

МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 579.61

Е.В. Григорова¹, Н.М. Шабанова¹, У.М. Немченко¹, Е.Б. Ракова^{1,2}, И.Н. Данусевич¹**АНАЛИЗ ФАГО- И АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИЙ СЕМЕЙСТВА ENTEROBACTERIACEAE, ВЫДЕЛЕННЫХ У ЖЕНЩИН РЕПРОДУКТИВНОГО ВОЗРАСТА**¹ ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Россия² ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава России, Иркутск, Россия

По данным бактериологического исследования, воспалительные заболевания органов малого таза были ассоциированы с неспецифической условно патогенной микрофлорой – бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, стафилококками и энтерококками в диагностически значимой концентрации. Штаммы энтеробактерий имели высокий уровень чувствительности к антибиотикам, за исключением групп аминогликозидов и хинолонов (60,0–89,3 % чувствительных штаммов), и характеризовались низким уровнем чувствительности (0–1X) к специфическим бактериофагам – до 100 %.

Ключевые слова: энтеробактерии, антибиотики, бактериофаги, воспалительные заболевания органов малого таза

ANALYSIS OF PHAGO- AND ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF ENTEROBACTERIACEAE BACTERIA ISOLATED FROM WOMEN OF REPRODUCTIVE AGE**E.V. Grigorova¹, N.M. Shabanova¹, U.M. Nemchenko¹, E.B. Rakova^{1,2}, I.N. Danusevich¹**¹ Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia² Irkutsk State Medical University, Irkutsk, Russia

Pelvic inflammatory diseases occupy a special place in the structure of general morbidity, and are polymicrobial in nature with dominance of opportunistic microorganisms, in particular bacteria of the family *Enterobacteriaceae*.

The aim was to study the composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age with pelvic inflammatory diseases, as well as to determine the sensitivity of isolated microorganisms to antibiotics and bacteriophages.

The study included 70 women of reproductive age, among them 37 were diagnosed with colpitis and cervicitis, 33 women in the comparison group (women screened for a diagnosis). Isolated microorganisms were identified by abdominoperineal methods, including the disk diffusion method to determine the sensitivity of microorganism cultures of *Enterobacteriaceae* family to antibiotics, and the method of crosses (evaluation of lytic activity of bacteriophages by the number of crosses) to determine the sensitivity to specific therapeutic bacteriophages.

Vaginal biocenosis was characterized by deficit of lactobacilli (< 10⁶ CFU/ml in 100 %), the presence of conditionally pathogenic microflora: bacteria of *Enterobacteriaceae* family, coccal flora and *Candida* fungi. From 60.0 to 89.3 % of *Enterobacteria* strains were resistant to aminoglycosides and quinolones, but also had a low level of sensitivity to therapeutic bacteriophages.

The obtained data indicate the reduction of colonization resistance of vaginal mucosa in pelvic inflammatory diseases and specify the need to use medicinal drugs only under medical supervision to prevent clinically significant drug resistance.

Key words: *Enterobacteriaceae*, antibiotics, bacteriophages, inflammatory diseases of the pelvic organs

Воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ) занимают особое место в структуре общей заболеваемости и имеют полимикробный характер с доминированием условно патогенных микроорганизмов (УПМ), являющихся составной частью нормальной микрофлоры влагалища [10]. Предрасполагающим фактором в возникновении ВЗОМТ у женщин репродуктивного возраста (РВ) является дисбиоз влагалища, способствующий развитию восходящей инфекции, который может быть обусловлен анатомо-физиологическими особенностями женского организма, несоблюдением правил личной гигиены и т. п. [8]. По данным большинства

исследователей, наиболее частой причиной развития ВЗОМТ является кокковая и палочковая микрофлора (*Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Pneumococcus* spp., *H. influenzae*, представители семейства *Enterobacteriaceae* и рода коринебактерий). В таких случаях незаменимым оказывается бактериологическое исследование с количественным определением микроорганизмов, так как нарушение количественного соотношения бактериальных видов, приводящих к вытеснению одних микроорганизмов другими, инициирует развитие воспалительной реакции в нижних отделах мочеполовой системы [11]. Большое значение для изменения этиологической структуры

