

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Григорова Е.В., Рычкова Л.В., Белькова Н.Л., Немченко У.М., Савелькаева М.В., Кунгурцева Е.А., Воропаева Н.М.

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МИКРОБИОТЫ ТОЛСТОЙ КИШКИ У ДЕТЕЙ С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ГАСТРОИНТЕСТИНАЛЬНЫМИ РАССТРОЙСТВАМИ, К ПРЕПАРАТАМ БАКТЕРИОФАГОВ

ФГБНУ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, 664003, Иркутск, Россия

Оценён уровень чувствительности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у детей первого полугодия жизни с функциональными гастроинтестинальными расстройствами (ФГИР), к коммерческим препаратам бактериофагов. Материалом служили фекалии 67 детей первого полугодия жизни с ФГИР, находящихся на грудном вскармливании. Культуры *K. pneumoniae*, выделенные из фекалий детей, составили две группы сравнения в зависимости от возраста пациентов. В первую группу включены 43 штамма *K. pneumoniae*, изолированных из толстой кишки детей в возрасте от рождения до трёх мес., во вторую группу – 24 штамма, от детей в возрасте от трёх до шести мес. Изучение состава микробиоты толстой кишки осуществляли стандартными методами, результаты оценены в соответствии с отраслевым стандартом 91500.11.0004-2003. Идентификацию *K. pneumoniae* проводили бактериологическим методом. Определение уровня литической активности бактериофагов клебсиел пневмонии, клебсиел поливалентного, секстафага к штаммам *K. pneumoniae* вели капельным методом (spot-test) согласно клиническим рекомендациям. Формирование симптомов ФГИР у детей коррелирует с возрастом – частота срыгиваний уменьшалась у детей до шести месяцев (с 23,3% до 4,2%) на фоне формирования симптомокомплекса, связанного с расстройством дефекации. Бактериологический анализ показал, что фаги проявляют низкий уровень литической активности, чувствительность к ним *K. pneumoniae* коррелирует с возрастом и выше у детей трёх-шести мес. В первой группе сравнения в три раза чаще регистрировали отсутствие лизиса *K. pneumoniae* по отношению к бактериофагу клебсиел пневмонии (30,2%, $p < 0,05$) и в два раза реже (30,2%, $p < 0,05$) низкий уровень лизиса штаммов *K. pneumoniae* к фагу клебсиел поливалентному по сравнению со второй группой. Чувствительность штаммов *K. pneumoniae* к секстафагу сопоставима в группах сравнения и варьировала от 2 до 10%. Среди исследованных штаммов *K. pneumoniae* наблюдается низкий уровень чувствительности к специфическим препаратам – бактериофагу клебсиел пневмонии, клебсиел поливалентному, секстафагу. Данный факт отражает недостаточную активность фагов и прогнозирует низкую эффективность эмпирической фазотерапии без элиминации из кишечного биоценоза *K. pneumoniae* у детей с ФГИР, находящихся на грудном вскармливании.

Ключевые слова: бактериофаги; *Klebsiella pneumoniae*; дети первого полугодия жизни; функциональные гастроинтестинальные расстройства; грудное вскармливание.

Для цитирования: Григорова Е.В., Рычкова Л.В., Белькова Н.Л., Немченко У.М., Савелькаева М.В., Кунгурцева Е.А., Воропаева Н.М. Оценка чувствительности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из микробиоты толстой кишки у детей с функциональными гастроинтестинальными расстройствами, к препаратам бактериофагов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2021;66 (4): 217-222. DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-217-222>

Grigorova E.V., Rychkova L.V., Belkova N.L., Nemchenko U.M., Savelkaeva M.V., Kungurtseva E.A., Voropaeva N.M.

EVALUATION OF THE SENSITIVITY OF BACTERIOPHAGE PREPARATIONS TO *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS ISOLATED FROM THE COLON MICROBIOTA IN CHILDREN WITH FUNCTIONAL GASTROINTESTINAL DISORDERS

Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia

The level of sensitivity of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from children of the first half of life with functional gastrointestinal disorders (FGID) to commercial bacteriophage preparations was assessed. The material was the feces of 67 children of the first half of life with FGID who are breastfed. Culture of *K. pneumoniae* isolated from faeces of children, amounted to two comparison groups, depending on the age of the patients. The first group included 43 *K. pneumoniae* strains isolated from the colon of children aged from birth to three months, in the second group – 24 strains, from children aged three to six months. The composition of the colon microbiota was studied using standard methods, and the results were evaluated in accordance with Industry Standard 91500.11.0004-2003. Identification of *K. pneumoniae* was performed by bacteriological methods. Determination of the level of lytic activity of *K. pneumoniae*, *Klebsiella polyvalent* and sextaphage bacteriophages to *K. pneumoniae* strains was conducted by the drip method (spot-test) according to clinical recommendations. It is shown that the formation of FGID symptoms in children correlates with age – the frequency of regurgitation decreased in children up to six months (from 23.3% to 4.2%) against the background of the formation of a symptom complex associated with defecation disorder. Bacteriological analysis showed that in General, phages show a low level of lytic activity, sensitivity to them *Klebsiella* also correlated with age and was higher in children of three to six months. Thus, in the first comparison group, the absence of *Klebsiella* lysis in relation to the *Klebsiella pneumoniae* bacteriophage was registered three times more often (30.2%, $p < 0.05$) and twice less often (30.2%, $p < 0.05$), the low level of lysis of *K. pneumoniae* strains to the *Klebsiella polyvalent* phage compared to the second group. The sensitivity of *K. pneumoniae* strains to sextaphage was comparable in comparison groups and varied from 2 to 10%. Thus, among the studied *K. pneumoniae* observed

a low level of sensitivity to specific drugs – bacteriophage Klebsiella pneumoniae, Klebsiella polyvalent and sextaphage. This fact reflects the insufficient activity of phages and predicts low effectiveness of empirical phage therapy without elimination from the intestinal biocenosis of K. pneumoniae in children with FGID who are breastfed.

Key words: *bacteriophages; Klebsiella pneumoniae; children of the first half of life; functional gastrointestinal disorders; breastfeeding.*

For citation: Grigorova E.V., Rychkova L.V., Belkova N.L., Nemchenko U.M., Savelkaeva M.V., Kungurtseva E.A., Voropaeva N.M. Evaluation of the sensitivity of bacteriophage preparations to *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from the colon microbiota in children with functional gastrointestinal disorders. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2021; 66 (4): 217-222 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2021-66-4-217-222>

For correspondence: Grigorova E. V., PhD of biological Sciences, researcher of the laboratory of the microbiome and microecology; e-mail: buxarowa.ekaterina@yandex.ru

Information about authors:

Grigorova E.V., ORCID iD: 0000-0001-6588-2591;
Rychkova L.V., ORCID iD: 0000-0003-2910-0737;
Belkova N. L., ORCID iD: 0000-0001-9720-068X;
Nemchenko U.M., ORCID iD: 0000-0002-7656-342X;
Savelkaeva M.V., ORCID iD: 0000-0001-6793-6493;
Kungurtseva E.A., ORCID iD: 0000-0002-4535-9397;
Voropaeva N.M., ORCID iD: 0000-0001-7026-2522 X.

Acknowledgment. *The study was performed within the framework of the budget theme № AAAA-A18-118051190033-0.*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 15.07.2020
Accepted 01.09.2020

Введение. В последние годы возросло количество функциональных расстройств желудочно-кишечного тракта, ассоциированных с условно-патогенными микроорганизмами (УПМ). Доминирующее место среди УПМ занимают бактерии рода *Klebsiella*, сем. *Enterobacteriaceae*. *Klebsiella pneumoniae* – клинически значимый вид, в норме колонизирующий носоглотку, кишечник и другие биотопы организма человека. При дисбалансе видовых и количественных характеристик ассоциативной микробиоты толстой кишки [1] этот патоген может вызывать поражения различных органов, приводя к летальным исходам у почти 30% детей [2]. По данным Роспотребнадзора, во все сезоны года дети становятся наиболее часто поражаемым контингентом (более 60%) [3]. Формирование ФГИР у детей первых месяцев жизни может быть ассоциировано с микрофлорой матери, грудным видом вскармливания, активностью генетически детерминированных механизмов, особенностями главной системы антигенной гистосовместимости и степенью активности пассивного иммунитета [4].

