

УДК 615.33
DOI: 10.26456/vtbio360

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ КОЖНОЙ МИКРОФЛОРЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

Ю.С. Болдырева, М.Н. Петушков
Тверской государственной университет, Тверь

Описаны результаты анализа чувствительности к антибиотикам кожной микрофлоры лабораторной мыши. Был изучен количественный и качественный состав микробиоты кожи животных, проведены анализы чувствительности к различным антибиотикам диско-диффузным методом наиболее распространенных видов выделенных микроорганизмов.

Ключевые слова: чувствительность к антибиотикам, микрофлора кожи, диско-диффузный метод.

Введение. Благодаря прямому контакту с внешней средой микробиота кожи имеет большое видовое разнообразие микроорганизмов, которые играют важную роль в поддержании здоровья кожи и защите ее от патогенов (Grice, Segre, 2011). В состав микробиоценоза кожи входят различные виды грибков, вирусов, бактерий и других организмов (Никифоров, 2000).

Антибиотические препараты широко используются для лечения заболеваний, вызванных микроорганизмами. Такое лечение может негативно сказываться на всей микрофлоре организма в целом (Адаскевич, 1989).

В последние годы научное сообщество все чаще обращает внимание на проблему развития устойчивости бактерий к различным группам антибиотиков. Необходимо изучать восприимчивость микроорганизмов к антибиотическим препаратам для выявления резистентности (устойчивости), открытия новых методов анализа и лечения инфекционных заболеваний и разработки альтернативных препаратов.

Целью нашей работы был анализ чувствительности к антибиотикам кожной микрофлоры лабораторных животных.

Методика. Материалом исследования выступили микроорганизмы, выделенные с кожных покровов линейных лабораторных мышей BALB/C. В исследовании были использованы мыши-альбиносы в количестве 3 шт., примерно одного веса (24, 26 и 28г), одного возраста (8 недель), одного пола (самцы). Животные содержались в одинаковых условиях влажности, температуры,

освещения; питание у всех животных идентичное – коммерческий гранулированный корм для мышей.

Исследование проходило в следующей последовательности:

1. Смыв с кожных покровов животных.
2. Высев смывного материала на питательную среду с разведением.
3. Термостатирование.
4. Подсчет и идентификация колоний на питательной среде после термостатирования.
5. Выведение чистых культур часто встречающихся микроорганизмов.
6. Приготовление суспензий микроорганизмов.
7. Определение чувствительности к антибиотикам выделенных чистых культур микроорганизмов диско-диффузным методом.
8. Интерпретация результатов.

Смыв с кожных покровов животных

Взятие смывов осуществлялось согласно МР 4.2.0220-20. Стерильной салфеткой 5*5 см, увлажненной пептонной водой, брался смыв с кожных покровов животных (у каждого из животных по 100 см²): с тела, в межпальцевом пространстве, с поверхности мордочки, ушей, лапок и т.д.

Высев смывного материала на питательную среду с разведением

Осуществление разведений проводилось с целью снижения количества микроорганизмов на единицу объема, позволяющих после инкубации подсчитывать колонии на плотном питательном агаре (так как изначально была неизвестна микробная нагрузка). Разведение проводилось до 10⁻³. Далее из каждого разведения 1,0 см³ жидкости перемещали в чашку Петри и заливали расплавленным питательным агаром (МПА – мясо-пептонный агар) – глубинный посев по ГОСТ 26670-91. Чашки помещали в термостат при температуре 35±1°С. Подсчет колоний производили через 24 часа.

Идентификация колоний микроорганизмов осуществлялась с помощью системы матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролетной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS), являющейся одной из самых современных систем идентификации микроорганизмов.

Выведение чистых культур необходимых микроорганизмов для исследования чувствительности к антибиотикам осуществляли методом истощающего штриха – высев бактериологической петлей из накопительной культуры первичного посева на поверхность агаризованной среды МПА в чашках Петри.

