

Онищенко П. С., Гаврилюк В. Г.

УДК 579.22

ВИВЧЕННЯ МЕТАБОЛІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ КЛІНІЧНИХ ШТАМІВ СТАФІЛОКОКІВ З РІЗНИМ СТУПЕНЕМ СТІЙКОСТІ ДО АНТИБІОТИКІВ

П. С. ОНИЩЕНКО, магістр кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології

E-mail: ovod.74@i.ua

В. Г. ГАВРИЛЮК, кандидат біологічних наук, доцент кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології

Дніпровський національний університет ім. Олеся Гончара

E-mail: 2434868@ukr.net

Анотація. Для проведення моніторингу прояву ряду ознак у клінічних ізолятів стафілококів, виділених із дихальної та травної системи пацієнтів Лікувально-діагностичного центру (м. Дніпро), була визначена їх здатність до формування біоплівки. В результаті експериментів по культивуванню досліджуваних штамів стафілококів в умовах *in vitro* виявлено досить високу здатність до плівкоутворення у коагулазопозитивних варіантів – 60% випадків, а серед коагулазонегативних тільки 33% культур утворювали біоплівки. Порівняльний аналіз результатів визначення стійкості до антибіотиків у клінічних штамів стафілококів показав, що плівкоутворюючі варіанти проявляли більш високі рівні резистентності до всіх досліджуваних антибіотичних препаратів на відміну від ізолятів, які не утворювали біоплівки. Явище антибіотикорезистентності частіше реєструвалось у коагулазопозитивних стафілококів і значно менше – у коагулазонегативних видів. Інтенсивність катаболізму у досліджуваних штамів стафілококів визначали по загальній активності дегідрогеназ за результатами відновлення трифенілтетразолійхлориду до трифенілформазау. Оцінка даних виміру оптичної густини інтенсивності кольорової реакції свідчить, що з набуттям стійкості до антибіотиків у стафілококів ферменти катаболічного обміну проявляють активність в меншому ступені у порівнянні з чутливими варіантами та, чим до більшої кількості антибіотиків клінічні ізоляти стафілококів мають стійкість, тим нижчий рівень активності дегідрогеназ у них виявляється. Всі плівкоутворюючі штами виявились більш метаболічно інертними на відміну від стафілококів не здатних до утворення біоплівки.

Ключові слова: стафілококи, антибіотикорезистентність, біоплівки, катаболічна активність

Актуальність. Проблема розповсюдження стафілококових інфекцій пов'язана не стільки з частотою виникнення гострих форм, скільки з розвитком хронічних рецидивуючих захворювань. Це обумовлено, по-перше, швидким

Онищенко П. С., Гаврилюк В. Г.

набуттям стійкості до антибіотиків у стафілококів в силу пластичного метаболізму та інтенсивністю процесів генетичної рекомбінації в популяціях цих бактерій, і по-друге, їх здатністю до формування на природних і штучних поверхнях біоплівки, які є основним фактором патогенезу захворювань з хронічним перебігом [6,10,12].

Існування бактерій у складі біоплівки призводить до утворення додаткових механізмів антибіотикорезистентності; виникнення в їх клітинах обхідних метаболічних шляхів утилізації доступних субстратів або уповільнення вже існуючих схем біохімічних реакцій; підвищення їх стійкості до факторів довкілля та протистояння природній резистентності макроорганізму [1,11].

На сьогоднішній день існує чимало відомостей щодо процесів формування біоплівки та особливостей поведінки мікроорганізмів, що їх утворюють, але багато з них носять не достатньо інформативний чи навіть суперечливий характер.

У зв'язку з цим **метою роботи** було проведення порівняльного аналізу ступеню прояву стійкості до антибіотиків та катаболічної активності дегідрогеназ у плівкоутворюючих і не здатних до утворення біоплівки клінічних штамів стафілококів.

Матеріали та методи дослідження. Як об'єкт дослідження були відібрані 20 клінічних штамів коагулазопозитивних і коагулазонегативних стафілококів виділених із біотопів дихальної та травної систем пацієнтів Інституту гастроентерології НАНУ (м. Дніпро). Визначення чутливості до антибіотичних препаратів у виділених культур стафілококів проводили диско-дифузійним методом з використанням комерційних паперових дисків, які містили регламентовані концентрації антибіотиків різних класів.

Здатність стафілококів до плівкоутворення визначали на стерильних 96-луночкових імунологічних планшетах (Медполімер, РФ). Для цього добову культуру суспендували в ізотонічному розчині NaCl (0,5%) за стандартом каламутності 1×10^9 КУО/мл. Отриману суспензію у об'ємі 50 мкл вносили у

Онищенко П. С., Гаврилюк В. Г.

лунки планшету зі 150 мкл інкубаційного середовища (МПБ). Культивування проводили протягом 3-х діб (72 год.) при 37°C. По завершенні інкубування видаляли залишки середовища і реєстрували наявність або відсутність сформованої біоплівки на стінках лунок планшету [1].