В кишечной микробиоте детей первых месяцев жизни сдерживающим фактором распространения клинически значимых штаммов *K. pneumoniae* могут являться бактериофаги, продуцирующие специфические ферменты, разрушающие клеточные полисахариды бактерий [5]. Бактериофаги обладают высокоспецифичным действием, направленным против определённых видов целевых микроорганизмов, в том числе резистентных к лекарственным препаратам [6]. Экспериментальные исследования показывают, что применение бактериофагов даёт положительные результаты при лечении заболеваний, вызванных УПМ, в том числе у новорожденных и детей первого года жизни [3]. Важным условием эффективности фаготерапии необходимо считать оценку фагочувствительности, выделенной из клинического материала пациента культуры УПМ, с целью индивидуального подбора препарата для элиминации возбудителя [7]. Использование бактериофагов может стать альтернативой применения антибиотиков и проводиться как моно-, так и комбинированной терапией [8, 9].

Цель исследования – оценить чувствительность штаммов *K. pneumoniae*, выделенных у детей первого полугодия жизни с ФГИР, находящихся на грудном вскармливании, к коммерческим препаратам бактериофагов.

Материал и методы. Объектом исследования являлись дети в возрасте от рождения до 6 месяцев ($n=67$), обращавшиеся к гастроэнтерологу клиники ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, г. Иркутск. В работе с пациентами соблюдались этические принципы, предъявляемые Хельсинской Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации (World Medical Association Declaration of Helsinki 1964, в редакции Бразилия, октябрь 2013) и «Правилами надлежащей клинической практики», утверждёнными приказом Минздрава РФ от 01.04.2016 № 200Н. Исследование одобрено комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ.

Критерии включения в исследование. Дети с ФГИР, находящиеся на грудном вскармливании (согласно МКБ-10, 2003; Римским критериям IV, 2016 г.; Рабочего протокола диагностики и лечения функциональных заболеваний органов пищеварения у детей, 2010), индикация в фекалиях клинически значимого вида *K. pneumoniae* в титре более 10^4 КОЕ/г (согласно Отраслевому стандарту «Протокол ведения больных дисбактериоз кишечника», 2003¹).

Критерии исключения. Дети, имеющие в анамнезе органические заболевания желудочно-кишечного тракта и перенесшие инфекции различной локализации, принимавшие антибактериальные, пробиотические препараты и лечебные бактериофаги в предшествующие три месяца до обследования; дети, находящиеся на искусственном и смешанном вскармливании.

Материалом исследования служили фекалии 67 детей первого полугодия жизни с ФГИР, находящихся на грудном вскармливании. Изучение состава микробиоты

¹Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». ОСТ 91500.11.0004-2003. Приказ МЗ РФ №231 от 09.06.2003:7.

Клиническая характеристика обследуемых детей

Симптомы	Дети от рождения до трёх месяцев (n=43)	Дети от трёх до шести месяцев (n=24)	Значение критерия Фишера (Ф _{эмп})	Уровень значимости, p
Расстройства дефекации	18 / 41,9*	15 / 62,5	1,633	>0,05
Колики	1 / 2,3	1 / 4,2	0,412	>0,05
Вздутие, повышенное газообразование	11 / 25,6	4 / 16,7	0,861	>0,05
Срыгивания	10 / 23,3	1 / 4,2	2,336	<0,01
Симптомокомплекс (от общего количества обследованных):				
Вздутие, повышенное газообразование и срыгивания	3 / 6,9	0	2,098	<0,05 (принята гипотеза H1)
Расстройства дефекации с пигментированной слизью	0	2 / 8,3	2,299	<0,01
Расстройства дефекации, повышенное газообразование	0	1 / 4,2	1,614	>0,05

Примечание. * – абсолютные значения / частота выявления симптома, %.

толстой кишки осуществляли стандартным бактериологическим методом, результаты оценены в соответствии с ОСТ, 2003¹. Идентификацию *K. pneumoniae* проводили по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим свойствам с использованием АРІ-систем «bioMérieux» (Франция). Культуры *K. pneumoniae* разделили на две группы сравнения в зависимости от возраста пациентов. В 1-ю группу включили 43 штамма *K. pneumoniae* (64,2% от общей выборки), выделенных от детей в возрасте от рождения до 3-х месяцев, во 2-ю – 24 штамма (35,8%), выделенных от детей в возрасте от трёх до шести месяцев. Для выявления капсульных штаммов использован метод окраски по Бурри-Гинсу.

