

О.І. Сідашенко, Т.М. Шевченко, О.С. Воронкова, О.А. Сірокваша,  
А.І. Вінніков

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара,  
пр-т Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, Україна,  
e-mail: microb\_sidashenko@mail.ru

## ВПЛИВ ФТОРХІНОЛОНІВ НА БІОПЛІВКИ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

**Мета.** Вивчити вплив офлоксацину та левофлоксацину на сформовані біоплівки бактерій клінічних штамів *Staphylococcus epidermidis*. **Методи.** Стійкість до антибіотиків визначали методом дисків з фторхінолонами різних поколінь: налидиксова кислота, піпемідинова кислота, ципрофлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин, левофлоксацин, спарфлоксацин. Формування біоплівки стафілококами моделювали мінімальні пригнічувальні концентрації (МПК) антибіотиків для планктонної культури, які визначали методом серійних розведень. Формування біоплівки стафілококами моделювали у імунологічних лункових планшетах. **Результати.** Показано, що офлоксацин у концентрації, що у 100 разів перевищує МПК для формування біоплівки, зменшує сумарну кількість бактерій 24-годинної біоплівки більше ніж у 40000 разів, а 48-годинної – у 31000 разів, при застосуванні такої ж концентрації левофлоксацину при внесенні до 24-годинної біоплівки – у 9100 разів, до 48-годинної біоплівки – у 7400 разів. **Висновок.** Офлоксацин у концентрації, яка перевищує у 100 разів МПК для формування біоплівки у 4,5 та 4,2 рази більш ефективний відносно 24-годинної та 48-годинної біоплівки відповідно порівняно з аналогічною концентрацією левофлоксацину.

**Ключові слова:** *Staphylococcus epidermidis*, біоплівка, офлоксацин, левофлоксацин, пригнічувальна концентрація.

Останнім часом відмічається збільшення кількості випадків, коли антибактеріальні препарати та їх комплекси стають неефективними у лікуванні інфекційних процесів. Значну роль у цьому відіграє біоплівкова структурна організація бактерій. У складі біоплівки умовно-патогенні бактерії набувають ознак підвищеної стійкості до антибіотиків та інших чинників довкілля. Бактерії, що формують біоплівку, викликають близько 65–80% усіх інфекційних захворювань [14, 15]. Одними з найбільш відомих бактерій, що формують біоплівку є стафілококи [2, 3, 12]. Вони часто викликають позалікарняні нозокоміальні інфекції [7], а також біоплівкові інфекції верхніх дихальних шляхів, шкіри та м'яких тканин, ендокардити, ураження сечовидільної системи тощо [2].

Біоплівка суттєво підвищує стійкість мікроорганізмів до імунної системи хазяїна, антимікробних препаратів [12, 13] і впливу негативних факторів навколишнього середовища [4, 9]. Стійкість бактерій у біоплівці може виража-



тися у високій резистентності до чинників, які їх пригнічують за умов перебування у планктонній культурі [1].

Вочевидь, що проникнення антибіотиків у біоплівки пов'язане з перенесенням кризь ліпіди поверхневих оболонок матриксу, які є однаковими за якісним складом з ліпідами бактеріальних мембран. У зв'язку з цим, вважають, що більш ефективно діяти на бактеріальні біоплівки будуть антибіотики, що здатні проникати через клітинну стінку бактерії. До таких препаратів відносять фторхінолони [9].

Метою роботи було вивчити вплив офлоксацину та левофлоксацину на сформовані біоплівки бактерій клінічних штамів *Staphylococcus epidermidis*.

### Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були 20 біоплівкоутворювальних штамів *Staphylococcus epidermidis* з колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпропетровського національного університету імені О. Гончара.

Стійкість до фторхінолонів визначали відповідно до критеріїв рівнів стійкості/чутливості бактерій до антибіотиків [5]. Для цього використовували диски з фторхінолонами різних поколінь: налідиксова кислота, піпемідинова кислота, ципрофлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин, левофлоксацин, спарфлоксацин (ТОВ «Аспект», РФ).