ВЗОМТ имеет антибактериальная терапия, когда под воздействием антибиотиков чувствительные к ним микроорганизмы уступают место более устойчивым. Так, например, с появлением антибиотиков, активных в отношении пенициллиноустойчивых штаммов, стафилококки в определенной степени утрачивают свое значение в инфекционной патологии, уступая место грамотрицательным микроорганизмам и неспорообразующим анаэробам, более устойчивым к широко применяемым в медицине антибиотикам [4]. В связи с этим необходимо проводить определение чувствительности к антибактериальным препаратам (АБП) и бактериофагам как альтернативным антибиотикам препаратам.

Цель работы: изучить состав микробиоты влагалища у женщин РВ с ВЗОМТ, а также определить чувствительность выделенных микроорганизмов к АБП и бактериофагам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись 2 группы женщин: первая группа – женщины РВ с диагнозами кольпит (54,1 %) и цервицит (45,9 % обследованных), установленными врачом-гинекологом ($n = 37$); вторая группа (сравнения) – женщины РВ, проходившие обследование для уточнения диагноза ($n = 33$). Бактериологическое исследование соскоба со слизистой влагалища проводилось в соответствии с требованиями Приказа № 535 Минздрава СССР от 22.04.1985. Выполненная работа не ущемляет права и не подвергает опасности благополучие субъектов исследования, осуществлена с информированного согласия пациентов, согласно Приказу Министерства Здравоохранения РФ от 19.06.2003 № 266, соответствует этическим нормам Хельсинской декларации (2008 г.). Выделенные микроорганизмы идентифицировали общепринятыми методами [9]. Для определения чувствительности культур к АБП (согласно МР «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам», 2004) использовали диско-диффузионный метод. Было протестировано 70 штаммов бактерий семейства Enterobacteriaceae к АБП следующих групп: β -лактамы (амоксциллин/

клавуланат, цефтазидим), карбопенемы (имипенем), аминогликозиды (амикацин), хинолоны (левофлоксацин), и группе фосфоновых кислот (фосфомицин) производства ЗАО НИЦФ (г. Санкт-Петербург) и ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Литическую активность специфических бактериофагов в отношении энтеробактерий определяли с использованием коммерческих препаратов – колипротейного бактериофага, фага «Интести», очищенного бактериофага клебсиелл пневмонии, очищенного бактериофага клебсиелл поливалентного и пиобактериофага поливалентного «Секста» производства НПО «Микроген» (г. Пермь). Оценку чувствительности проводили методом «крестов», согласно методическим указаниям [1]. Для статистической обработки результатов использовали пакет прикладных программ Statistica v. 6.1, Microsoft Excel 2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В вагинальном биоценозе женщин обеих групп был выявлен микробиологический дисбаланс, характеризующийся в 100 % случаев дефицитом лактобацилл (концентрация $< 10^6$ КОЕ/мл) и наличием УПМ семейства Enterobacteriaceae в диагностически значимых концентрациях (табл. 1). По рейтингу встречаемости УПМ из семейства Enterobacteriaceae на первом месте были виды *E. coli*, том числе гемолитические варианты (в группе 1 – в $12,5 \pm 6,8$ % случаев, в группе сравнения – $21,4 \pm 7,8$ %), *Klebsiella pneumoniae* и *Enterobacter aerogenes* (рис. 1).

На фоне дефицита лактобацилл и высокой концентрации бактерий семейства Enterobacteriaceae у обследованных женщин выделялись также и другие представители УПМ. В первой группе женщин при выделении *E. coli* наиболее часто регистрировали коагулазо-отрицательные стафилококки (КОС) и *Enterococcus* spp. – в $29,2 \pm 9,3$ % случаев, в два раза реже – грибки рода *Candida* ($12,5 \pm 6,8$ %) и *S. aureus* ($8,3 \pm 5,6$ %). При выделении *K. pneumoniae* в группе 1 выявляли *S. aureus* и *Enterococcus* spp. – в $12,5 \pm 11,7$ % случаев.