Для оценки чувствительности штаммов *K. pneumoniae* к фагам использованы коммерческие препараты бактериофагов производства НПО «Микроген», г. Пермь (Россия) с заявленной активностью против клебсиелл – бактериофаг клебсиелл пневмонии (флаконы по 20 мл, серия П259 06.2020 г., г. Пермь), бактериофаг клебсиелл поливалентный (флаконы по 20 мл, серия У387 02.2020 г., г. Уфа), секстафаг (флаконы по 20 мл, серия ПЗ 01.2021 г., г. Пермь).

Определение уровня литической активности (УЛА) бактериофагов к штаммам *K. pneumoniae* проводили капельным методом (spot-test) согласно Федеральным клиническим рекомендациям². Для тестирования использован приготовленный из суточных культур *K. pneumoniae* инокулюм. По стандартной методике готовили суспензии с оптической плотностью 0,5 по Макфарланду (контроль с помощью денситометра). Хлопковым тампоном проводили инокуляцию на поверхность среды в трёх направлениях, поворачивая чашку Петри на 60°. Чашки подсушивали 30-60 мин при комнатной температуре, накрыв их стерильными бумажными фильтрами. На подсушенную поверхность стерильной пипеткой наносили препараты бактериофагов в объёме 20 мкл. Чашки повторно подсушивали 15-30 мин, закрывали, переворачивали, инкубировали 18-20 ч при температуре 37° С. Оценку УЛА выполняли по четырёхкрат-

ной системе: «-» – отсутствие литической активности, «+» – низкая активность, «++» – образование зоны лизиса с большим количеством колоний вторичного роста бактерии, «+++» – зона лизиса с единичными колониями вторичного роста, «++++» – прозрачная зона лизиса без колоний вторичного роста. Исследование проводили в трёх повторах. Для исследуемой выборки штаммов *K. pneumoniae* ставили контроли: положительный – бульон с культурой без фага и контроль стерильности.

Для анализа клинической характеристики обследуемых детей и оценки УЛА, выделенных из фекалий детей, статистическую обработку результатов проводили при помощи пакета лицензионных прикладных программ «MS Office Excel 2007 for Windows 7» по методу Фишера. При определении значения критерия Фишера ориентировались на два положения: если значение точного критерия Фишера больше критического принималась нулевая гипотеза (H0) и делали вывод об отсутствии статистически значимых различий частоты исхода в зависимости от фактора риска; если значение точного критерия Фишера меньше критического принималась альтернативная гипотеза (H1) и делали вывод о наличии статистически значимых различий частоты исхода в зависимости от воздействия фактора риска. При уровне $p \leq 0,05$ различия считали статистически значимыми.

Результаты. По результатам клинического обследования врачом-гастроэнтерологом диагноз ФГИР подтвержден у всех пациентов (табл. 1).

Клиническая картина ФГИР представлена расстройствами дефекации, вздутием, коликами, повышенным газообразованием, обильным срыгиванием продолжительностью не менее 12 нед за период наблюдения. Срыгивание после кормления в объёме более 1 чайной ложки (5 мл) и повторяющееся до 5-8 раз в день наблюдали у четверти младенцев в возрасте до трёх месяцев – 10 детей (23,3%), что статистически значимо чаще по сравнению с группой детей трёх-шести месяцев – 4,2% ($p < 0,01$). У обследуемых установлены сочетания симптомов: у детей до трёх мес – вздутие, повышенное газообразование ассоциировано со срыгиванием (6,9%, $p < 0,05$), у детей трёх-шести мес – расстройства дефекации сопряжены с появлением в фекалиях слизи жёлтого и жёлто-зелёного цвета – 8,3% ($p < 0,01$).

²Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противозаразительной практике. Федеральные клинические рекомендации. Москва; 2014.

Следующим этапом работы было выделение чистых культур *K. pneumoniae*. Морфологически бактерии представлены грамотрицательными палочковидными (окраска по Граму), неподвижными формами, не образующими спор. При окраске по Бурри-Гинсу капсулы регистрировали у половины исследуемых культур *K. pneumoniae*: у 21 культуры (48,8%) 1-й группы и у 10 культур (41,7%) 2-й группы сравнения. На агаризованных питательных средах колонии *K. pneumoniae* имели гладкую поверхность со слизистой оболочкой. По биохимическим характеристикам все штаммы ферментировали глюкозу с образованием газа, лактозу, маннит, сахарозу, лизин-декарбоксилазу, инозит, сорбит, утилизировали цитрат, восстанавливали нитраты в нитриты, гидролизировали мочевины, не ферментировали орнитиндекарбоксилазу, фенилаланиндеаминазу, не образовывали индола и сероводорода, реакция с метиловым красным отрицательна, Фогеса-Проскауэра положительна.