Далее готовился инокулом из выведенной чистой агаровой культуры микроорганизмов и отбор нескольких четко изолированных

колоний, выросших на МПА. Осуществлялся перенос незначительного количества материала с вершук колоний в пробирку со стерильным питательным бульоном, с целью доведения плотности инокулюма точно до 0,5 по стандарту МакФарланда (суспензия содержала примерно $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл). Полученный инокулюм переносился пипеткой на поверхность питательного агара Мюллера–Хинтон в объеме 1 мл, равномерно распределялся по поверхности среды и подсушивался, затем на среду наносились диски с антибиотиками, пробирки перемещались в термостат и инкубировались при температуре $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Через 24 часа изучались и интерпретировались результаты инкубирования.

Определение чувствительности микроорганизмов диско-диффузным методом проводили согласно методическим указаниям МУК 4.2.1890-04.

Результаты и обсуждение. В результате анализа поверхности кожи лабораторной мыши площадью 100 см^2 при подсчете суточных колоний в разведениях было обнаружено: 170 КОЕ в разведении 10^{-1} , 31 КОЕ в разведении 10^{-2} и 4 КОЕ в разведении 10^{-3} . Для определения общего количества бактерий, содержащихся на поверхности исследуемых участков кожи, количество колоний было домножено на соответствующий коэффициент (при разведении 10^{-1} количество колоний было домножено на 10, 10^{-2} – на 100 и т.д.), далее подсчитано среднее арифметическое всех обнаруженных КОЕ: $(1700 + 3100 + 4000) / 3 = 2933$ микроорганизма обитает на поверхности 100 см^2 кожи мыши, что соответствует 29,33 микроорганизмам на 1 см^2 поверхности кожи.

Видовой и количественный состав

В посеве исходного разведения было обнаружено 170 колоний микроорганизмов, относящихся к 9 семействам (7 семейств бактериальной флоры и 2 семейства грибковой – рис.1): *Staphylococcaceae* (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*); *Streptococcaceae* (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Lactococcus lactis*); *Propionibacteriaceae* (*Cutibacterium acnes*); *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas aeruginosa*); *Corynebacteriaceae* (*Corynebacterium jeikeium*), *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*), *Micrococcaceae* (*Micrococcus luteus*) – бактериальная микрофлора; *Malasseziaceae* (*Malassezia furfur*), *Saccharomycetaceae* (*Candida albicans*) – грибковая микрофлора.

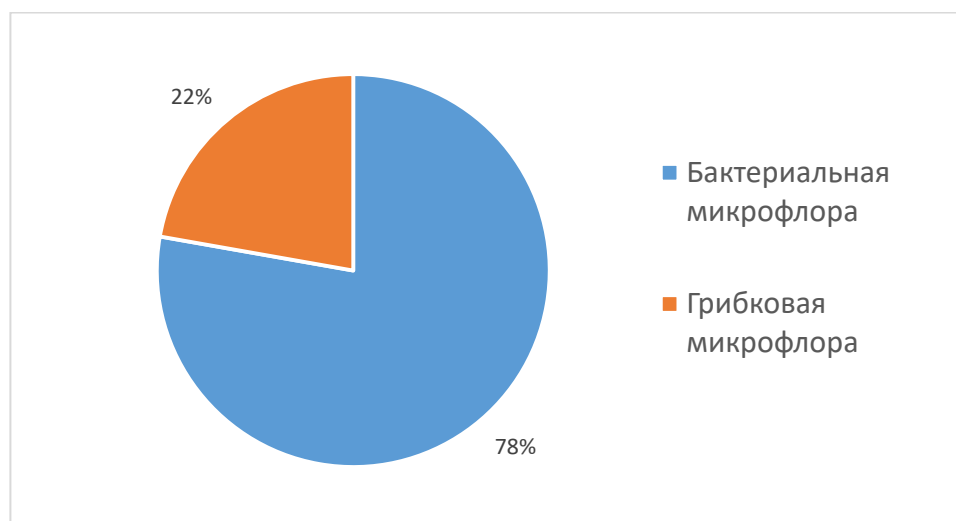


Рис. 1. Состав микрофлоры кожи лабораторных мышей



Рис. 2. Качественный и количественный состав микробиоты кожи лабораторных мышей

При изучении видового состава микробиома кожных покровов мыши площадью 10 см² было обнаружено: *Staphylococcus epidermidis* – 87 КОЕ, *Staphylococcus aureus* – 9 КОЕ, *Staphylococcus hyicus* – 18 КОЕ, *Streptococcus mitis* – 24 КОЕ, *Streptococcus pyogenes* – 9 КОЕ, *Streptococcus salivarius* – 15 КОЕ, *Lactococcus lactis* – 15 КОЕ, *Cutibacterium acnes* – 30 КОЕ, *Pseudomonas aeruginosa* – 15 КОЕ, *Corynebacterium jeikeium* – 21 КОЕ, *Escherichia coli* – 18 КОЕ,