В группе сравнения при выделении *E. coli* в два раза чаще, по сравнению с первой группой, встре-

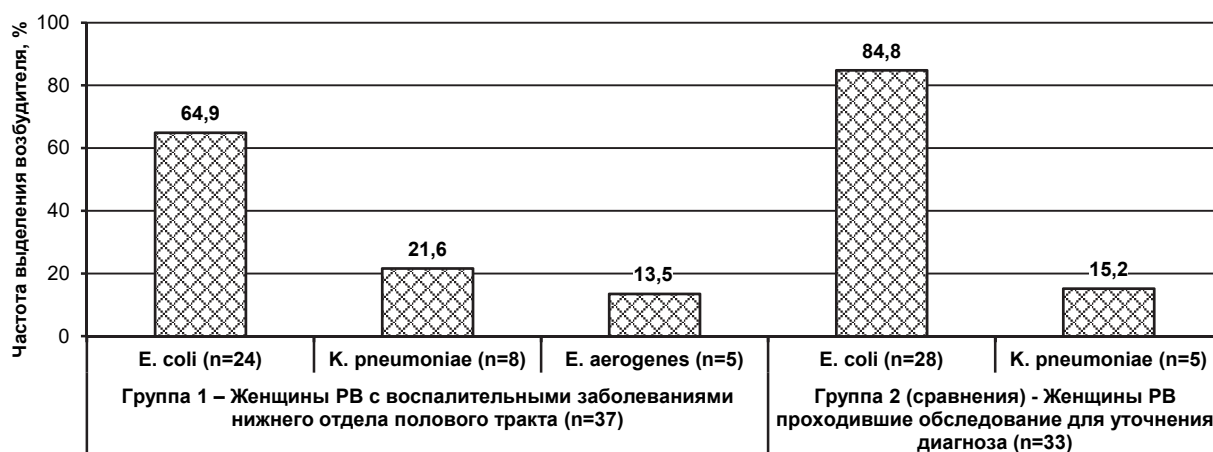


Рис. 1. Выделение штаммов бактерий семейства Enterobacteriaceae в вагинальном биотопе женщин репродуктивного возраста.

чались энтерококки – 46,4 ± 9,4 %, при выделении *K. pneumoniae* у четверти штаммов энтеробактерий (20,0 ± 17,9 %) регистрировали микроорганизмы-ассоцианты – *S. aureus* и *Candida* spp.

Таким образом, при ВЗОМТ у женщин РВ происходит снижение концентрации лактобацилл, подавляющих при нормальном содержании, рост условно патогенных микроорганизмов за счёт синтеза молочной кислоты, поддерживающей кислую рН среды, бактериоцинов и перекиси водорода. При таких нарушениях основными этиологическими агентами заболевания являются условно патогенные микроорганизмы [3].

Современные подходы к лечению воспалительных заболеваний влагалища принципиально не отличаются от таковых при специфических инфекционных процессах. Так, при цервицитах не только допускается, а в некоторых случаях – просто необходима антибактериальная терапия [7, 10].

Проведённый анализ показал, что чувствительными к левофлоксацину, цефтазидиму, имипенему и фосфомицину были почти 100 % штаммов исследуемых нами бактерий семейства Enterobacteriaceae, выделенных у женщин группы 1. К амоксициллину были чувствительны 100 % штаммов *K. pneumoniae*, 33,3 % штаммов *E. coli*. К амикацину (группа аминогликозидов) были чувствительны 66,7 % штаммов *E. coli* и 75 % штаммов *K. pneumoniae*. В группе сравнения чувствительными к АБП были практически все штаммы выделенных энтеробактерий, за исключением группы аминогликозидов и хинолонов: к амикацину – 89,3 % штаммов *E. coli*, к левофлоксацину – 89,3 %

штаммов *E. coli* и 60,0 % штаммов *K. pneumoniae* [5]. Данный факт может свидетельствовать о появлении резистентности у штаммов *E. coli* на догоспитальном этапе. Резистентность к фторхинолонам штаммов энтеробактерий группы сравнения опосредуется аминокислотными заменами в бактериальных ферментах, приводящими к накоплению мутаций и снижению активности фторхинолонов. Гены ферментов локализованы на хромосоме, следовательно, распространение резистентности происходит преимущественно на фоне мощного селективного пресинга антимикробными препаратами, поэтому есть хорошая возможность, не дожидаясь распространения клинически значимой устойчивости, проводить комплекс мероприятий по ограничению применения хинолонов на догоспитальном этапе [2].