Заключительным этапом исследования стало тестирование бактериофагов на штаммы клебсиелл. УЛА тестируемых бактериофагов на клетки *K. pneumoniae* в группах сравнения различался (табл. 2).

При воздействии бактериофага клебсиелл пневмонии на *K. pneumoniae* в 1-й группе сравнения лизис не наблюдался в 30,2% случаев, что в три раза чаще, чем во второй – 8,3% ($p < 0,05$) (табл. 2). Низкий УЛА и формирование вторичного роста *K. pneumoniae* сопостави-

мы по частоте встречаемости в группах сравнения. При применении бактериофага клебсиелл поливалентного на бактерии в 1-й группе сравнения в два раза реже выявлен низкий УЛА – 30,2% ($p < 0,05$), лизис со вторичным ростом наблюдали в три раза чаще – в 25,6% случаев ($p < 0,05$), чем во 2-й группе. При тестировании секстафага на клетки клебсиелл УЛА сопоставимы в группах сравнения ($p > 0,05$). Все три бактериофага не лизировали *K. pneumoniae* на четыре креста (++++) (табл. 2).

Обсуждение. По мнению многих учёных, внутриутробный, неонатальный, грудной периоды являются критическими этапами формирования кишечного микробиома ребёнка, от которых во многом зависит состояние его здоровья в течение всей жизни [10]. По нашим данным ФГИР грудного периода характеризуются расстройствами дефекации, коликами, срыгиваниями, вероятно ассоциированными с незрелостью иммунной системы, слабостью нижнего пищеводного сфинктера и аномальной моторикой пищевода, которые приводят к самопроизвольному забросу желудочного содержимого в пищевод [11].

Развитие многих заболеваний кишечника может быть опосредовано угнетением индигенной и активизацией условно-патогенной микробиоты (клебсиеллы, золотистый стафилококк, клостридии) [12 – 14]. Присутствие *K. pneumoniae* в микробиоте толстой кишки у детей может быть обусловлено несколькими причинами: несо-

Таблица 2

Уровни литической активности препаратов бактериофагов в отношении штаммов *K. pneumoniae*, выделенных у детей с ФГИР

Литическая активность препарата бактериофага клебсиелл пневмонии				
Уровень литической активности фага (по количеству крестов)	Группа 1 (штаммы <i>K. pneumoniae</i> , выделенные у детей в возрасте от рождения до 3-х мес ($n=43$))	Группа 2 (штаммы <i>K. pneumoniae</i> , выделенные у детей в возрасте от 3-х до 6 мес ($n=24$))	Значение критерия Фишера ($\Phi_{эмп}$)	Уровень значимости, p
-	13 / 30,2	2 / 8,3	2,271	<0,05 (Принята гипотеза H1)
+	11 / 25,6	10 / 41,7	1,345	>0,05
++	13 / 30,2	8 / 33,3	0,261	>0,05
+++	6 / 14,0	4 / 16,7	0,296	>0,05
++++	0	0	0	0
Литическая активность препарата бактериофага клебсиелл поливалентного				
-	16 / 37,2	6 / 25,0	1,040	>0,05
+	13 / 30,2	13 / 54,2	1,923	<0,05 (Принята гипотеза H1)
++	11 / 25,6	2 / 8,3	1,864	<0,05 (Принята гипотеза H1)
+++	3 / 7,0	3 / 12,5	0,738	>0,05
++++	0	0	0	0
Литическая активность препарата секстафага				
-	7 / 16,3	2 / 8,3	0,961	>0,05
+	24 / 55,8	11 / 45,8	0,785	>0,05
++	10 / 23,3	7 / 29,2	0,528	>0,05
+++	2 / 4,7	4 / 16,7	1,595	>0,05
++++	0	0	0	0

Примечание. «-» – отсутствие литической активности, «+» – низкая активность, «++» – образование зоны лизиса с большим количеством колоний вторичного роста бактерии, «+++» – зона лизиса с единичными колониями вторичного роста, «++++» – прозрачная зона лизиса без колоний вторичного роста; абсолютные значения / частота регистрации, %.