МПК фторхінолонів для планктонної культури визначали методом серійних розведень.

МПК фторхінолонів, що впливають на утворення біоплівки, визначали в імунологічному планшеті. Для отримання біоплівок стафілококу в лунки 96-лункового імунологічного планшета вносили по 0,2 мл м'ясо-пептонного бульйону (МПБ). Із основного розчину антибіотика (1 г у 10 мл 0,5% NaCl) відбирали по 0,05 мл і вносили в першу лунку планшета, після чого робили серійні розведення антибіотика. Потім у кожен лунку вносили по 0,05 мл бактеріальної суспензії, яка містила  $3,3 \times 10^6$  кл/мл та інкубували при 37 °С. Остання лунка планшета, в якій не відбувалося формування біоплівки протягом 72 год, відповідала МПК антибіотика. Для визначення МПК для планктонної культури антибіотика брали у кінцевих концентраціях від 0,05–0,3 мкг/мл, а для МПК, що пригнічує формування біоплівки у 96-лунковому планшеті – 0,1–3,0 мкг/мл.

Вивчення впливу підвищених концентрацій фторхінолонів на сформовану біоплівку *S. epidermidis* проводили за допомогою модифікованої методики [11] у 6-лункових планшетах. Для цього у кожен лунку вносили по 0,4 мл бактеріальної суспензії *S. epidermidis* та поміщали планшет до термостату при 37 °С на 3 год, потім додавали по 1,6 мл МПБ. Фторхінолони додавали до лунок планшета під час засіву бактеріальної суспензії, потім до сформованих впродовж 24 та 48 год біоплівок. Антибіотики вносили у концентраціях, що перевищували МПК формування біоплівки у 10, 50 та 100 разів. Облік результатів проводили через 24 год після внесення антибіотика. Для цього з лунок планше-



ту відбирали залишки поживного середовища, а біоплівку, яка залишалася на дні лунок промивали ізотонічним розчином 0,5% NaCl та переносили у скляний гомогенізатор для гомогенізації та вивільнення клітин. З отриманої суспензії робили розведення та проводили висів на м'ясо-пептонний агар (МПА) для підрахунку кількості колоніє-утворювальних одиниць (КУО).

Обробку результатів проводили за допомогою комп'ютерної програми MS Excel.

### Результати та їх обговорення

Вивчення стійкості до фторхінолонів другого та третього покоління (рис. 1) офлоксацину та левофлоксацину, показало, що вони пригнічують усі 20 штамів *S. epidermidis* у планктонній культурі.

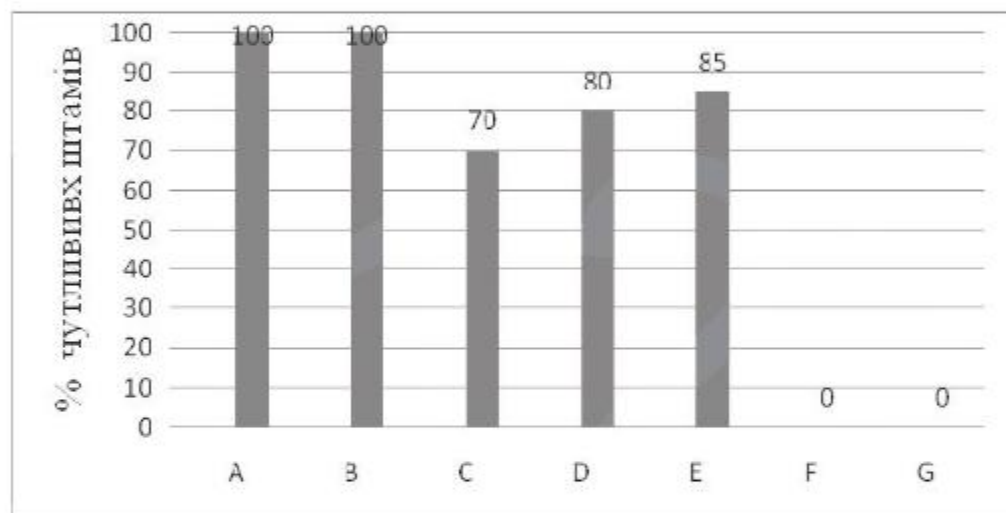


Рис. 1. Частота виявлення чутливих до фторхінолонів штамів *S. epidermidis*

Примітка: А – офлоксацин, В – левофлоксацин, С – ципрофлоксацин, D – норфлоксацин, E – спарфлоксацин, F – налідиксова кислота, G – піпемідинова кислота