Анализ фагочувствительности показал, что штаммы энтеробактерий в целом имели умеренный и низкий уровень чувствительности к специфическим лечебным бактериофагам (табл. 1).

Развитие резистентности к определённой расе фага в основном отражает потерю микробом специфического рецептора в результате мутации, и эта потеря часто оказывает отрицательное действие на саму бактерию, не защищая ее от многих других фагов, использующих иные рецепторы. Бактерии не имеют общих механизмов устойчивости к антибиотикам и фагам, следовательно, в тяжёлых случаях могут применяться комбинации «антибиотик + бактериофаг», что особенно эффективно для разрушения микробных биопленок, характерных для энтеробактерий [6].

Таблица 1

Характеристика чувствительности штаммов энтеробактерий к специфическим лечебным бактериофагам, %

Уровень чувствительности штаммов <i>E. coli</i> к бактериофагам						
Активность бактериофага	Группа 1 (n = 24)			Группа 2 (n = 28)		
	БКП	БИ	СФ	БКП	БИ	СФ
0-1X	58,3 ± 10,0	75,0 ± 8,8	25,0 ± 8,8	46,4 ± 9,4	35,7 ± 9,1*	35,7 ± 9,1
2X	25,0 ± 8,8	25,0 ± 8,8	25,0 ± 8,8	7,2 ± 4,8	28,6 ± 8,5	28,6 ± 8,5
3-4X	16,7 ± 7,6	0	50,0 ± 10,2	46,4 ± 9,4*	35,7 ± 9,1*	35,7 ± 9,1
Уровень чувствительности штаммов <i>K. pneumoniae</i> к бактериофагам						
Активность бактериофага	Группа 1 (n = 8)			Группа 2 (n = 5)		
	БПВ	БКЛП	СФ	БПВ	БКЛП	СФ
0-1X	50,0 ± 17,7*	50,0 ± 17,7*	50,0 ± 17,7*	100	100	100
2X	50,0 ± 17,7	50,0 ± 17,7	0	0	0	0
3-4X	0	0	50,0 ± 17,7	0	0	0
Уровень чувствительности штаммов <i>E. aerogenes</i> к бактериофагам						
Активность бактериофага	Группа 1 (n = 5)					
	БИ			СФ		
0-1X	100			0		
2X	0			100		
3-4X	0			0		

Примечание: БКП – бактериофаг колипротейный; БИ – бактериофаг интести; СФ – секстафаг; БПВ – бактериофаг поливалентный; БКЛП – бактериофаг клебсиелл пневмоний; * – различия статистически значимы при $p \leq 0,05$.

Полученные нами данные показывают, что на фоне присутствия бактерий семейства Enterobacteriaceae, при дефицитном состоянии лактобацилл, независимо от диагноза, происходит увеличение микробной плотности УПМ – *S. aureus*, *Enterococcus* spp. и грибов рода *Candida*, что свидетельствует о снижении колонизационной резистентности слизистой оболочки влагалища. В этой связи необходимо усиливать облигатную часть влагалищной микробиоты с помощью сочетанного применения про- и пребиотиков для создания колонизационной резистентности, а при необходимости – использовать АБП.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Асланов Б.И., Зуева Л.П., Кафтырева Л.А., Бойцов А.Г., Акимкин В.Г., Долгий А.А., Брусина Е.Б., Дроздова О.М. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике. Федеральные клинические методические рекомендации. – М., 2014. – 20 с.