зрелой иммунной системой ребёнка, несформированной постоянной микрофлорой, высокой агрессивностью патогена, связанной с маркерами вирулентности, низкой способностью защитных факторов грудного молока, высокой обсеменённостью УПМ матери (вагинальная микрофлора, грудное вскармливание) или госпитальной среды [4, 15]. Разнообразие симптоматики ФГИР, в частности, формирование стула с пигментированной слизью, может быть детерминировано не только высоким титром, но и способностью *K. pneumoniae* продуцировать слизь.

При правильном применении бактериофаги помогают справиться с разными видами патологии. Они могут оказывать огромное влияние на иммунитет детей грудного возраста. При использовании бактериофагов стимулируются факторы специфического и неспецифического иммунитета [2,16,17]. Отмечают позитивное воздействие ряда факторов иммунной системы на исход фаготерапии и, соответственно, большую литическую активность бактериофагов *in vivo* [18,19].

По результатам исследований последних лет установлен вариабельный уровень фагочувствительности культур *K. pneumoniae* у детей с ФГИР [5,20]. Наши данные показывают, что все три бактериофага, используемые в исследовании, обладали низким УЛА. Суммарно показатели отсутствия лизиса «-» и низкой литической активности «+» составили от 50 до 75% независимо от вида фага. Бактериофаг клебсиелл пневмонии и секстафаг характеризовались более выраженной литической активностью (суммарно показатели образования зон лизиса с колониями вторичного роста бактерии (++) и (+++)) в отношении штаммов второй группы сравнения (50 и 45,9% фагочувствительных изолятов) по сравнению с бактериофагом клебсиелл поливалентным (20,8%). Поддержание длительности ФГИР у конкретного ребёнка, очевидно, может быть обусловлено непрерывной циркуляцией устойчивых к фагам штаммов в микробиоте кишечника. Исследователи из разных регионов России отмечают в качестве причины проявления высокого уровня резистентности штаммов *K. pneumoniae* (до 80% и выше) к фагам не только наличие специфических структур защиты бактерий (например, капсул) [21], но и смену доминировавшего штамма (клона) или малое представительство (или полное отсутствие) штаммов бактерий, изолированных от региональных пациентов, в процессе изготовления бактериофагов [22]. Нормализация микрофлоры, возможное участие бактериофага в поддержании колонизационной резистентности и оральной толерантности поможет обеспечить стабилизацию гуморального и клеточного звеньев иммунитета у детей грудного возраста [3]. Наиболее выраженная литическая активность фага клебсиелл пневмонии в отношении исследуемых культур указывает на возможность его перспективного использования для коррекции и лечения ФГИР, ассоциированных с *K. pneumoniae* у детей. Обязательным условием должно являться предварительное определение фагочувствительности выделенных штаммов. Так же для восстановления индигенной микробиоты толстой кишки и, как следствие, элиминации клинически значимого патогена *K. pneumoniae* дополнительно может быть рекомендовано применение пробиотических препаратов [11, 23].

Заключение. Среди исследованных штаммов *K. pneumoniae* наблюдается низкий уровень чувствительности к специфическим препаратам – бактериофагу

клебсиелл пневмонии, клебсиелл поливалентному, секстафагу. Данный факт отражает недостаточную активность фагов и прогнозирует низкую эффективность эмпирической фаготерапии без элиминации из кишечного биоценоза *K. pneumoniae* у детей с ФГИР, находящихся на грудном вскармливании.

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетной темы № АААА-А18-118051190033-0.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (pp. 6, 9, 14, 16-20, 23
см. REFERENCES)