Fig. 1. Incidence of antibiotic-sensitive film-forming strain of *S. epidermidis* for fluoroquinolones medicines

Note: A – ofloxacin, B – levofloxacin, C – ciprofloxacin, D – norfloxacin, E – sparfloxacin, F – nalidixic acid, G – piperimidic acid

До ципрофлоксацину виявили чутливість 14 штамів (70%), до норфлоксацину – 16 (80%), до спарфлоксацину – 17 (85%). Помірночутливих та стійких серед досліджених штамів стафілококів не виявлено. Всі досліджувані штамми виявили стійкість до фторхінолонів першого покоління – налідиксової та піпемідинової кислот.

На основі отриманих результатів у подальших дослідженнях вивчали вплив офлоксацину та левофлоксацину на формування бактеріями біоплівки та сформовану біоплівку.

За результатами, які були отримані раніше, відомо, що МПК офлоксацину та левофлоксацину для планктонних культур були у середньому в 2 рази нижчі за МПК, які гальмували формування біоплівки.

Відомо, що бактерії у складі біоплівки характеризуються підвищеною стійкістю до антибіотиків та негативних чинників навколишнього середовища [2, 3]. В зв'язку з цим визначені для планктонної культури МПК антибіотиків не впливають на бактерії вже сформованої біоплівки. Тому в подальшому вивчали вплив на сформовані протягом 24 та 48 годин біоплівки офлоксацину та левофлоксацину у концентраціях, що перевищують МПК для біоплівкових культур у 10, 50 та 100 разів.

Встановлено, що за таких концентрацій офлоксацину та левофлоксацину, внесених разом з бактеріальною суспензією стафілококів, формування біоплівки не спостерігали.

Після додавання офлоксацину у концентрації, що перевищує МПК біоплівкоутворення у 10 разів (табл. 1) до середовища зі сформованою 24 годинною біоплівкою, було встановлено, що кількість бактерій у біоплівці на наступну добу після внесення антибіотику зменшилася у 455 разів порівняно з контролем, а у 48 годинній біоплівці – у 250 разів.

Так як бактерії 24 та 48 годинні біоплівки, до яких вносили антибіотик, продовжували культивування у поживному середовищі та їх вік збільшувався на 24 години, тому контролем виступали 48 та 72 годинні біоплівки.

Таблиця 1

Сумарна кількість бактерій (КУО) *S. epidermidis* у сформованій біоплівці за дії офлоксацину

Table 1

The total bacteria number of biofilm *S. epidermidis*, formed under the influence of ofloxacin (CFU)

Вік біоплівки (годин)	Концентрація офлоксацину			
	Контроль	10 МПК	50 МПК	100 МПК
24	$(3,1 \pm 0,3) \times 10^6$	$(6,8 \pm 1,3) \times 10^3$	$(7,4 \pm 2,3) \times 10^2$	$(0,7 \pm 0,1) \times 10^2$
48	$(2,9 \pm 0,4) \times 10^9$	$(1,1 \pm 0,2) \times 10^7$	$(8,7 \pm 2,4) \times 10^5$	$(9,0 \pm 2,1) \times 10^4$

Примітка: облік результатів проводили через 24 години після внесення офлоксацину  
 Note: the record of the results was performed the next day after adding of ofloxacin

При внесенні до 24 годинної біоплівки офлоксацину у концентрації, що перевищує МПК для формування біоплівки у 50 разів, встановлено зменшення сумарної кількості бактерій у складі біоплівки на наступну добу після внесення антибіотику у 4150 раз, при додаванні тієї ж концентрації офлоксаци-



ну до 48 годинної біоплівки кількість бактерій у біоплівці знижувалася у 3200 разів порівняно з біоплівками, що формувалися у середовищі без антибіотиків. Після додавання антибіотика у концентрації 100 МПК до 24 годинної біоплівки виявлено сумарне зменшення кількості бактерій у біоплівці на наступну добу у 41400 рази, а до 48 годинної біоплівки – у 31000 разів.

Після додавання левофлоксацину у концентрації, що у 10 разів перевищувала МПК для формування біоплівки до рідкого поживного середовища, в якому знаходились сформовані протягом 24 та 48 годин біоплівки, було визначено, що сумарна кількість бактерій у біоплівках на наступну добу досліджень знижувалася, як і при використанні офлоксацину, на два порядки.

При внесенні до 24 годинної біоплівки дослідних штамів левофлоксацину (табл. 2) у концентрації, що у 10 разів перевищувала МПК біоплівкоутворення, сумарна кількість бактерій біоплівки на наступну добу після внесення антибіотика знижувалася у 195 разів, до 48 годинної – у 100 раз порівняно з біоплівкою, що формувалася без антибіотика.

Таблиця 2

Сумарна кількість бактерій (КУО) *S. epidermidis* у сформованій біоплівці за дії левофлоксацину

Table 2

The total bacteria number of the biofilm *S. epidermidis*, formed under the influence of levofloxacin (CFU)

Вік біоплівки	Концентрація левофлоксацину			
	Контроль	10 МПК	50 МПК	100 МПК
24	$(4,8 \pm 1,2) \times 10^6$	$(2,4 \pm 0,9) \times 10^4$	$(1,5 \pm 0,3) \times 10^3$	$(5,2 \pm 1,5) \times 10^2$
48	$(3,6 \pm 0,8) \times 10^9$	$(3,6 \pm 1,0) \times 10^7$	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^6$	$(4,8 \pm 0,7) \times 10^5$

Примітка: облік результатів проводили через 24 години після внесення левофлоксацину  
Note: the record of the results was performed after adding of levofloxacin in 24 hours

При внесенні до 24 годинної біоплівки препарату у концентрації, що у 50 разів перевищувала МПК біоплівкоутворення, відмічали зменшення кількості бактерій у біоплівках дослідних штамів на наступну добу після внесення антибіотика у 3150 раз, при додаванні тієї ж концентрації левофлоксацину до 48 годинної біоплівки сумарна кількість бактерій у складі біоплівки знижувалася у 2450 раз, порівняно з контрольними біоплівками.

Після внесення до 24 годинної біоплівки левофлоксацину у концентрації, що у 100 разів перевищує МПК біоплівкоутворення, спостерігали зменшення кількості бактерій у біоплівці на наступну добу досліджень у 9100 раз, при додаванні вказаної концентрації левофлоксацину до 48 годинної біоплівки кіль-

кість бактерій у біоплівці знижувалася у 7400 рази порівняно з біоплівкою, що формувалася без антибіотика.

Таким чином, можна заключити, що більш ефективно антибіотики у концентраціях 10, 50 та 100 МПК впливали на 24 годинну біоплівку, порівняно з 48 годинною. Серед антибіотиків більш ефективним виявився офлоксацин з концентрацією у 100 разів вищою за МПК для біоплівкової культури, так як відбувалося зниження кількості бактерій у біоплівці понад 40000 раз.

При дослідженні впливу фторхінолонів на різні грампозитивні та грамнегативні бактерії показано [9, 10], що під час засіву бактеріальної суспензії для формування біоплівки їх додавання у кількостях, що відповідали 50 або 100 МПК, у всіх досліджуваних штамів відбувалося значне зниження кількості бактерій у біоплівках. Біоплівки різних штамів одного й того ж виду, наприклад стафілококів, псевдомонад та ентерококів, по різному реагували на однакові концентрації того ж антибіотика. Так, для більшості штамів стафілококів відбувалося зниження кількості бактерій біоплівки у  $10^3$ – $10^4$  разів, а для штамів псевдомонад лише у 10–15 разів.

Додавання фторхінолонів у кількостях, що відповідають 50–200 МПК до 24 годинної біоплівки різних видів стафілококів, ентеробактерій, кишкової та синьогнійної палички, призводило до зменшення числа бактерій у 10–100 разів [9].

В ході наших досліджень встановлено, що внесення фторхінолонів під час засіву бактеріальної суспензії призводило до повного пригнічення формування біоплівки та росту культури. Внесення до добової біоплівки фторхінолонів у концентраціях, що відповідають 50–100 МПК відбувалося зниження кількості бактерій у  $10^2$ – $10^4$  разів порівняно з біоплівками, що розвивалися у середовищах без антибіотиків. Тому, можна заключити, що активність антибактеріальних препаратів залежить не тільки від виду бактерій, але й від того в якій формі існування перебувають бактерії – планктоні чи у складі біоплівки.

При аналізі отриманих нами результатів порівняно з даними літератури [8, 9, 10] можна відмітити, що фторхінолони здійснювали значний вплив на формування та добову біоплівку. Але у нашому випадку внесення досліджуваних препаратів під час засіву бактеріальної суспензії призводило до повного пригнічення формування біоплівки.

У ході наших досліджень встановлено, що внесення антибіотиків у кількостях, відповідних 50 та 100 МПК, призводило до зниження кількості бактерій у  $10^2$ – $10^4$  разів, тоді як за даними інших авторів [9, 10] внесення антибіотиків у кількостях 50–200 МПК до добової біоплівки призводило до зменшення числа КУО у 10–100 разів. Отже, проблема стійкості бактерій біоплівки має принципове значення під час добору оптимальних антибіотиків, визначенні МПК та вивченні їх впливу на мікроорганізми. Такі дослідження є теоретичною основою розробки схем раціонального застосування антибіотиків у лікуванні інфекцій, що ускладнені формуванням біоплівок.



УДК 579.61:616-078

**О.И. Сидашенко, Т.Н. Шевченко, О.С. Воронкова,  
Е.А. Сирокваша, А.И. Винников**

Днепропетровский национальный университет имени Олеса Гончара,  
пр-т Гагарина, 72, Днепропетровск, Украина,  
e-mail: microb\_sidashenko@mail.ru

### **ВЛИЯНИЕ ФТОРХИНОЛОНОВ НА БИОПЛЕНКИ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS***

#### **Реферат**

**Цель работы.** Изучить влияние офлоксацина и левофлоксацина на сформированные биопленки бактерий клинических штаммов *Staphylococcus epidermidis*. **Методы.** Устойчивость к антибиотикам определяли методом дисков с фторхинолонами разных поколений: налидиксовая кислота, пипемидиновая кислота, цiproфлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин, левофлоксацин, спарфлоксацин. Формирование биопленки стафилококками моделировали минимальные подавляющие концентрации (МПК) антибиотиков для планктонной культуры, определяли методом серийных разведений. Формирование биопленки стафилококками моделировали в иммунологических луночных планшетах. **Результаты.** Показано, что офлоксацин в концентрации, что в 100 раз превышает МПК для формирования биопленки приводит к снижению суммарного количества бактерий 24-часовой биопленки более чем в 40000 раз, а 48-часовой – в 31000 раз, при применении такой же концентрации левофлоксацина при внесении к 24-часовой биопленки – в 9100 раз, 48-часовой биопленки – в 7400 раз. **Выводы.** Офлоксацин в концентрации, превышающей в 100 раз МПК для формирования биопленки в 4,5 и 4,2 раза более эффективен в отношении 24-часовой и 48-часовой биопленки соответственно по сравнению с аналогичными концентрациями левофлоксацина.

**Ключевые слова:** *Staphylococcus epidermidis*, биопленка, офлоксацин, левофлоксацин, подавляющая концентрация.

**O.I. Sidashenko, T.M. Shevchenko, O.S. Voronkova, O.A. Sirokvasha,  
A.I. Vinnikov**

Dnipropetrovsk National University named after Oles Gonchar,  
72, Ave. Gagarin, Dnipropetrovsk, Ukraine,  
e-mail: microb\_sidashenko@mail.ru

### **FLUOROQUINOLONE INFLUENCE UPON *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* BIOFILM**

#### **Summary**

**Aim.** To study the effect of ofloxacin and levofloxacin on biofilm of *Staphylococcus epidermidis* clinical strains. **Methods.** Resistance to antibiotics was



determined by the method of discs with fluoroquinolones of different generations: nalidixic acid, piperimidic acid, ciprofloxacin, ofloxacin, norfloxacin, levofloxacin, sparfloxacin. The formation of biofilm by staphylococci modeled minimum inhibitory concentration (MIC) of antibiotics for planktonic culture, it was determined by the method of serial dilutions. The formation of biofilm by staphylococci was modeled in immunological well plates. **Results.** It is shown that ofloxacin in concentrations 100 times higher than the MIC for biofilm formation reduces the bacteria on 24 hours biofilm more than 40000 times, on 48 hour – 31000 times, the application of the same concentration of levofloxacin to 24 hours biofilm – in 9100 times, to 48 hours biofilm – in 7400 times. **Conclusions.** Ofloxacin in the concentration exceeding 100 times the MIC for biofilm formation by 4.5 and 4.2 times more effective against 24 hour and 48 hour biofilm, respectively, compared with the same concentration of levofloxacin.

**Key words:** *Staphylococcus epidermidis*, biofilm, ofloxacin, levofloxacin, inhibitory concentration.

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Афиногенова А. Г., Даровская Е. Н. Микробные биопленки ран: состояние вопроса // Травматология и ортопедия России. – 2011. – Т. 61, № 3. – С. 119–125.
2. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биопленки и инфекции // Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 4–15.
3. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 1. – С. 101–108.
4. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 2. – С. 149–163.
5. Наказ МОЗ України № 167 від 05.04.2007 «Про затвердження методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів». – К: МОЗ України, 2007. – 63 с.
6. Сідашенко О.І., Воронкова О.С., Сірокваша О.А., Вінніков А.І. Чутливість до антибіотиків планктонних та біоплівкових культур *Staphylococcus epidermidis* // Микробиологія та біотехнологія. – 2014. – Т. 25, № 1. – С. 63–71.
7. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбекян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 4. – С. 435–446.
8. Тец В.В. Бактериальные сообщества. Клеточные сообщества. СПб.: Изд-во СПб ГМУ. – 1998. – С. 73.
9. Тец В.В. Микроорганизмы и антибиотики. Инфекции кожи, мягких тканей, костей и суставов. СПб.: КЛЕ-Т. – 2006. – С. 128.





10. Тец Г.В., Артеменко Н.К., Заславская Н.В., Тец В.В. Особенности совместного действия левофлоксацина и ДНКазы на биопленки возбудителей урогенитальных инфекций // Урология. – 2012. – № 1. – С. 21–24.

11. Тец В.В., Кнорринг Г.Ю., Артеменко Н.К., Заславская Н.В., К.Л. Артеменко Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактерии // Антибиотики и химиотерапия. – 2004. – № 12 – С. 9–13.

12. Чеботарь И.В. Таланин Е.А., Кончакова Е.Д. Новый метод количества учета кокков в надклеточных образованиях – кластерах и биопленке // Стоματοлогия, травматология, микробиология. – 2010.– № 3 – С. 14–17.

13. Чернявский В.И. Бактериальные биопленки и инфекции (лекции). // Анналы мечниковского института. – 2013. – № 1. – С. 86–90.

14. Cirioni O. RNAIII-inhibiting peptide significantly reduces bacterial load and enhances the effect of antibiotics in the treatment of central venous catheter-associated *Staphylococcus aureus* infections // J. of Inf. Dis. – 2006. – № 193. – P. 180–186.

15. Pace J.L., Rupp M.E., Finch R.G. Biofilms, infection, and antimicrobial therapy // Boca Raton: Taylor & Francis Group. – 2006. – P. 495.

Стаття надійшла до редакції 14.04.2014 р.