Micrococcus luteus – 18 КОЕ, *Malassezia furfur* – 9 КОЕ, *Candida albicans* – 3 КОЕ (рис. 2).

Чувствительность к антибиотикам. Для определения чувствительности к антибиотикам были выбраны наиболее часто встречающиеся на поверхности кожи мыши микроорганизмы: *Staphylococcus epidermidis* (87 КОЕ), *Streptococcus mitis* (24 КОЕ), *Cutibacterium acnes* (30 КОЕ). Согласно МУК 4.2.1890-04 в качестве антибиотиков были выбраны препараты первого ряда для тестирования различных видов микроорганизмов, а также антибиотики, к которым у выше перечисленных микроорганизмов имеется природная чувствительность (бензилпенициллин, тетрациклин, эритромицин, рифампицин, офлоксацин, линкомицин, ципрофлоксацин, амикацин, ванкомицин, норфлоксацин, клиндамицин, кларитромицин). После выделения с первичного посева чистых культур микроорганизмов проводилось определение чувствительности к антибиотикам *диско-диффузным методом*. Интерпретация полученных нами результатов осуществлялась в соответствии с критериями, приведенными в рекомендациях Института клинических и лабораторных стандартов США (The Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI), Европейского комитета по определению чувствительности к антибактериальным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST), а также в соответствии с МУК 4.2.1890-04.

Чувствительность *Staphylococcus epidermidis*. Анализ антибиотикограмм выделенной чистой культуры микроорганизма *Staphylococcus epidermidis* представлен в таблице 1, а также на рис. 3.

В отношении большинства антибиотиков выделенный с кожи лабораторной мыши *Staphylococcus epidermidis* оказался чувствительным (к 10 антибиотикам) и резистентным к 2 антибактериальным препаратам (АБП): бета-лактамному антибиотику бензилпенициллину (диаметр зоны задержки роста составил 13 мм, зона задержки роста резистентных штаммов по МУК 4.2.1890-04 – менее 28 мм), а также к ванкомицину (диаметр зоны задержки роста составил 12 мм, причем зона задержки роста чувствительных штаммов по МУК 4.2.1890-04 – более 15 мм), рис.4. Резистентность стафилококков к β -лактамным антибиотикам обусловлена генетической мутацией (Литусов, 2016).

Таблица 1

Чувствительность *Staphylococcus epidermidis* лабораторной мыши к антибиотикам

| Наименование антибиотика, содержание в диске | Фактический диаметр зон задержки роста <i>Staphylococcus epidermidis</i> , мм | Диаметр зон задержки роста чувствительных штаммов <i>Staphylococcus</i> spp., мм (по МУК 4.2.1890-04) |
|--|---|---|
| Бензилпенициллин (10 ЕД) | 13 | ≥ 29 |
| Тетрациклин (30 мкг) | ≥ 30 | ≥ 19 |
| Эритромицин (15 мкг) | ≥ 30 | ≥ 23 |
| Рифампицин (5 мкг) | ≥ 30 | ≥ 20 |
| Офлоксацин (5 мкг) | ≥ 30 | ≥ 16 |
| Линкомицин (15 мкг) | ≥ 30 | ≥ 21 |
| Ципрофлоксацин (5 мкг) | ≥ 30 | ≥ 21 |
| Амикацин (30 мкг) | ≥ 30 | ≥ 17 |
| Ванкомицин (30 мкг) | 12 | ≥ 15 |
| Норфлоксацин (10 мкг) | ≥ 30 | ≥ 17 |
| Клиндамицин (2 мкг) | 29 | ≥ 21 |
| Кларитромицин (15 мкг) | ≥ 30 | ≥ 18 |