Aslanov BI, Zueva LP, Kaftyreva AL, Boytsov AG, Akimkin VG, Dolgiy AA, Brusina EB, Drozdova OM (2014). Rational use of bacteriophage in medical and anti-epidemic practice. Federal clinical guidelines [Ratsional'noe primeneniye bakteriofagov v lechebnoy i protivoepidemicheskoy praktike. Federal'nye klinicheskie metodicheskie rekomendatsii], 20.

2. Бачинская Е.Н. Возбудители внебольничных пневмоний на пороге нового тысячелетия // Антибиотики и химиотерапия. – 2000. – № 11. – С. 21–28.

Bachinskaya EN (2000). Causative agents of community-acquired pneumonia at the turn of a new millennium [Vozbuditeli vnebol'nichnykh pnevmoniy na poroge novogo tysyacheletiya]. *Antibiotiki i khimioterapiya*, (11), 21-28.

3. Бурменская О.В., Байрамова Г.Р., Непша О.С., Трофимов Д.Ю., Муравьева В.В., Абакарова П.Р., Стрельченко Д.А., Кряжева В.С., Сухих Г.Т. Видовой состав лактобактерий при неспецифических вагинитах и бактериальном вагинозе и его влияние на локальный иммунитет. // Акушерство и гинекология. – 2014. – № 1. – С. 41–45.

Burmenskaya OV, Bayramova GR, Nepsha OS, Trofimov DY, Muraveva VV, Abakarova PR, Strelchenko DA, Kryazheva VS, Sukhikh GT (2014). Species composition of lactic acid bacteria in nonspecific vaginitis and bacterial vaginosis and its effect on local immunity [Vidovoy sostav laktobakteriy pri nespetsificheskikh vaginitakh i bakterial'nom vaginoze i ego vliyanie na lokal'nyu immunitet]. *Akusherstvo i ginekologiya*, (1), 41-45.

4. Воропаева С.Д. Этиология, патогенез и антибактериальная терапия воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин // Consilium medicum. – 2008. – № 1. – С. 25–31.

Voropaeva SD (2008). Etiology, pathogenesis, and antimicrobial therapy of inflammatory diseases of the pelvic organs in women [Etiologiya, patogenez i antibakterial'naya terapiya vospalitel'nykh zabolovaniy organov malogo taza u zhenshchin]. *Consilium medicum*, (1), 25-31.

5. Желдакова Р.А. Механизмы биосинтеза антибиотиков и их действие на клетки микроорганизмов:

Учеб.-метод. комплекс для студентов специальности 1-31.01.01 «Биология». – Мн.: БГУ, 2004. – 111 с.

Zheldakova RA (2004). Mechanisms of antibiotic biosynthesis and their effect on the cells of microorganisms: teaching materials for students [Mekhanizmy biosinteza antibiotikov i ikh deystvie na kletki mikroorganizmov: Ucheb.-metod. kompleks dlya studentov spetsial'nosti 1-31.01.01 «Biologiya»], 111.

6. Захаренко С.М. Бактериофаги: современные аспекты применения, перспективы на будущее // Медицинский совет. – 2013. – № 10. – С. 72–74.

Zakharenko SM (2013). Bacteriophage: modern aspects of the application, prospects for the future [Bakteriofagi: sovremennyye aspekty primeneniya, perspektivy na budushchee]. *Meditsinskiy sovet*, (10), 72-74.

7. Мингалёва В.В., Абрамашвили Ю.Г., Метелёва Н.С. Сравнительный анализ характеристик хронического цервицита шейки матки у женщин репродуктивного возраста // Кубанский научный медицинский вестник. – 2015. – № 6 (55). – С. 82–89.

Mingaleva VV, Abramishvili YG, Meteleva NS (2015) Comparative analysis of the characteristics of chronic cervicitis in women of reproductive age [Sravnitel'nyy analiz kharakteristik khronicheskogo tservitsita sheyki matki u zhenshchin reproduktivnogo vozrasta]. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik*, (6), 82-89.

8. Мясоедова С.С., Леванова Л.А., Подонина Н.М. Этиология и патогенез воспалительных заболеваний репродуктивного тракта женщин // Медицина в Кузбассе. – 2010. – № 1. – С. 16–19.

