



А. Я. Циганенко,
Ю. В. Пащенко,
М. М. Мішина,
К. Ю. Пащенко, Ю. М. Мішин

Харківський національний
медичний університет

© Колектив авторів

ВПЛИВ ПРОТИМІКРОБНИХ ЗАСОБІВ І ЕФІРНИХ ОЛІЙ НА ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК STREPTOCOCCUS PYOGENES ПРИ ГНІЙНО- ЗАПАЛЬНИХ ІНФЕКЦІЯХ

Резюме. Показано, що в абсолютній більшості спостережень (90,7%) етіологічним чинником інфекційного процесу була асоціація мікроорганізмів. Установлено, що більшість ізолятів була полірезистентною до протимікробних препаратів. Досліджено комбінований вплив антимікробних препаратів і ефірних олій на здатність до формування біоплівки мікроорганізмів. Доведено, що найбільш ефективною комбінацією, що пригнічує формування біоплівки *S. pyogenes*, є комплексне застосування гатифлоксацину й олії лаванди. Результати проведеного дослідження свідчать про доцільність подальшого вивчення впливу ефірних олій на формування біоплівки мікроорганізмів.

Ключові слова: *Streptococcus pyogenes*, біоплівка, гнійно-запальні інфекції, протимікробні засоби, ефірні олії.

Вступ

Актуальність даної проблеми обумовлена зростанням частоти і тяжкості перебігу гнійно-септичних захворювань, причиною яких є гемолітичні стрептококи, а саме *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*).

Незважаючи на досягнення сучасної медицини у боротьбі з госпітальними інфекціями, гнійно-запальні процеси, спричинені *S. pyogenes*, залишаються однією з найскладніших і недостатньо вивчених загальномедичних проблем [3, 5]. Це пов'язано із суперечливістю уявлень про їх патогенез, складнощами діагностики та відсутністю однозначних лабораторних критеріїв [8] з позиції урахування формування *S. pyogenes*-біоплівки як захисної форми їх існування, недостатньою ефективністю сучасної стратегії лікування, в основі якої лежить використання потужних засобів етіотропної терапії.

Головна практична проблема верифікації діагнозу перш за все стосується своєчасного встановлення причини запального процесу, вона пов'язана з необхідністю точного типування *S. pyogenes*. Із огляду на дані про покращення результатів лікування гнійно-запальних інфекцій при ранній адекватній антибактеріальній терапії, протимікробні засоби має призначатися невідкладно після уточнення нозологічного діагнозу і до отримання результатів бактеріологічного дослідження. Після отримання результатів бактеріологічного дослідження режим протимікробної терапії повинен бути скоригований з урахуванням виділеної мікрофлори та її антибіотикочутливості. Тому мікробіологічна діагностика гнійно-септичних процесів є визначальною у виборі адекватних схем антибактеріальної терапії. Отже, адекватній мікробіологічній діагностиці гнійно-запальних інфекцій слід приділяти не менше уваги, ніж питанням вибору режиму терапії [7].

Актуальними є проблеми сучасної діагностики і терапії гнійно-запальних стрептококових інфекцій з позиції того, що ці мікроорганізми утворюють навколо себе захисну плівку й успішно захищаються від дезінфектантів та антибіотичних засобів, шляхом хибного сигналу паралізуючи імунну систему людини [6, 9, 18]. Такий спосіб існування мікроорганізмів створює великі проблеми в медичній практиці у зв'язку з тим, що у складі біоплівки мікроорганізми стійкі до дії дезінфікуючих речовин, антибактеріальних препаратів, антитіл і фагоцитів. Зараз головною метою багатьох досліджень є боротьба з чинниками інфекційних захворювань, руйнування біоплівки мікроорганізмів та здатність впливати на формування їх в організмі [4, 15, 19].

У теперішній час фахівцями різних країн проведено численні дослідження з приводу вивчення формування біоплівки мікроорганізмів та впливу на них екзогенних протеолітичних ферментів. Зареєстровано зниження виживання бактерій у біоплівках у присутності антибіотиків й ферментів, узятих у концентраціях, при яких вони окремо не змінювали кількість КУО в угрупованні [13, 16].

Завдяки втіленню новітніх технологій, удосконаленню методик оперативних втручань, розширенню можливостей антибактеріальної терапії спостерігається позитивна тенденція щодо результатів лікування, але у зв'язку з полірезистентністю багатьох клінічних штамів дослідниками ведеться пошук нових підходів до патогенетичної терапії. Однак ефективність її залишається невисокою.

Останніми роками багатьма дослідниками доведено, що мікроорганізми здатні до організації консорціуму для спільного існування. Вченими розроблена концепція біологічної плівки, що є спеціалізованою екосистемою, яка захищає мікроорганізми від впливу імунних факторів макроор-



ганізму й дії протимікробних засобів [12, 17, 21]. Біоплівки продукують екзополімер, який захищає бактеріальні клітини від факторів імунітету й блокує проникнення антимікробних засобів усередину біоплівки [2, 14, 20, 22].

Тому метою даного дослідження було вивчення впливу протимікробних препаратів й ефірних олій на планктонні клітини клінічних штамів мікроорганізмів і на здатність ізолятів до формування біоплівок.

Матеріали та методи

Для мікробіологічного дослідження матеріал забирали у дітей з гнійною патологією згідно з вимогами до взяття й доставки матеріалу для мікробіологічних лабораторій, запропонованих Національною медичною академією післядипломної освіти імені П.Л. Шупика. Вилучення чистої культури і визначення антибіотикограми проводили за загальноприйнятими у мікробіології методиками [1, 11]. Ферментативну ідентифікацію здійснювали за допомогою наборів Мікро-ла-тест, які призначені для проведення стандартної ідентифікації з використанням мікрометодів й дозволяють проводити індикацію більшості клінічно вагомих мікроорганізмів. Оптичну щільність виміряли за допомогою мікропланшетного ридера «Multiskan EX» (тип 355), що являє собою фотометр зі змінними фільтрами, який здатний проводити стандартні фотометричні вимірювання. Інтерпретацію, аналіз та оцінку результатів проводили за допомогою «ВАСТ-програми» (АТ «Аналітика» м. Москва) та «Ідентифікаційної таблиці» для візуального контролю.

Здатність ізолятів до формування біоплівок вивчали у чашках Петрі (d=4 мм) на стерильному покривному склі та у пластикових плоскодонних мікротитрувальних планшетах, у яких проводили визначення здатності штамів бактерій до адгезії на поверхні 96-коміркових полістиролових планшетів для імуноферментного аналізу. Вимірювали оптичну щільність вихідної бактеріальної суспензії на «Densi-La-Meter» й доводили її концентрацію відповідно до ступенів за McFarland за допомогою суспензійного середовища або фізіологічного розчину. Для більш точного вимірювання оптичної щільності та її корекції бактеріальну суспензію, що відповідала певному ступеню за McFarland, інокулювали у комірки панелі дозатором по 200 мкл у 4 повтореннях. Як негативний контроль вносили 200 мкл поживного бульйону або суспензійного середовища. Кількість інокульованих планктонних клітин підраховували на фотометрі «Multiskan EX 355» при довжині хвилі 540 нм і виражали в умовних одиницях оптичної щільності. Після одержання бактеріальної суспензії з необхідною концентрацією мікроорганізмів у комірки планшета інокулювали по 200 мкл даної суспензії з відповідним поживним середовищем у 4 повтореннях із подальшою інкубацією згідно

з умовами для кожної родини бактерій у вологому контейнері під закритою кришкою планшета. Після інкубації проводили підрахунок кількості клітин на рідері. З комірок панелі вилучали планктонні клітини і забарвлювали плівки. Для цього у комірку вносили 200 мкл фосфатного буферу та 15 мкл 1% спиртового розчину кристалвіолету та інкубували 45 хв при кімнатній температурі. Після триразового промивання фосфатним буфером у комірки для екстракції фарби з плівки додавали 250 мкл 96% етилового спирту та інкубували ще 45 хв при кімнатній температурі й вимірювали оптичну щільність цього розчину при довжині хвилі 540 нм. Інтенсивність забарвлення вмісту комірок відповідала ступеню плівкоутворення. Кількісним вираженням ступеня утворення біоплівки є значення оптичної щільності, що виміряні на спектрофотометрі при 540 нм. Аналіз результатів проводили за допомогою статистичних програм [10].

Результати дослідження та їх обговорення

Проведене мікробіологічне дослідження біоматеріалу з вогнищ запалення при гнійно-запальних інфекціях показало, що в абсолютній більшості спостережень етіологічним чинником інфекційного процесу була асоціація мікроорганізмів переважно зі змішаним характером мікрофлори. Так, багатофакторний мікробіологічний аналіз ексудату при післяопераційних перитонітах показав, що змішаний характер мікрофлори (аеробно-анаеробний) був визначений у 90,7% випадків. При цьому питома вага припадала на асоціацію *S.pyogenes* + *Peptostreptococcus* + *Candida*, що становить 29,1%; *S. pyogenes* + *E. coli* + *Bacteroides* — 14,8% тощо (рис. 1). Аналізуючи отримані дані можна зробити висновок, що переважали асоціації, що мали три й більше мікроорганізмів.

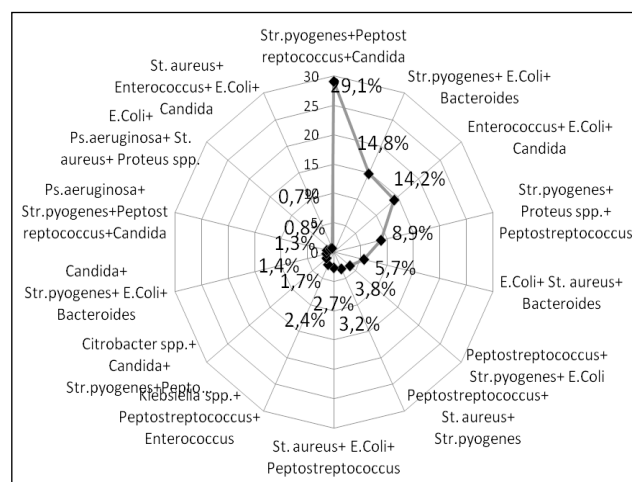


Рис. 1. Мікробні асоціації, що були вилучені при післяопераційному перитоніті у дітей

Усі ізоляти формували біоплівки, але щільність їх відрізнялась залежно від мікробного угруповання (рис. 2, 3).

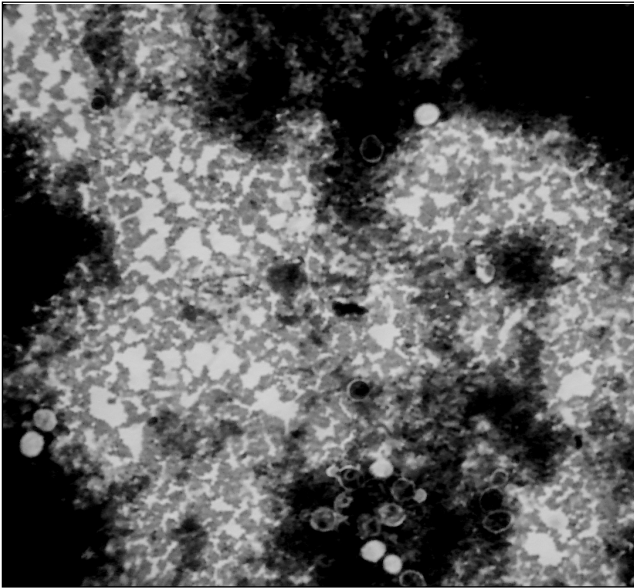


Рис. 2. Змішані біоплівки *S. pyogenes*, *S. aureus* і *E. coli*.

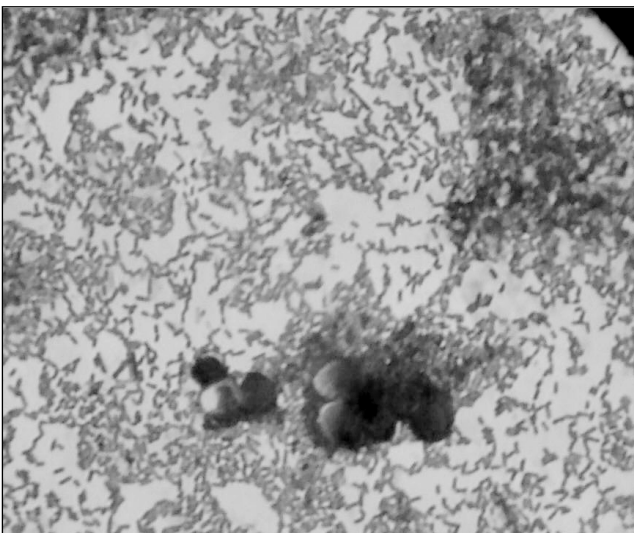


Рис. 3. Змішані біоплівки *S. pyogenes*, *E. coli* та *C. albicans*

У результаті проведеного дослідження було встановлено, що більшість ізолятів була полірезистентною до протимікробних препаратів (рис. 4).

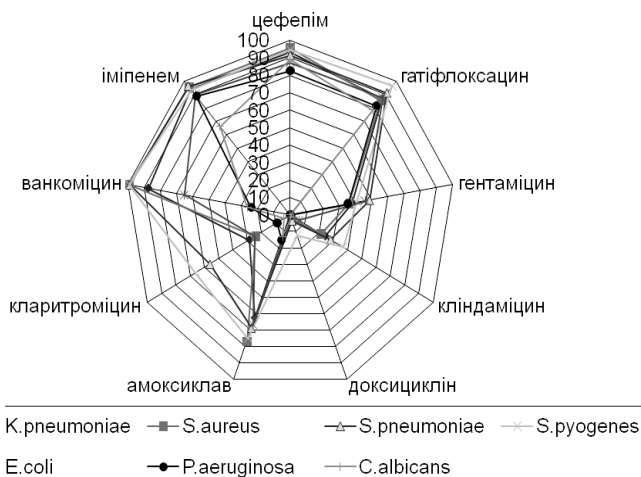


Рис. 4. Антибіотикочутливість ізолятів

Слід зазначити, що до антимікробних препаратів β-лактамового ряду більшість грампозитивних мікроорганізмів була чутлива: *S. pyogenes* до пеніцилінів, цефалоспоринів та карбопенемів був чутливим у 94,8% випадків; *S. aureus* був високочутливим до цефалоспоринів III—IV поколінь та карбопенемів (99,7%); грамнегативна мікрофлора здебільше чутлива до фторхінолонів (83,5%) та цефалоспоринів III—IV поколінь.

Здавна відома висока протимікробна активність ефірних олій. Тому одним із напрямлень наших досліджень було вивчення впливу ефірних олій лаванди, можжевельнику і чайного дерева на здатність до формування біоплівок мікроорганізмів, збудників гнійно-запальних інфекцій. Проведені дослідження показали, що здатність до формування біоплівок у досліджуваних штамів різнилася. Так, штами *S. pyogenes*, вилучені в асоціації з *E. coli* та *C. albicans* із ексудату при післяопераційному перитоніті у дітей, формували біоплівку вже через 6 годин, а з дренажних конструкцій — через 12—18 годин потому. Клінічні штами мікроорганізмів, вилучені у дітей з деструктивною пневмонією, здатні до формування біоплівок через 18—24 години залежно від складу мікробного консорціуму. При додаванні ефірних олій лаванди й чайного дерева у культуральне середовище із подальшим засівом ізолятів ми встановили, що з часом здатність до формування змішаних біоплівок знижується і через добу майже зовсім блокується (рис. 5—9). Такі ж результати ми отримали при моделюванні змішаних біоплівок ізолятів у полістеролових планшетах і при тестуванні ізолятів на здатність до формування біоплівок під впливом ефірних олій. Як порівняння ми дослідили вплив ефірних олій на ізоляти у формі планктону.

Аналіз отриманих результатів показав, що на планктонні клітини *S. pyogenes*, що тестувалися, активну протимікробну дію надавала олія лаванди (рис. 10), потім за ступенем активності пригнічення *S. pyogenes* була олія чайного дерева.

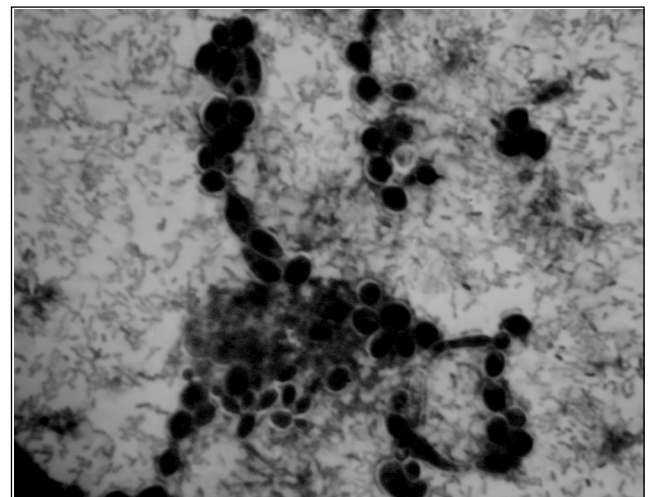


Рис. 5. Біоплівка *S. pyogenes* + *E. coli* + *C. albicans* через 6 годин інкубації з олією лаванди

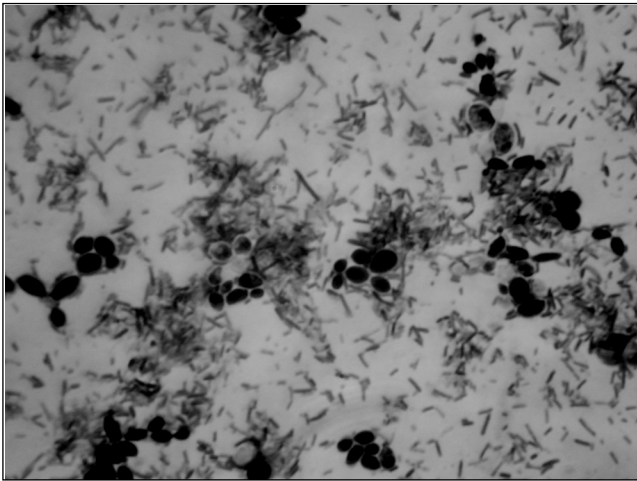


Рис. 6. Біоплівка *S. pyogenes* + *E. coli* + *C. albicans* після 6 годин інкубації з олією чайного дерева

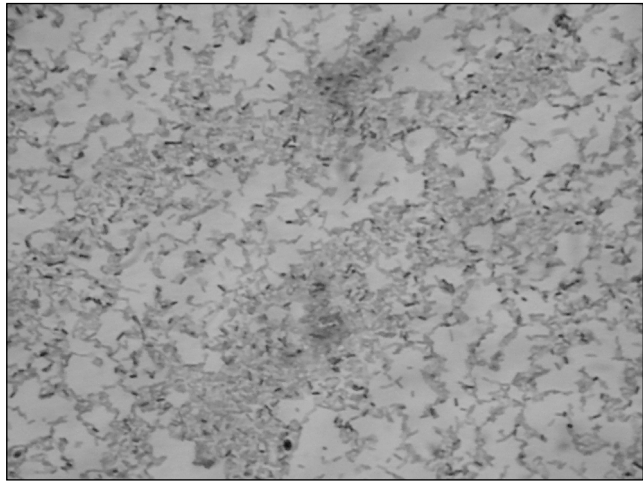


Рис. 7. Біоплівка *S. pyogenes* + *E. coli* через 12 годин інкубації з олією лаванди

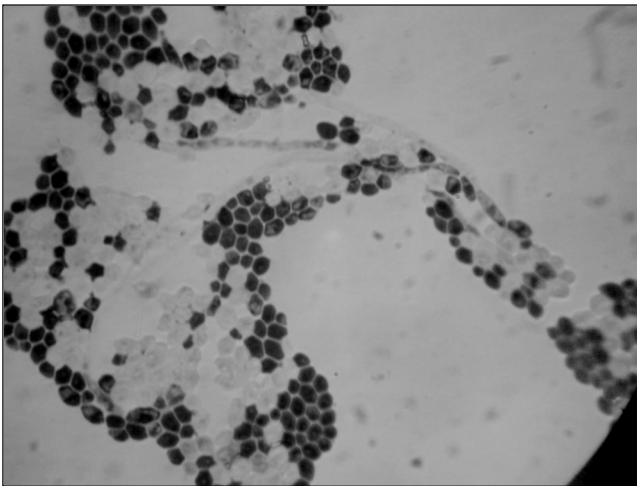


Рис. 8. Біоплівка *S. pyogenes* + *C. albicans* через 18 годин інкубації з олією можжевельнику



Рис. 9. Біоплівка *S. pyogenes* + *E. coli* через 24 години інкубації з олією лаванди та чайного дерева

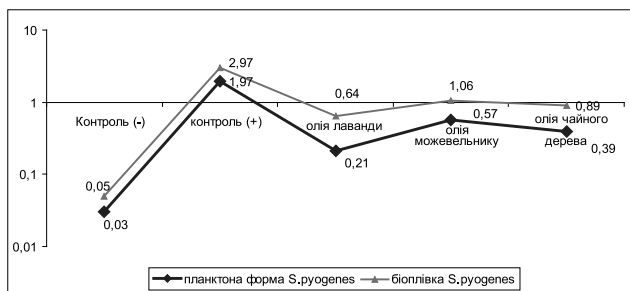


Рис. 10. Вплив ефірних олій на планктонні клітини *S. pyogenes* та на сформовані моноплівки

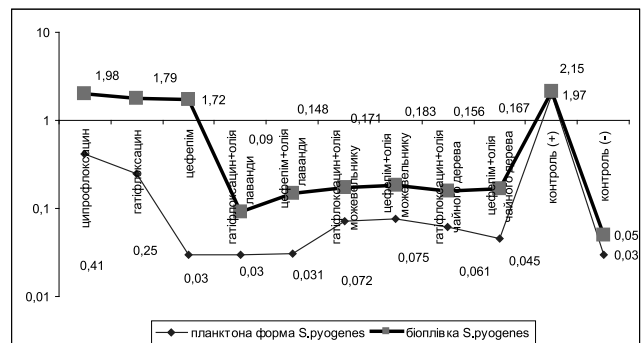


Рис. 11. Вплив ефірних олій та протимікробних препаратів на формування біоплівки *S. pyogenes*

Що стосується впливу олій на формування біоплівок *S. pyogenes*, то проведені дослідження довели, що здатність до формування біоплівок у дослідних штамів різнилась. Так, при додаванні у комірки планшетів олії лаванди в об'ємі 0,03 мкл пригнічувало формування біоплівки усіх *S. pyogenes*, як референтних штамів, так й ізолятів, що тестувалися, а 9 мкл олії чайного дерева пригнічувало формування біоплівки майже усіх ізолятів *S. pyogenes* на 2 добу.

При дослідженні комбінованого впливу антимікробних препаратів і ефірних олій на здатність до формування біоплівок мікроорганізмів було встановлено, що найбільш ефективною комбінацією, що пригнічує формування біоплівок *S. pyogenes*, є комплексне застосування гатифлоксацину та олії лаванди. На рис. 11 видно, що планктонні форми *S. pyogenes* активно чутливі як до протимікробних препаратів, так і до ефірних олій лаванди, можжевельнику та чайного дерева. Однак, *S. pyogenes*



у формі біоплівки виявився не чутливим до протимікробних препаратів і ефірних олій, взятих у дослід окремо (рис. 11).

Висновки

1. Установлено, що протимікробні препарати з групи фторхінолонів (гatifлоксацин) та цефалоспоринів (цефепім) у комбінації з ефірними

оліями виявляють активну дію на формування біоплівки *S. pyogenes*.

2. Найбільш ефективною комбінацією, що пригнічує формування біоплівок мікроорганізмів, є сполучення гатифлоксацину та олії лаванди.

3. Результати проведеного дослідження свідчать про доцільність подальшого вивчення впливу ефірних олій на формування біоплівок мікроорганізмів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баснакьян И. А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами / И. А. Баснакьян. — М.: Медицина, 1992. — 191 с.
2. Борецька М. О. Вплив екзополімерів біоплівки на швидкість мікробної корозії мало вуглецевої сталі / М. О. Борецька, І. П. Козлова // Мікробіологічний журнал. — 2007. — Т. 69, № 4. — С. 40—44.
3. *Внутрибольничные инфекции* / под ред. Р. П. Венцел; пер. с англ. — М.: Медицина, 1990. — 656 с.
4. Вознесенский Н. А. Биопленки — терапевтическая мишень при хронических инфекциях / Н. А. Вознесенский // Пульмонология и аллергология. — 2008. — № 3. — С. 56—64.
5. Григорьев Е. Г. Хирургия тяжелых гнойных процессов / Е. Г. Григорьев, А. С. Коган. — Новосибирск: Наука, 2000. — 314 с.
6. Грузина В. Д. Коммуникативные сигналы бактерий / В. Д. Грузина // Антибиотики и химиотерапия. — 2003. — № 48 (10). — С. 32—39.
7. Заславская Н. В. Особенности выживаемости бактерий в микробных сообществах / Н. В. Заславская, Н. К. Артеменко, М. М. Чижевская, В. В. Тец // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. — 2000. — № 2. — С. 2—19.
8. Козлов Р. С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль / Р. С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2000. — Т. 1, № 2. — С. 16—30.
9. Крестецька С. Л. Аутоіндукція та сигнальна трансдукція: комунікаторні системи в мікробних популяціях / С. Л. Крестецька, А. М. Несторенко // Аналі ін-ту Мечнікова. — 2007. — № 1. — С. 4—9.
10. Методика статистической обработки медицинской информации в научных исследованиях / В. П. Осипов, Е. М. Лукьянова, Ю. Г. Антипкин [и др.] — Киев: Планета людей, 2002. — 200 с.
11. Методические указания по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях / Приложение I к Приказу Министерства здравоохранения СССР от 22 апреля 1985 г. № 535. — 123 с.
12. Михайлова Е. С. Способность к формированию биопленок у микроорганизмов, выделенных их верхних отделов ЖКТ больных хроническим холециститом и ЖКБ / Е. С. Михайлова, Ю. В. Червинец // Успехи современного естествознания. — 2009. — № 7. — С. 5—9.
13. Мошкевич И. Р. Микробные биопленки при смешанных инфекциях : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 03.00.07 «Мікробіологія» / И. Р. Мошкевич — СПб., 2007. — 20 с.
14. Овнянц К. О. Ультраструктурная архитектура межклеточных контактов в биопленках бактерий in vivo и in vitro / К. О. Овнянц, А. А. Трчунян // Национальная академия наук Армении. — 2009. — № 1. — С. 78—85.
15. Пуріш Л. М. Динаміка сукцесійних змін у сульфідогенній мікробній асоціації за умов формування біоплівки на поверхні сталі / Л. М. Пуріш, Л. Г. Асауленко // Мікробіологічний журнал. — 2007. — Т. 69, № 6. — С. 19—5.
16. Тец В. В. Бактериальные сообщества / В кн.: Клеточные сообщества / под ред. В. В. Теца. — СПб., 1998. — С. 15—73.
17. Тец В. В. Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактрии / В. В. Тец, Г. Ю. Кнорринг, Н. К. Артеменко // Біохімічні основи ензимотерапії. — 2009. — С. 6—15 // Бібліотека і доступність інформації у сучасному світі: електронні ресурси в науці, культурі та освіті : [Електронний ресурс]. — Режим доступу: <http://www/solvay-pharma.ru>.
18. Товмасян А. С. Значение симбиотических взаимодействий пиогенного стрептококка при хроническом тонзиллите : автореф. дис. на соискание науч. степени канд. мед. наук : спец. 03.00.07 «Мікробіологія» / А. С. Товмасян. — М., 2009. — 20 с.
19. Costerton J. W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg // Science. — 1999. — Vol. 284. — P. 1318—1322.
20. Ghannoum M. Microbial biofilms / M. Ghannoum, G. A. O'Toole eds. — Washington, 2004.
21. Leonardo M. R. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth / M. R. Leonardo, M. A. Rossi, L. A. Silva, K. C. Bonifacio // J. Endod. — 2002. — Vol. 28. — P. 815—818.
22. O'Toole G. A. Biofilm formation as microbial development / G. A. O'Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter // Ann. Rev. Microbiol. — 2000. — Vol. 54. — P. 49—79.



ВЛИЯНИЕ
ПРОТИВОМИКРОБНЫХ
СРЕДСТВ И ЭФИРНЫХ
МАСЕЛ НА ФОРМИРОВАНИЕ
БИОПЛЕНОК
STREPTOCOCCUS
PYOGENES ПРИ ГНОЙНО-
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ
ИНФЕКЦИЯХ

*А. Я. Цыганенко,
Ю. В. Пащенко, М. М. Мишина,
К. Ю. Пащенко, Ю. М. Мишин*

Резюме. Показано, что в абсолютном большинстве наблюдений (90,7%) этиологическим фактором инфекционного процесса была ассоциация микроорганизмов. Установлено, что большинство изолятов были полирезистентными к противомикробным препаратам. Исследовано комбинированное воздействие антимикробных препаратов и эфирных масел на способность микроорганизмов формировать биопленки. Доказано, что наиболее эффективной комбинацией, которая подавляет формирование биопленок *S. pyogenes*, является комплексное применение гатифлоксацина и масла лаванды. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о целесообразности последующего изучения влияния эфирных масел на формирование микроорганизмами биопленок.

Ключевые слова: *Streptococcus pyogenes*, биопленки, гнойно-воспалительные инфекции, противомикробные средства, эфирные масла.

INFLUENCE OF
ANTIBACTERIAL
MEDICATIONS AND
ESSENTIAL OILS ON
STREPTOCOCCUS PYOGENES
BIOFILM FORMATION
AT PYOINFLAMMATORY
INFECTIONS

*A. Ya. Tsyganenko,
Yu. V. Pashchenko,
M. M. Mishina,
K. Yu. Pashchenko,
Yu. M. Mishin*

Summary. It is shown that in absolute majority of supervisions (90,7%) the etiologic factor of infectious process was an association of microorganisms. It is set that most isolates were resistant to antibacterial medications. The combined affect of antimicrobial medications and essential oils on the ability of microorganisms to form biofilms is investigated. It is well-proven that the most effective combination, which represses forming of biofilms of *S. pyogenes* is complex application of gatifloxacin and lavender oil. The results of the conducted research testify about expedience of subsequent study of influence of essential oils on the ability of microorganisms to form biofilms.

Key words: *Streptococcus pyogenes*, biofilms, pyoinflammatory infections, antibacterial medications, essential oils.