Рис. 3. Чувствительность *Staphylococcus epidermidis* лабораторной мыши к антибиотикам

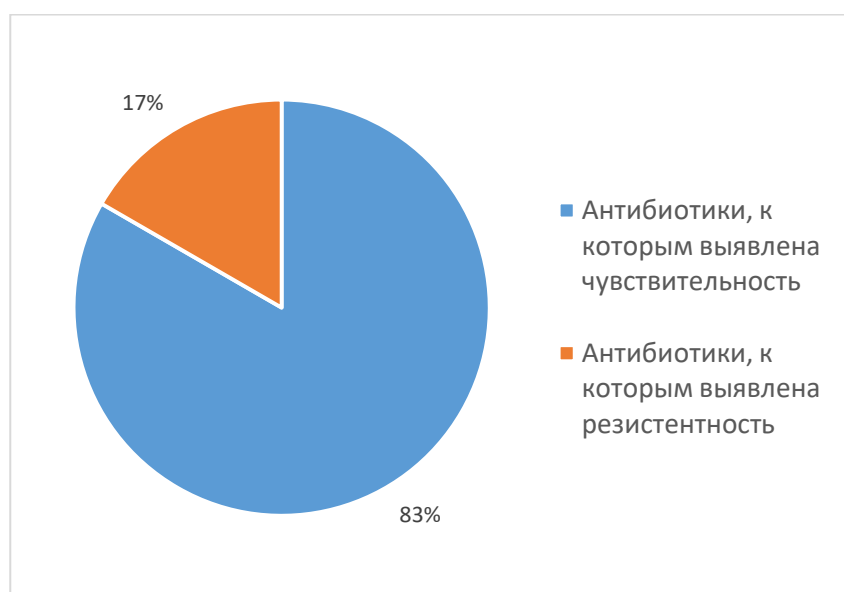


Рис. 4. Анализ чувствительности *Staphylococcus epidermidis* лабораторной мыши к антибиотикам

Чувствительность *Streptococcus mitis*. Анализ антибиотикограмм выделенной чистой культуры микроорганизма *Streptococcus mitis* представлен в таблице 2 и рис. 5.

Таблица 2

Чувствительность *Streptococcus mitis* лабораторной мыши к антибиотикам

| Наименование антибиотика, содержание в диске | Фактический диаметр зон задержки роста <i>Streptococcus mitis</i> , мм | Диаметр зон задержки роста чувствительных штаммов <i>Streptococcus</i> spp., мм (по МУК 4.2.1890-04 и стандарту EUCAST) |
|--|--|---|
| Бензилпенициллин (10 ЕД) | 17 | ≥ 28 |
| Тетрациклин (30 мкг) | 25 | ≥ 23 |
| Эритромицин (15 мкг) | 23 | ≥ 21 |
| Рифампицин (5 мкг) | 30 | ≥ 20 |
| Офлоксацин (5 мкг) | 20 | ≥ 16 |
| Линкомицин (15 мкг) | 30 | ≥ 21 |
| Ципрофлоксацин (5 мкг) | 30 | ≥ 21 |
| Амикацин (30 мкг) | 10 | ≥ 21 |
| Ванкомицин (30 мкг) | 19 | ≥ 17 |
| Норфлоксацин (10 мкг) | 30 | ≥ 21 |
| Клиндамицин (2 мкг) | 21 | ≥ 19 |
| Кларитромицин (15 мкг) | 26 | ≥ 21 |

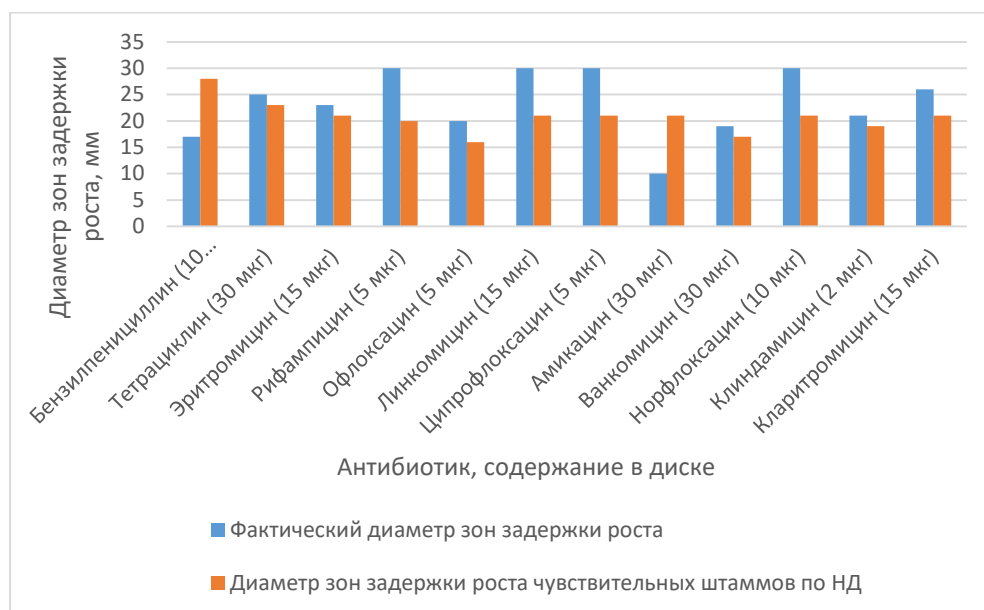


Рис. 5. Чувствительность *Streptococcus mitis* лабораторной мыши к антибиотикам

В отношении большинства антибиотиков выделенный с кожи лабораторной мыши *Streptococcus mitis* оказался чувствительным (к 10 антибиотикам) и резистентным к 2 АБП: бета-лактаму антибиотику бензилпенициллину (диаметр зоны задержки роста составил 17 мм, зона задержки роста резистентных штаммов по МУК 4.2.1890-04 – менее 19 мм), а также к амикацину (у группы зеленеющих стрептококков наблюдается природная резистентность к аминогликозидам, что подтвердилось нашим исследованием) – диаметр зоны задержки роста составил 10 мм, причем зона задержки роста чувствительных штаммов по нормативной документации – более 21 мм), рис. 6.

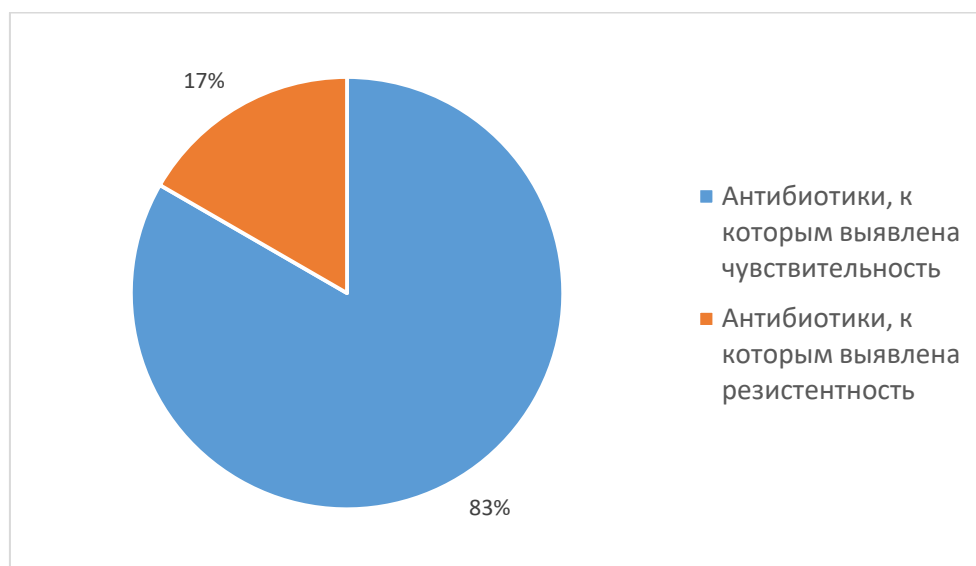


Рис. 6. Анализ чувствительности *Streptococcus mitis* лабораторной мыши к антибиотикам

Чувствительность *Cutibacterium acnes*. Анализ антибиотикограмм выделенной чистой культуры микроорганизма *Streptococcus mitis* представлен в таблице 3 и рис.7.

Таблица 3

Чувствительность *Cutibacterium acnes* лабораторной мыши к антибиотикам

| Наименование антибиотика, содержание в диске | Фактический диаметр зон задержки роста <i>Cutibacterium acnes</i> , мм | Диаметр зон задержки роста чувствительных штаммов, мм (по МУК 4.2.1890-04 и EUCAST) |
|--|--|---|
| Бензилпенициллин (10 ЕД) | ≥ 30 | ≥ 29 |
| Тетрациклин (30 мкг) | 10 | ≥ 20 |
| Эритромицин (15 мкг) | ≥ 30 | ≥ 23 |
| Рифампицин (5 мкг) | 10 | ≥ 20 |
| Офлоксацин (5 мкг) | 25 | ≥ 21 |
| Линкомицин (15 мкг) | 28 | ≥ 21 |
| Ципрофлоксацин (5 мкг) | 23 | ≥ 21 |
| Амикацин (30 мкг) | 26 | ≥ 17 |
| Ванкомицин (30 мкг) | 20 | ≥ 15 |
| Норфлоксацин (10 мкг) | ≥ 30 | ≥ 21 |
| Клиндамицин (2 мкг) | ≥ 30 | ≥ 21 |
| Кларитромицин (15 мкг) | ≥ 30 | ≥ 21 |

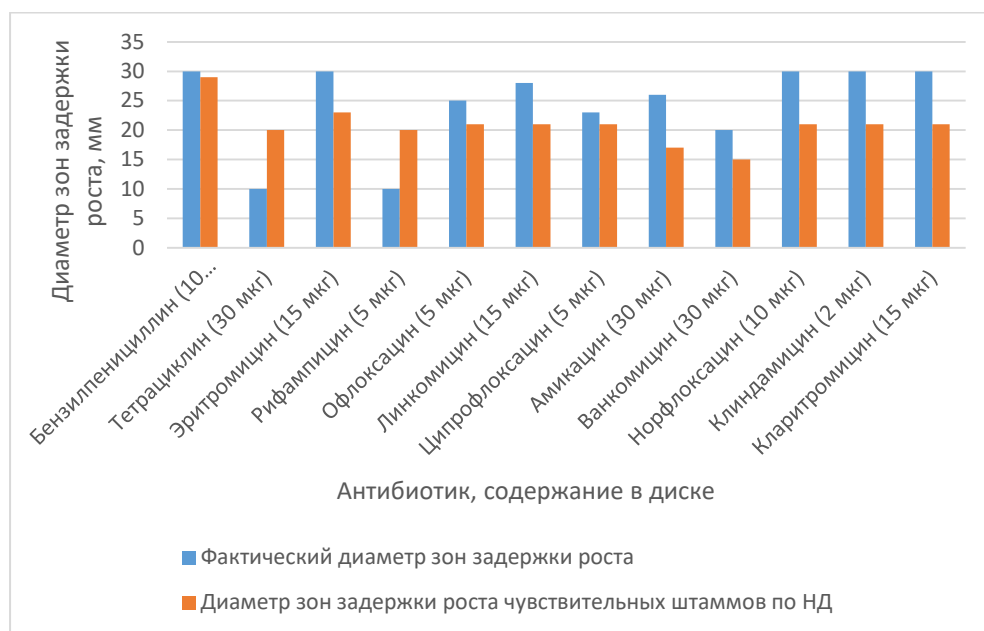


Рис. 7. Чувствительность *Cutibacterium acnes* лабораторной мыши к антибиотикам

В отношении большинства антибиотиков выделенный с кожи лабораторной мыши *Cutibacterium acnes* оказался чувствительным (к 10 антибиотикам) и резистентным к 2 АБП: тетрациклину (диаметр зоны задержки роста составил 10 мм, зона задержки роста резистентных штаммов по нормативной документации – менее 20 мм), а также к рифампицину – диаметр зоны задержки роста составил 10 мм, причем зона задержки роста чувствительных штаммов по нормативной документации – более 20 мм), рис.8.

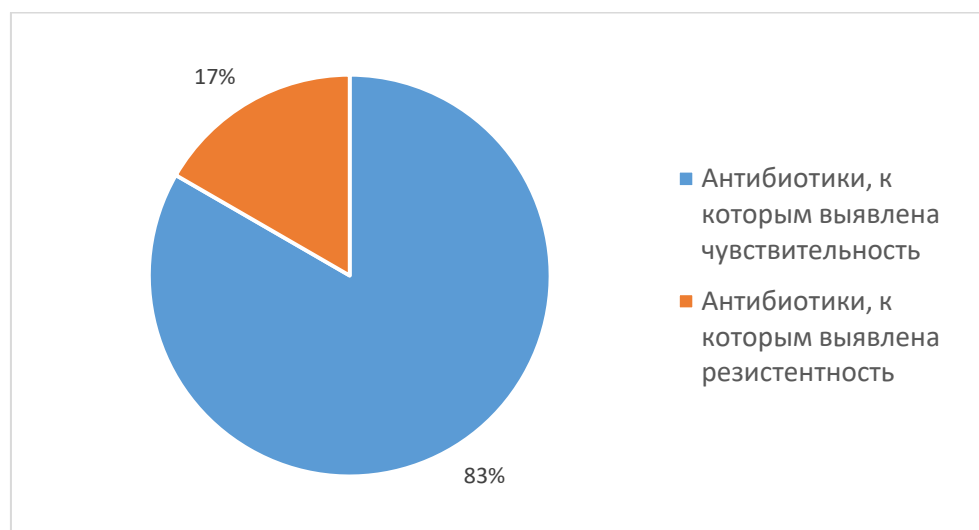


Рис. 8. Анализ чувствительности *Cutibacterium acnes* лабораторной мыши к антибиотикам

Заключение. Антибиотикорезистентность – естественный биологический процесс и глобальная проблема. Сейчас мы живем в мире, где антибиотикорезистентность быстро распространяется и растет число жизненно необходимых препаратов, которые становятся неэффективными. Необходимо изучать чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам для поиска наиболее действующего антибиотика против определенного микроорганизма; стремиться к оптимальному решению указанных задач, максимально используя возможные пути решения проблемы устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

Список литературы

- Адаскевич В.П. 2000. Акне и розацеа. СПб. С. 94-97 с.
- ГОСТ 26670-91. Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов. Применяется с 01.01.1993. М. 8 с.
- Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам. Таблицы пограничных значений для интерпретации значений МПК и диаметров зон подавления роста. Версия 10.0, 2020. URL: <http://www.eucast.org>.
- МР 4.2.0220-20. Методы санитарно-бактериологического исследования микробной обсемененности объектов внешней среды. Методические рекомендации от 04.12.2020. М. 15 с.
- МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания по методам

контроля от 04.03.2004. М. 93 с.

Никифоров В.А., Шкарин В.В. 2000. Медицинская микробиология (общие и эколого-эпидемиологические аспекты). Н. Новгород: Изд-во Нижегородской гос. мед. академии. 248 с.

Grice E.A., Segre J.A. 2011. The skin microbiom // *Nat. Rev. Microbiol.* 2011. V. 9(4). P. 244-253.

SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS OF THE SKIN MICROFLORA OF LABORATORY ANIMALS

Yu.S. Boldyreva. M.N. Prtushkov

Tver State University, Tver

We analyzed the sensitivity to antibiotics of the skin microflora of a laboratory mouse. The quantitative and qualitative composition of the animal skin microbiota was studied, and sensitivity tests to various antibiotics were carried out using the disk-diffusion method for the most common types of isolated microorganisms.

Keywords: *sensitivity to antibiotics, skin microflora, disc-diffusion method.*

Об авторах:

БОЛДЫРЕВА Юлия Сергеевна – магистрант направления 06.04.01 Биология, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33, e-mail: Petukhova.LV@tversu.ru

ПЕТУШКОВ Михаил Николаевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры зоологии и физиологии, ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет», 170100, Тверь, ул. Желябова, д. 33, e-mail: Prtushkov.MN@tversu.ru.

Болдырева Ю.С. Чувствительность к антибиотикам кожной микрофлоры лабораторных животных / Ю.С. Болдырева, М.Н. Петушков // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2024. № 2(74). С. 47-58.

Дата поступления рукописи в редакцию: 25.02.24

Дата подписания рукописи в печать: 01.06.24