Ступінь прояву катаболічної активності у досліджуваних штамів стафілококів виявляли в кількісній реакції відновлення трифенілтетразолійхлориду (ТТХ) до формазану. Інтенсивність забарвлення утвореного формазану свідчить про активність дегідрогеназ, оскільки між кількістю утвореного трифенілформазану (ТФФ) та оптичною густиною існує лінійна залежність: трифенілтетразолійхлорид, безколірний у розчині, під дією дегідрогеназ бактеріальних клітин перетворюється на нерозчинний у воді трифенілформазан червоного кольору. Чим інтенсивніше червоний колір дослідженої проби, тим більша активність катаболічних ферментів проявляється у мікроорганізмів. Для проведення кількісної реакції до суспензії стафілококів, доведеної до стандарту каламутності 1×10^9 КУО/мл, додавали 1%-ний розчин глюкози та інкубували з 1%-ним розчином ТТХ при температурі 37⁰ С. Після обробки етанолом проводили виміри оптичної густини інтенсивності забарвлення проби методом колориметрії при довжині хвилі 540 нм проти контролю [4]. Достовірність отриманих результатів було підтверджено у трьох повторах кожної серії експериментів.

Результати дослідження та їх обговорення. Для проведення моніторингу прояву ряду ознак у клінічних ізолятів стафілококів, по-перше, була визначена їх здатність до формування біоплівок – 10 із них утворювали біоплівки, а інші 10 культур не проявляли такої властивості. В результаті експериментів по культивуванню досліджуваних штамів стафілококів в умовах *in vitro* (в пластикових 96-лункових планшетах) була виявлена досить висока здатність до плівкоутворення у коагулазопозитивних варіантів – 60% випадків, а серед коагулазонегативних тільки 33% культур утворювали біоплівки.

Клінічні ізоляти стафілококів часто відрізняються розвитком множинної стійкості до антибіотиків різних класів, реалізуючи різноманітні біохімічні

Онищенко П. С., Гаврилюк В. Г.

механізми захисту, а в умовах формування біоплівки бактерії набувають особливих форм антибіотикорезистентності, які обумовлені фізико-хімічними властивостями матриксу, змінами метаболічного профілю клітин у біоплівці, характером міжклітинних комунікацій та ін. [3,7].

Проведення порівняльного аналізу за результатами визначення стійкості до антибіотиків у клінічних штамів стафілококів показало, що плівкоутворюючі стафілококи проявляли більш високі рівні резистентності до всіх застосованих препаратів на відміну від ізолятів не здатних до утворення біоплівки (рис. 1).

Найбільше резистентних варіантів серед плівкоутворюючих стафілококів було виявлено до цефуроксиму – 73%, при цьому серед неплівкоутворюючих стафілококів їх кількість складала лише 20%. Частота виявлення стійких варіантів до норфлуксацину і левоміцетину сягала 64% для плівкоутворюючих і 10% для не здатних до утворення біоплівки стафілококів. Рівні стійкості до тетрацикліну і оксациліну були близькими в обох групах досліджених культур, але показники зустрічаємості резистентних варіантів серед плівкоутворюючих були вищими на 5-15%.

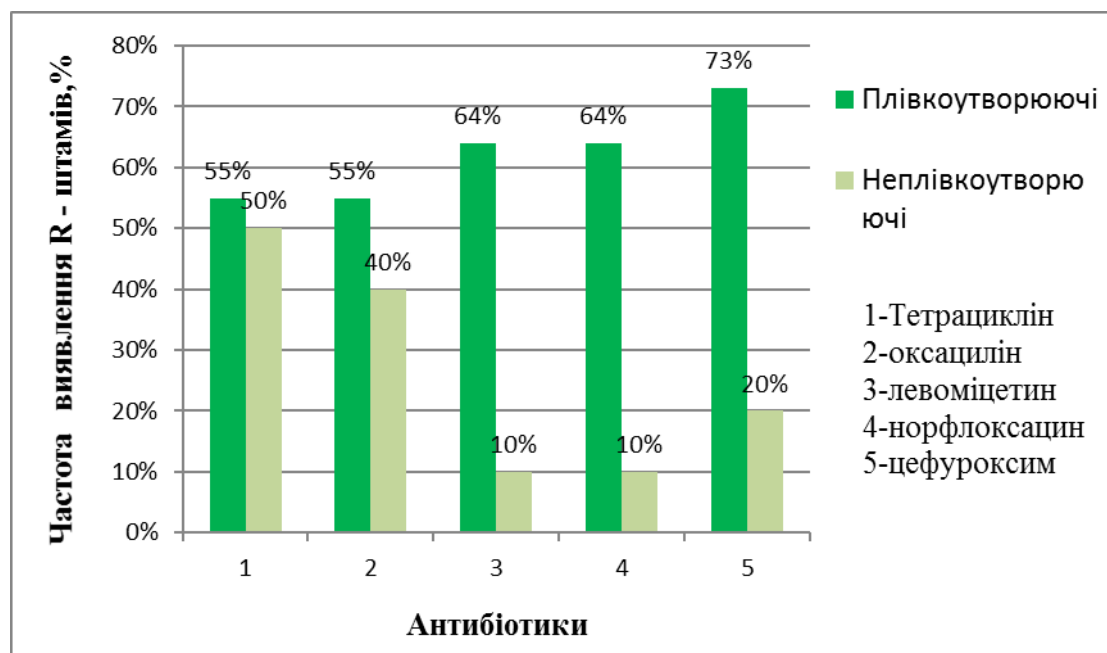


Рис. 1 Визначення рівней стійкості до антибіотиків у плівкоутворюючих і не здатних до формування біоплівки штамів стафілококів

Онищенко П. С., Гаврилюк В. Г.