1. Иванова Е.И., Попкова С.М., Джиоев Ю.П., Ракова Е.Б., Немченко У.М., Рычкова Л.В. Выявление шигатоксинпродуцирующих штаммов *Escherichia coli* в популяциях нормальной кишечной микрофлоры у детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014; 59 (11): 56-60.
2. Акимкин В.Г., Дарбева О.С., Колков В.Ф. Бактериофаги: исторические и современные аспекты их применения: опыт и перспективы. *Клиническая практика*. 2010; 4: 48-54.
3. Топчий Н.В., Топорков А.С. Бактериофаги в лечении острых кишечных инфекций. *Медицинский совет*. 2015;8: 74-81.
4. Алёшкин В.А., Алёшкин А.В., Афанасьев С.С., Караулов А.В., Воропаева Е.А., Афанасьев М.С., Несвижский Ю.В., Рубальский Е.О. Микробиоценоз кишечника. *Вопросы диетологии*. 2015; 5(4): 15-52.
5. Козлова А.И., Топальский Д.В. Чувствительность к антибиотикам и бактериофагам клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с классическим и гипермукоидным фенотипами. *Военная медицина*. 2019; 1: 45-8.
7. Топальский Д.В., Козлова А.И. Чувствительность к препаратам бактериофагов клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* с различными уровнями антибиотикорезистентности. *Проблемы здоровья и экологии*. 2018; 56-62.
8. Вакарина А.А., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф. Влияние бактериофагов на чувствительность условно-патогенных бактерий к антибактериальным препаратам. *Журнал микробиологии*. 2019; (2): 3-7.
10. Николаева И.В., Царегородцев А.Д., Шайхиева Г.С. Формирование кишечной микробиоты ребёнка и факторы, влияющие на этот процесс. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2018; 63: 13-8. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2018-63-3-13-18>
11. Ардатская М.Д., Бельмер С.В., Добрица В.П., Захаренко С.М., Лабезник Л.Б., Минушкин О.Н. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2015; 117(5): 13-50.
12. Корниенко Е.А. Антибиотикоассоциированная диарея у детей. *Consilium Medicum. Педиатрия*. 2015; (1): 59-62. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2018-63-3-13-18>.
13. Григорова Е. В., Иванова Е. И., Немченко У. М., Савелькаева М. В., Рычкова Л. В., Шолохов Л. Ф., Колесникова Л. И. Особенности микробиоты толстой кишки в зависимости от вида вскармливания у детей с функциональными гастроинтестинальными расстройствами. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2019; 36: 85-90.
15. Урсова Н.И. Значение грудного вскармливания для роста и развития младенца. *Альманах клинической медицины*. 2015; (42): 23-37. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2015-42-23-37>.
21. Григорова Е.В., Немченко У.М., Ракова Е.Б., Савелькаева М.В., Сердюк Л.В. Капсулообразование как фактор селекции фагорезистентных штаммов *Klebsiella* spp. у детей с функциональными нарушениями пищеварения. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2016;12: 9-12.
22. Завгородняя Е.Ф., Сташкевич Л.А. Динамические наблюдения за условно-патогенными бактериями при нарушениях кишечной микробиоты у взрослого населения г. Хабаровска. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2016; 31:80-5.