Myasoedova SS, Levanova LA, Podonina NM (2010). Etiology and pathogenesis of inflammatory diseases of women's reproductive tract [Etiologiya i patogenez vospalitel'nykh zabolovaniy reproduktivnogo trakta zhenshchin]. *Meditsina v Kuzbasse*, (1), 16-19.

9. Попкова С.М., Ракова Е.Б., Храмова Н.Е., Данусевич И.Н., Шабанова Н.М., Сердюк Л.В., Немченко У.М., Иванова Е.И. Микроэкологические сочетания вагинального и кишечного биотопов у женщин с воспалительными заболеваниями нижнего этажа полового тракта и девочек-подростков с дисфункцией яичников // Сибирский научный медицинский журнал. – 2013. – № 4, Т. 33. – С. 77–84.

Popkova SM, Rakova EB, Khramova NE, Danusevich IN, Shabanova NM, Serdyuk LV, Nemchenko UM, Ivanova EI (2013). Microecological combination of vaginal and intestinal biotopes in women with inflammatory diseases of the lower floor of the genital tract and in adolescent girls with ovarian dysfunction [Mikroekologicheskie sochetaniya vaginal'nogo i kischechnogo biotopov u zhenshchin s vospalitel'nyimi zabolovaniyami nizhnego etazha polovogo trakta i devochek-podrostkov s disfunktsiey yaichnikov]. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*, 33 (4), 77-84.

10. Потатуркина-Нестерова Н.И., Мясникова А.В., Немова И.С., Волгина Т.И. Характеристика микробиоты влагалища при воспалительных заболеваниях внутренних половых органов // Успехи современного естествознания. – 2010. – № 5. – С. 66.

Potaturkina-Nesterova NI, Myasnikova AV, Nemova IS, Volgina TI (2010) Characteristics of vaginal microbiota at inflammatory diseases of internal genital organs [Kharakteristika mikrobioty vlagalishcha pri vospalitel'nykh

zabolevaniyakh vnutrennikh polovykh organov]. Uspekhi sovremennoego estestvoznaniya, (5), 66.

11. Рахматулина М.Р., Шаталова А.Ю. Современные представления о микробиоценозе вагинального биотопа и его нарушениях у женщин репродуктивного возраста // Вестник дерматологии и венерологии. – 2009. – № 3. – С. 38–42.

Rakhmatulina MR, Shatalova AY (2009). Modern ideas about microbiocenosis of vaginal biotope and its disorders in women of reproductive age [Sovremennye predstavleniya o mikrobiotsenoze vaginal'nogo biotopa i ego narusheniyakh u zhenshchin reproduktivnogo vozrasta]. *Vestnik dermatologii i venerologii*, (3), 38-42.

Сведения об авторах Information about the authors

Григорова Екатерина Владимировна – младший научный сотрудник ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16; тел.: 8 (3952) 33-34-41; e-mail: buxarowa.ekaterina@yandex.ru)
Grigороva Ekaterina Vladimirovna – Junior Research Officer of Scientific Centre of Family Health and Human Reproduction Problems (664025, Irkutsk, Timiryazev str., 16; tel.: +7 (3952) 33-34-41; e-mail: buxarowa.ekaterina@yandex.ru)

Немченко Ульяна Михайловна – кандидат биологических наук, научный сотрудник ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (e-mail: umnemch@mail.ru)

Nemchenko Ulyana Mikhailovna – Candidate of Biological Sciences, Research Officer of Scientific Centre of Family Health and Human Reproduction Problems (e-mail: umnemch@mail.ru)

Ракова Елена Борисовна – научный сотрудник лаборатории микробиома и микроэкологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»

Rakova Elena Borisovna – Research Officer of the Laboratory of Microbiome and Microecology of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems

Данусевич Ирина Николаевна – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории гинекологической эндокринологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»

Danusevich Irina Nikolaevna – Doctor of Medical Sciences, Senior Research Officer of the Laboratory of Gynecological Endocrinology of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems