

РОЛЬ РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ В ОПРЕДЕЛЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ХРОНИЧЕСКОГО ТОНЗИЛЛИТА

Е.С. Буренков

Медицинский университет «Реавиз», Самара

Резюме. *Цель работы:* изучить чувствительность возбудителей хронического тонзиллита к сочетанию антибиотиков амоксициллин + клавулановая кислота с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния. *Материалы и методы.* В исследовании приняли участие 117 пациентов (все мужчины) в период обострения хронического тонзиллита, которым назначался для его купирования амоксициллин/клавулановая кислота по стандартной схеме. Определение чувствительности микрофлоры миндалин проводилось с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния. Принцип метода заключался в определении иррадиации микрофлоры в пробах под действием антибиотика по наличию в ней продуктов микробного метаболизма. *Результаты.* Клинический анализ результатов проведённого лечения у данной группы пациентов показал, что у 96 (82 %) из них был достигнут быстрый клинический эффект. У 13 (11,1 %) пациентов пришлось увеличить сроки приёма антибиотика в среднем ещё на 3–5 дней, а у 8 пациентов для ликвидации обострения потребовалось назначение второго антибиотика. *Выводы.* Полученные результаты позволяют рекомендовать метод спектроскопии комбинационного рассеяния для определения чувствительности микрофлоры к антибиотикам, как высоко информативный в клинической практике.

Ключевые слова: антибиотики, хронический тонзиллит, спектроскопия комбинационного рассеяния, антибиотикорезистентность.

Для цитирования: Буренков Е.С. Роль рамановской спектроскопии в определении чувствительности возбудителей хронического тонзиллита. *Вестник медицинского института «Реавиз». Реабилитация, Врачи и Здоровье.* 2021;3(51):44-50. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2021.3.CLIN.1>

THE ROLE OF RAMAN SPECTROMETRY IN DETERMINING THE SENSITIVITY OF THE CAUSES OF CHRONIC TONSILLITIS

E.S. Burenkov

Medical University "Reaviz", Samara

Abstract. *Purpose of work.* To study the sensitivity of pathogens of chronic tonsillitis to the combination of antibiotics amoxicillin + clavulanic acid using Raman spectroscopy. *Materials and methods.* The study involved 117 patients (all men) in the period of exacerbation of chronic tonsillitis, who were prescribed amoxicillin / clavulanic acid for its relief according to the standard scheme. Determination of the sensitivity of the microflora of the tonsils was carried out using the method of Raman spectroscopy. The principle of the method was to determine the irradiation of microflora in samples under the action of an antibiotic by the presence of products of microbial metabolism in it. *Results.* Clinical analysis of the results of the treatment in this group of patients showed that 96 of them (82 %) had a quick clinical effect. In 13 patients (11.1 %), it was necessary to increase the duration of taking the antibiotic by an average of 3-5 days, and in 8 patients, to eliminate the exacerbation, the appointment of a second antibiotic was required. *Conclusions.* The results obtained make it possible to recommend the Raman spectroscopy method for determining the sensitivity of microflora to antibiotics, as highly informative in clinical practice.



Key words: antibiotics; chronic tonsillitis; Raman spectroscopy; antibiotic resistance.

Cite as: Burenkov E.S. The role of Raman spectrometry in determining the sensitivity of the causes of chronic tonsillitis. *Bulletin of the Medical Institute Reaviz. Rehabilitation, Doctor and Health.* 2021;3(51):44-50. <https://doi.org/10.20340/vmi-rvz.2021.3.CLIN.1>

Выбор антибиотика для лечения обострений хронического тонзиллита определяется как клиническими рекомендациями, так и индивидуальной чувствительностью микрофлоры пациента [1]. Второе условие становится наиболее актуальным, особенно в наши дни, когда антибиотикорезистентность многих возбудителей является значимой проблемой для современной медицины [2]. В связи с этим актуальным становится вопрос о необходимости установления эффективности выбранного антибиотика для каждого конкретного пациента в ранние сроки заболевания. Однако, наиболее часто используемый для этого диско-диффузионный метод требует до 3–5 суток для получения данных, что не позволяет рано назначить индивидуально эффективную этиотропную терапию [3, 4].

Целью данной работы стало изучение чувствительности возбудителей хронического тонзиллита к антибиотику амоксициллин/клавулановая кислота (амоксиклав) с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния.

В исследовании приняли участие 117 пациентов (все мужчины) в период обострения хронического тонзиллита, которым назначался для его купирования амоксиклав по стандартной схеме. Средний возраст обследованных составлял $29,7 \pm 3,4$ года.

Определение чувствительности микрофлоры миндалин к амоксиклаву проводилось с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния (КР). Принцип метода заключался в определении иррадиации микрофлоры в пробах под действием антибиотика по наличию в ней продуктов микробного метаболизма.

Спектральные характеристики изучались с помощью экспериментального стенда, включающего в себя высокоразреша-

ющий цифровой спектрометр Andor Shamrock sr-303i с встроенной охлаждаемой камерой DV420A-OE, волоконно-оптический зонд для спектроскопии комбинационного рассеяния RPB785, совмещённый с лазерным модулем LuxxMaster LML-785.0RB-04 (с регулируемой мощностью до 500 мВт, длина волны 785 нм). Схема прибора представлена на рисунке 1.

Выделение КР спектра на фоне автофлуоресценции проводилось методом полиномиальной аппроксимации флуоресцентной составляющей и вычитания её из регистрируемых спектров. Обработку спектров КР проводили в программе Wolfram Mathematica 9. Исследуемый спектр при обработке очищали от шумов сглаживающим медианным фильтром (5 точек). На выбранном интервале $400\text{--}2200\text{ см}^{-1}$ при помощи итерационного алгоритма определяли аппроксимирующую линию (полином пятой степени) автофлуоресцентной составляющей, а затем вычитали эту составляющую, получая выделенный спектр КР. Эффективность эрадикации инфекции в нёбных миндалинах с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния определяли в четырёх спектральных областях 1155 см^{-1} , 1525 см^{-1} , 1033 см^{-1} и 1611 см^{-1} .

Микрофлора от пациента выделялась непосредственно перед определением её чувствительности к антибиотикам, и её взвесь стандартизировалась по МакФарланду.

Для изучения чувствительности флоры к антибиотику пробы формировались согласно приведённым в таблице 1 данным. Для исключения воздействия факторов ротовой жидкости на действие антибиотика использовалось две серии тестов: в первом случае к взвеси микробов и антибиотика добавлялась ротовая жидкость (слюна), во втором случае ротовая жидкость заменя-

лась физиологическим раствором (забуференным фосфатным буфером для поддержания pH). В качестве антибиотика использовался амоксиклав для парентерального введения (1000/200 мг). Концентрация лекарственного вещества определялась из расчёта эффективной лекарственной дозы, рекомендованной в инструкции к препарату (105,4 мг/л амоксициллина и 28,5 мг/л клавулановой кислоты).

До оценки чувствительности микрофлоры к антибиотику пробы инкубировались при температуре 37 °С в течение двух часов, после чего результаты оценивались методом *спектроскопии комбинационного рассеяния*.

На рисунке 2 представлены спектры комбинационного рассеяния (КР) проб, содержащих в качестве растворителя ротовую жидкость и физиологический раствор со штаммами микрофлоры, полученной от пациентов.

В таблице 2 приведена расшифровка основных линий, наблюдаемых в спектре КР исследуемых объектов.

Из рисунка 2 можно видеть спектральные особенности на волновых числах 735 см^{-1} и 783 см^{-1} , 986 см^{-1} и 1635 см^{-1} , соответствующие аденину, нуклеиновым кислотам, протеинам и амиду I.

Образцы на основе физ. раствора позволяют оценить чистый спектр культуры и антибиотика без наложения его на спектр ротовой жидкости (слюны).

Также видно, что при действии антибиотика Амоксиклав дозировкой 105,4 мг/28,5 мг/л линии 735 см^{-1} и 783 см^{-1} , 986 см^{-1} и 1635 см^{-1} , соответствующие аденину, компонентам ДНК, протеинам и амиду I (или идентифицирующая наличие стрептококковой культуры) исчезают.

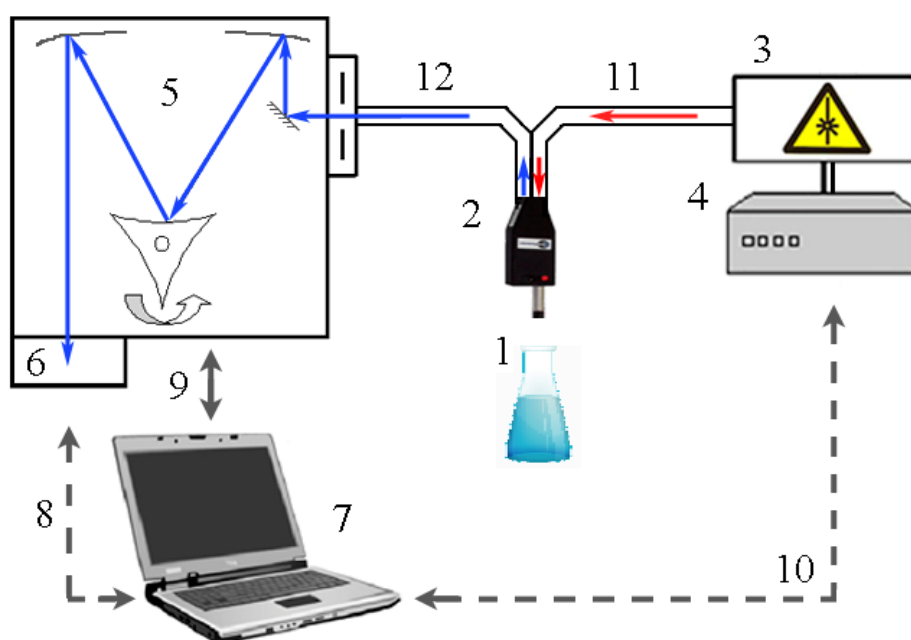


Рис. 1. Экспериментальный стенд: 1 – объект; 2 – КР пробник RPB785; 3 – лазерный модуль LuxxMaster Raman Boxx; 4 – источник питания лазерного модуля; 5 – спектрометр Shamrock sr-303i; 6 – встроенная охлаждаемая камера DV420A-OE; 7 – компьютер; 8–10 – управляющие кабели; 11 – передающее оптоволокно; 12 – приёмное оптоволокно

Fig. 1. Experimental stand: 1 – object; 2 – КР probe RPB785; 3 – LuxxMaster Raman Boxx laser module; 4 – power supply for the laser module; 5 – Shamrock sr-303i spectrometer; 6 – built-in cooled camera DV420A-OE; 7 – computer; 8–10 – control cables; 11 – transmitting fiber; 12 – receiving fiber

Таблица 1. Содержание проб для определения чувствительности микрофлоры к антибиотику (Амоксиклав) из группы ингибиторозащищенных пенициллинов с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния

Table 1. Contents of samples for determining the sensitivity of microflora to antibiotics (Amoxiclav) from the group of inhibitor-protected penicillins using Raman spectroscopy

Содержание проб	Проба 1	Проба 2	Проба 3	Проба 4
Ротовая жидкость, мл	4,5	4,5		
Амоксиклав, 0,527/0,143 мг	+		+	
Забуференный (фосфатным буфером) физ. раствор			4,5	4,5
Взвесь возбудителя, стандартизированная по плотности 0,5 по МакФарланду, мл	0,5	0,5	0,5	0,5

Таблица 2. Расшифровка спектров комбинационного рассеяния для проб

Table 2. Interpretation of Raman spectra for samples

Волновое число, см ⁻¹	Вещество
533	Lysozymes, proteins, guanine, thymine
632	ring2 deformation + ring2 breathing
735	adenine, glycosidic ring mode
783	nucleic acids, 776 (w) Nucleotides (Cytosine, uracil) ring stretching10,20 DNA/RNA
806	ν (CN) tyrosin, porine, valin
846	op. bending ring2 + d(CH ring2)
986	Glycine CNC symmetric stretch 998 (m) ν (C-C) aromatic ring breathing of phenylalanine Protein
1079	Lipids, nucleic acids, proteins, carbohydrates, lauric acid
1172	Aromatic amino acids δ (C-H), in tyrosine, Protein
1269	Phospholipid, amide III, proteins, lipids, thymine,
1337	ν (NH2) adenine, polyadenine, DNA
1374	tryptophan, porphyrins, lipids, guanine, thymine, protein
1435	Acetates, CH stretching peaks
1573	(s) ν (C=C)11 Lipid
1633	(m) Amide I and unsaturated lipids, amide I and ν (C=C) in lipid, Protein, Lipid
1744	acetates

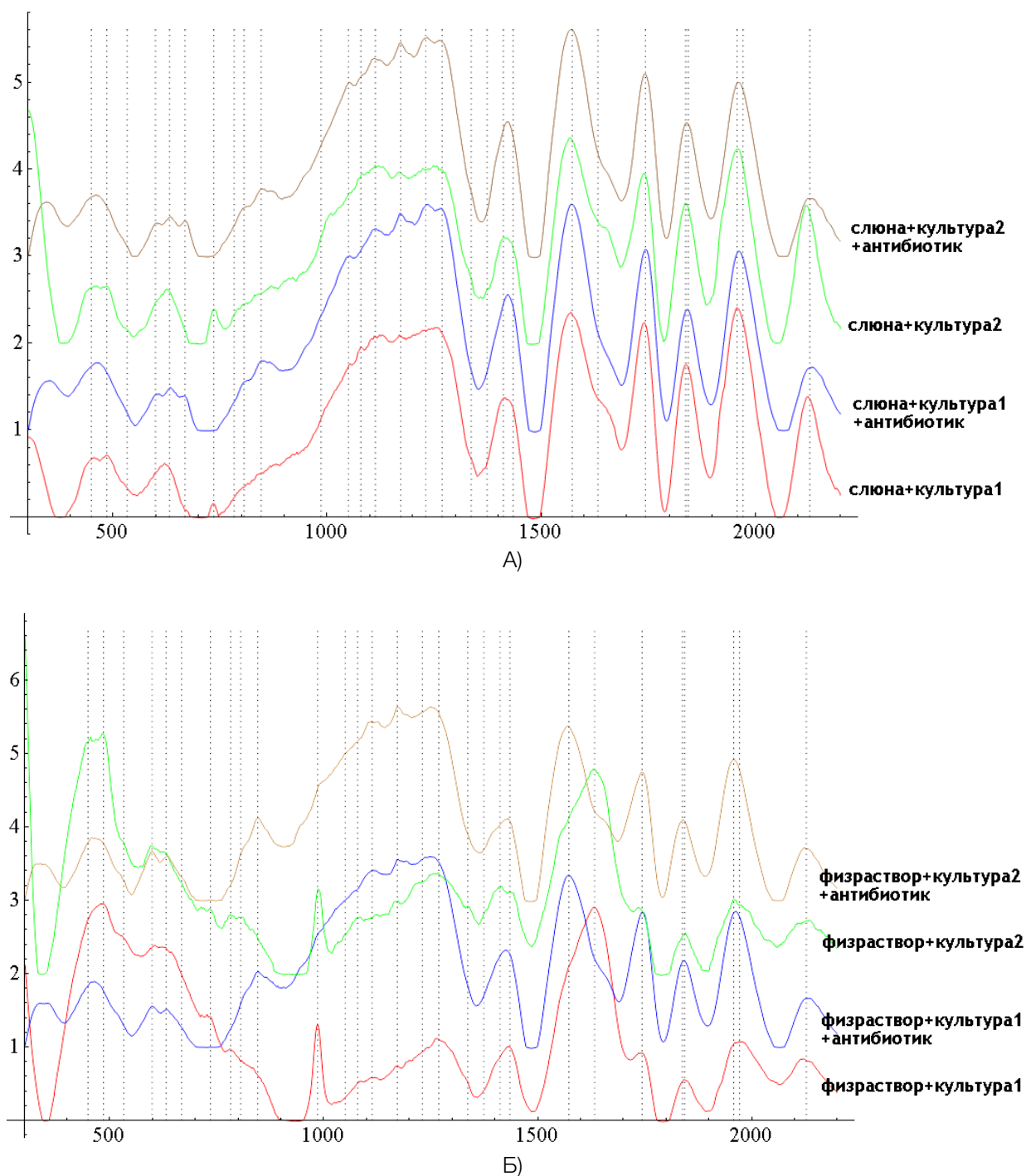


Рис. 2. Спектры комбинационного рассеяния для исследуемых образцов: А) пробы 1-2; Б) пробы 3-4
Fig. 2. Raman spectra for the studied samples: A) samples 1-2; B) samples 3-4

Из рисунка 2 также можно видеть, что штаммы стрептококка в ротовой жидкости и физ. растворе спектрально не различаются.

Также можно отметить, что линии на 632 см^{-1} , 846 см^{-1} , соответствующие компонентам вносимого препарата (антибиотик Амоксиклав дозировкой $105,4\text{ мг}/28,5\text{ мг}/\text{л}$),

проявляются в спектрах исследуемых веществ при его добавлении.

Показано, что при дозировке антибиотика $105,4\text{ мг}/28,5\text{ мг}/\text{л}$ при чувствительности микрофлоры к антибиотику исчезают линии на волновых числах 735 см^{-1} и 783 см^{-1} , 986 см^{-1} и 1635 см^{-1} , соответствующие аденину, цитозину, протеинам и амиду I, что говорит об эффективности лече-

ния – разрушении микроорганизма под воздействием антибиотика. Однако было отмечено, что у части пациентов для полного исчезновения этих линий из спектра требовалась более длительная инкубация (от 4,5 до 6 часов).

Результаты проведенного исследования приведены в таблице 3.

Клинический анализ результатов проведенного лечения у данной группы пациентов показал, что у 96 (82 %) из них был достигнут быстрый клинический эффект. У

13 (11,1 %) пациентов пришлось увеличить сроки приёма антибиотика в среднем ещё на 3–5 дней, а у 8 пациентов для ликвидации обострения потребовалось назначение второго антибиотика.

Таким образом данные о чувствительности возбудителей хронического тонзиллита к антибиотику амоксиклав, полученные с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния, статистически не отличались от результатов его применения в клинической практике.

Таблица 3. Результаты определения чувствительности микрофлоры к антибиотику (Амоксиклав) с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния

Table 3. Results of determining the sensitivity of microflora to an antibiotic (Amoxiclav) using the method of Raman spectroscopy

Методы определения эффективности антибиотиков	I группа, n = 117	
	Абс.	%
- количество проб с исчезновением линий на волновых числах 735 см^{-1} и 783 см^{-1} , 986 см^{-1} и 1635 см^{-1} через 2 ч инкубации;	98	83,8
- количество проб с исчезновением линий на волновых числах 735 см^{-1} и 783 см^{-1} , 986 см^{-1} и 1635 см^{-1} через 4 ч инкубации;	12	10,2
- количество проб с исчезновением линий на волновых числах 735 см^{-1} и 783 см^{-1} , 986 см^{-1} и 1635 см^{-1} через 6 ч инкубации	7	6

Выводы

1. Метод спектроскопии комбинационного рассеяния высоко информативен для определения чувствительности микрофлоры к антибиотикам.

2. Указанный метод может быть использован как в клинической практике, так и при проведении скрининговых работ по чувствительности микрофлоры к новым антибиотикам.

Литература/References

- 1 Vladimirova T.Yu. et al. Vozmozhnosti primeneniya antibakterial'nykh sredstv pri khronicheskom tonsillite. *Vestnik otorinolaringologii*. 2017;82(2):55-59.
- 2 Gofman V.V., Bakulina L.S. Pochemu primeneniye antiseptikov i antibiotikov ne dayet zhelayemogo effekta pri lechenii bol'nykh khronicheskim kompensirovannym tonsillitom? *Rossiyskaya otorinolaringologiya*. 2013;2(63):21-25.
- 3 Volchok N.V., Drazhina O.G. Khronicheskiye tonsillity u beremennykh: mikrobnyy spektr i ego chuvstvitel'nost'. *Meditsinskiy zhurnal*. 2015;2:42-44.
- 4 Rybak N.A., Sokolova T.N., Ershova M.V. Antibiotikorezistentnost' mikroflory nebnykh mindalin pri khronicheskom tonsillite. *Zhurnal Grodnenskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2016;2(54):87-89.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Competing interests. The author declares no compet interest.

Финансирование. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Funding. This research received no external funding.

Соответствие нормам этики. Авторы подтверждают, что соблюдены права людей, принимавших участие в исследовании, включая получение информированного согласия в тех случаях, когда оно необходимо, и правила обращения с животными в случаях их использования в работе.

Compliance with ethical principles. The authors confirm that they respect the rights of the people participated in the study, including obtaining informed consent when it is necessary, and the rules of treatment of animals when they are used in the study.

Авторская справка

Буренков Евгений

Сергеевич

руководитель управления развития и инвестиций, Медицинский университет
«Реавиз», Самара, Россия
ORCID 0000-0003-0045-7046