микроорганизмов не определялся (табл. 1).

Таблица 1

**Определение противомикробного действия цефтриаксона и бактериофага на планктонные клетки клинических штаммов *S. аurеus* по показателям средней оптической плотности (М±m) и КОЕ**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Противомик-робные действующие вещества  (мкг/мл) | Средняя оптическая плотность  клинических штаммов  *S. аurеus* с противомик. веществом  (ед. ОП.)  λ = 540 нм | КОЕ  на 1 мл питательной среды при посеве исслед. образцов с противомик. веществом | Контроль (питательная среда +  *S. аurеus*)  (ед. ОП.)  λ = 540 нм | КУО  на 1 мл питательной среды при посеве с контрольных образцов без противомик-робных веществ |
| Цефтриаксон | 0,497±0,04 | (2,6±0,1)×103\* | 0,835±0,06 | (3,3±0,1)×106 |
| Бактериофаг | 0,548±0,03 | (3,2±0,1)×103\* | 0,940±0,08 | (3,6±0,2)×106 |
| Цефтриаксон +  Бактериофаг | 0,312±0,06 | рост отсутствует\* | 0,820±0,04 | (3,2±0,3)×106 |

Примечание. \* – разница достоверная (р<0,05) с контролем; представлено результаты исследования 3-х повторов.

Из литературных данных известно, что концентрация антибиотиков для воздействия на бактерии в форме биопленки в отдельных случаях может быть в 10-100 раз выше, чем для планктонных форм [11]. В ходе исследования для определения антимикробного действия цефтриаксона на микроорганизмы в форме биопленки использовали концентрацию превышающую минимальную ингибирующую в 10 раз.

Анализ результатов исследования показал, что действие антимикробных препаратов на микроорганизмы в форме биопленок менее эффективно, чем на планктонные клетки (табл. 2).

Таблица 2

**Определение противомикробного действия цефтриаксона и бактериофага на биопленки клинических штаммов *S. аurеus* по показателям средней оптической плотности (М±m) и КОЕ**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Противомик-робные действующие вещества  (мкг/мл) | Средняя оптическая плотность  клинических штаммов  *S. аurеus* с противомик. веществом  (ед. ОП.)  λ = 540 нм | КОЕ  на 1 мл питательной среды при посеве исслед. образцов с противомик. веществом | Контроль (питательная среда +  *S. аurеus*)  (ед. ОП.)  λ = 540 нм | КУО  на 1 мл питательной среды при посеве с контрольных образцов без противомик-робных веществ |
| Цефтриаксон | 0,815±0,07 | (3,9±0,2)×107\* | 1,193±0,05 | (3,4±0,2)×109 |
| Бактериофаг | 1,008±0,05 | (4,1±0,3)×107\* | 1,186±0,06 | (3,6±0,1)×109 |
| Цефтриаксон +  Бактериофаг | 0,926±0,06 | (2,5±0,1)×107\* | 1,198±0,14 | (3,2±0,3)×109 |

Примечание. \* – разница достоверная (р<0,05) с контролем; представлено результаты исследования 3-х повторов.

В ходе проведеного исследования установлено, что комбинированное действие цефтриаксона и бактериофага на микроорганизмы находящиеся в биопленке приводило к снижению показателей средней оптической плотности, а также количеству КОЕ в исследуемых образцах по сравнению с контролем.

**Выводы.** Результаты проведеного исследования показали, что антибиотик цефалоспоринового ряда цефтриаксон имеет выраженное антимикробное действие в отношении клинических штаммов *S. аurеus*, о чем свидетельствует снижение оптической плотности и количества КОЕ в исследуемых образцах по сравнение с контролем. Также, высокой литической активностью обладал бактериофаг.

Наибольший противомикробный эффект наблюдался при комбинированном воздействии цефтриаксона и бактериофага на клинические штаммы золотистого стафилококка. Отмечалось снижение показателей средней оптической плотности в сравнении с контрольными образцами, при определении количества КОЕ в исследуемых образцах признаки роста микроорганизмов не наблюдались.

Кроме того, было установлено, что комбинация цефтриаксона и бактериофага оказывет противомикробное действие не только на планктонные формы золотистого стафилококка, но и на микроорганизмы мобилизированные в биопленке. Проведенный анализ результатов показал достоверное (р<0,05) снижение показателей средней оптической плотности и количества КОЕ по сравнению с контрольними образцами.