REFERENCES

1. Ivanova E.I., Popkova S.M., Dzhioev Iu.P., Rakova E.B., Nemchenko U.M., Rychkova L.V. The detection of strains of *Escherichia coli* producing Shiga toxin in populations of normal intestinal microbiota in children with functional disorders of gastrointestinal tract. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2014; 59 (11): 56-60. (in Russian)
2. Akimkin V.G., Darbeeva O.S., Kolkov V.F. Bacteriophages: historical and modern aspects of their application: experience and prospects. *Klinicheskaya praktika*. 2010; 4: 48-54. (in Russian)
3. Topchiy N.V., Toporkov A.S. Bacteriophages in the treatment of acute intestinal infections. *Meditsinskiy sovet*. 2015;8: 74-81. (in Russian)
4. Aleshkin V.A., Aleshkin A.V., Afanas'ev S. S., Karaulov A. V., Voropaeva E. A., Afanas'ev M. S., Nesvizhskiy Yu. V., Rubal'skiy E. O. The intestinal microbiota. *Voprosy dietologii*. 2015; 5(4): 15-52. (in Russian)
5. Kozlova A.I., Tapal'skiy D. V. Sensitivity to antibiotics and bacteriophages of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with classical and hypermucoid phenotypes. *Voennaya meditsina*. 2019; 1: 45-8. (in Russian)
6. Ganeshan S.D., Hosseinidoust Z. Phage Therapy with a Focus on the Human Microbiota. *Antibiotics (Basel)*. 2019; 8(3): 131. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030131>.
7. Tapal'skiy D. V., Kozlova A. I. Sensitivity to bacteriophage preparations of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with different levels of antibiotic resistance. *Problemy zdorov'ya i ekologii*. 2018; 56-62. (in Russian)
8. Vakarina A.A., Kataeva L.V., Stepanova T.F. Influence of bacteriophages on the sensitivity of opportunistic bacteria to antibacterial drugs. *Zhurnal mikrobiologii*. 2019; (2): 3-7. (in Russian)
9. Adebayo O.S., Rao G.A., O T. M., Sunday K.J. Phage therapy: a potential alternative in the treatment of multidrug-resistant bacterial infections. *Journal of microbiology and Experimentation*. 2017; 5: 1-4. <https://doi.org/10.15406/jmen.2017.05.00173>.
10. Nikolaeva I.V., Tsaregorodtsev A. D., Shaykhiya G. S. Formation of the child's intestinal microbiota and factors affecting this process. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii*. 2018; 63: 13-8. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2018-63-3-13-18>. (in Russian)
11. Ardatskaya M. D., Bel'mer S. V., Dobritsa V. P., Zakharenko S. M., Labeznik L. B., Minushkin O. N. Intestinal dysbiosis (dysbacteriosis): current state of the problem, comprehensive diagnostics and therapeutic correction. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2015; 117(5): 13-50. (in Russian)
12. Kornienko E.A. Antibiotic-associated diarrhea in children. *Consilium Medicum. Pediatriya*. 2015; 1: 59-62. <https://doi.org/10.21508/1027-4065-2018-63-3-13-18>. (in Russian)
13. Grigorova E.V., Ivanova E.I., Nemchenko U.M., Savel'kaeva M.V., Rychkova L.V., Sholokhov L.F., Kolesnikova L.I. Features of succession in colon microbiota in children with functional gastrointestinal disorders depending on the type of feeding. *Dal'nevostochnyi zhurnal infektsionnoy patologii*. 2019; 36: 85-90. (in Russian)
14. Ivanova E.I., Rychkova L.V., Nemchenko U.M., Bukharova E.V., Savelkaeva M.V., Dzhioev Y.P. The structure of the intestinal microbiota of the intestine and the frequency of detection of pathogenicity genes (stx1, stx2, bfp) in *Escherichia coli* with normal enzymatic activity isolated from children during the first year of life. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2017; 32(1): 42-8. <https://doi.org/10.3103/S0891416817010062>.
15. Ursova N. I. The significance of breastfeeding for the infant growth and development. *Al'manakh klinicheskoy meditsiny*. 2015; 42: 23-37. <https://doi.org/10.18786/2072-0505-2015-42-23-37>. (in Russian)
16. Lopetuso L.R., Giorgio M.E., Saviano A., Scaldaferrri F., Gasbarrini A., Cammarota G. Bacteriocins and Bacteriophages: Therapeutic Weapons for Gastrointestinal Diseases? *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20: 183. <https://doi.org/10.3390/ijms20010183>.
17. Sinha A., Maurice C. F. Bacteriophages: Uncharacterized and Dynamic Regulators of the Immune System. *Mediators Inflamm.* 2019; 3730519. <https://doi.org/10.1155/2019/3730519>.
18. Furfaro L.L., Chang B.J., Payne M.S. Applications for Bacteriophage Therapy during Pregnancy and the Perinatal Period. *Front Microbiol.* 2017; 8: 2660. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02660>.
19. Roach D.R., Leung C.Y., Henry M., Morello E., Singh D., P Di Santo J., Weitz J. S., Debarbieux L. Synergy between the Host Immune System and Bacteriophage Is Essential for Successful Phage Therapy against an Acute Respiratory Pathogen. *Cell Host Microbe*. 2017; 22: 38-47. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.06.018>.
20. Romero-Calle D., Benevides R. G., Góes-Neto A., Billington C. Bacteriophages as Alternatives to Antibiotics in Clinical Care. *Antibiotics (Basel)*. 2019; 8(3): 138. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8030138>.
21. Grigorova E.V., Nemchenko U.M., Rakova E.B., Savel'kaeva M.V., Serdyuk L.V. Capsule formation as a factor of selection of phage-resistant strains of *Klebsiella* spp. in children with functional digestive disorders. *Ekspierimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2016; 12: 9-12. (in Russian)
22. Zavgorodnyaya E.F., Stashkevich L.A. Dynamic observations of opportunistic bacteria in disorders of the intestinal microbiota in the adult population of Khabarovsk. *Dal'nevostochnyi zhurnal infektsionnoy patologii*. 2016; 31: 80-5. (in Russian)
23. Roshni Amalaradjou M.A., Bhunia A.K. Modern Approaches in Probiotics Research to Control Foodborne Pathogens. *Adv. Food Nutr. Res.* 2012; 67: 185-239.

Поступила 15.07.20

Принята к печати 01.09.20