Перспективой данного исследования может стать комбинированное использование цефтриаксона и бактериофага для местного лечения гнойно-воспалительных заболеваний кожи и подкожно-жировой клетчатки этиологическим фактором, которых является золотистый стафилококк.

Список литературы

1. Бабушкина И. В. Изучение антибактериального действия наночастиц меди и железа на клинические штаммы S. aureus / И. В. Бабушкина, В. В. Бородулин, Г. В. Коршунов, Д. М. Пучиньян // Саратовский медицинский журнал. – 2010. – Т. 6. – №1. – С.9–14.
2. Калініченко С. В. Розповсюдження антибіотикорезистентних штаммів в лікувальних установах м. Харкова / С. В. Калініченко, Т. І. Антушева, С. Ю. Півненко, О. В. Голубка, Т. О. Антушева // Матеріали науково- практичної конференції «Здобутки та перспективи у боротьбі з інфекційними захворюваннями». – Харків. – 2017. – С. 91.
3. Красильников И. В. Препараты бактериофагов: краткий обзор современного состояния и перспектив развития / И. В. Красильников, К. А. Лыско, Е. В. Отрашевская, А. К. Лабастова // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – Т. 26, №2(2). – С. 33–37.
4. Крылов В. Н. Фаготерапия с точки зрения генетики бактериофага: надежды, перспективы, проблемы безопасности, ограничения / В. Н. Крылов // Генетика. – 2001. – № 7. – C. 869–87.
5. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К.: МОРИОН, 2000. – 320 с.
6. Локальный мониторинг антибиотикочувствительности / О. И. Мангуренко, Е. А. Федчун, П. В. Левчук, В. Ф. Грицай // Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2011. – Вип. XXIV, №1. – С. 126–128.
7. Наказ МОЗ України від 05.04.07 № 167 «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів». – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://mozdocs.kiev.ua>.
8. Никулин А. А. Обзор Британского общества по антимикробной химиотерапии (BSAC) по диагностике и лечению инфекций, вызванных метицилинорезистентными штамамми Staphylococcus aureus (MRSA) во внебольничных условиях / А. А. Никулин, А. В. Дехнич // Клиническая микробиологическая антимикробная химиотерапия. – 2010. – Т.12, №1. – С. 4–22.
9. Осолодченко Т. П. Вивчення впливу нових біологічно активних речовин на швидкість формування резистентності S. аureus до антибактеріальних препаратів / Т. П. Осолодченко, І. Д. Андреєва, І. С. Рябова, Г. М. Козубова, О. В. Порт // Матеріали науково-практичної конференції «Здобутки та перспективи у боротьбі з інфекційними захворюваннями». – Харків. – 2017. – С. 97.
10. Стукова Е. И. Патогенетическое значение золотистого стафилококка при атопическом дерматите / Е. И. Стукова, Ю. В. Кенисфект // Fundamental research. – 2013. – № 7. – С. 680–685.
11. Тец Г. В. Роль внеклеточной ДНК и липидов матрикса во взаимодействии бактерий биопленок с антибиотиками : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07 / Тец Георгий Викторович. – К., 2007. – 22 с.
12. Тец Г. В. Совместное действие антибиотиков и дезоксирибонуклеазы на бактерии / Г. В. Тец, К. Л. Артеменко // Антибиотики и химиотерапия. – 2006. – Т.51, №6. – С. 3–6.
13. André M. C. Phage-antibiotic synergy (PAS): β-Lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth / M. C. André, F. Tétart, S. N. Trojet, M. F. Prère, H. M. Krisch // Published: August 29, 2007. – [Електронний ресурс]. – Режим доступа: [https://doi.org/10.1371/journal.pone.00 00799](https://doi.org/10.1371/journal.pone.00%2000799).
14. Matsuzaki S. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases / S. Matsuzaki, M. Rashel, J. Uchiyama et al. // J. Infect. Chemother. – 2005. – № 11(5). – Р. 211–19.
15. Richard M. Carlton Phage therapy: past history and future prospects / M. Carlton Richard // Archivum immunologiae et therapiae experementalis. – 1999. – № 47. – P. 267-274.
16. Volyanskiy Y. L. Studying the specific activity of antimicrobial drugs / Y. L. Volyanskiy, V. P. Shirobokov, S. V. Biryukov // Guidelines. – Kyiv. – 2004. – 38 с.
17. Young R. Bacteriophage lysis: mechanism and regulation / R. Young // Microbiol Rev. – 1992. – № 56(3). – P. 430–81.