Одержані дані є ще одним фактом доказу підвищеної резистентності до антибіотиків у мікроорганізмів, здатних формувати біоплівки, порівняно з планктонними формами [5,13].

При аналізі показників зустрічності антибіотикорезистентних варіантів серед коагулазопозитивних і коагулазонегативних стафілококів було встановлено, що по відношенню до майже всіх досліджених препаратів представники виду *S. aureus* виявились стійкими у більшості випадків: до тетрацикліну – 67%, оксациліну – 60%, хлорамфеніколу – 47%, цефуроксиму – 47%, норфлорксацину – 40% (рис. 2). Рівні стійкості до антибіотиків у коагулазонегативних стафілококів виявились значно нижчими: до тетрацикліну та оксациліну – 17%, до хлорамфеніколу та норфлорксацину – 33% і лише до цефуроксиму серед досліджених культур було виділено – 50% резистентних варіантів.

Одержані дані свідчать, що резистентність до антибіотиків частіше виникає у коагулазопозитивних стафілококів у порівнянні з коагулазонегативними видами, а по відношенню до бактерій, персистуючих у складі біоплівок, антибіотичні препарати виявляються суттєво менш ефективними.

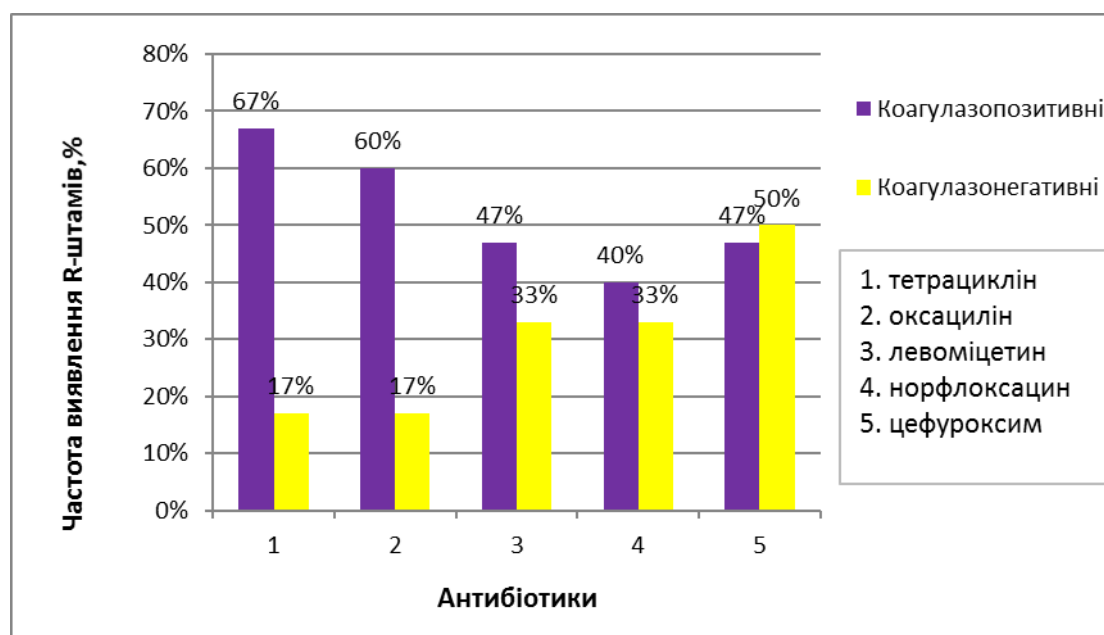


Рис. 2 Визначення рівней стійкості до антибіотиків у коагулазопозитивних та коагулазонегативних штамів стафілококів

Онищенко П. С., Гаврилюк В. Г.

Однією з відмінних рис стафілококів є їх висока адаптивна властивість, яка обумовлена, в першу чергу, значною лабільністю процесів енергетичного метаболізму. За даними ряду дослідників були встановлені факти суттєвих змін активності катаболічних ферментів в залежності від наявності в клітинах детермінант антибіотикорезистентності. Тому представляло інтерес дослідити прояв катаболічної активності у штамів стафілококів з різними ступенями стійкості до антибіотиків та здатністю до утворення біоплівок.

Інтенсивність катаболізму у досліджуваних штамів стафілококів визначали по загальній активності дегідрогеназ за результатами відновлення трифенілтетразолійхлориду до трифенілформагану (рис.3).

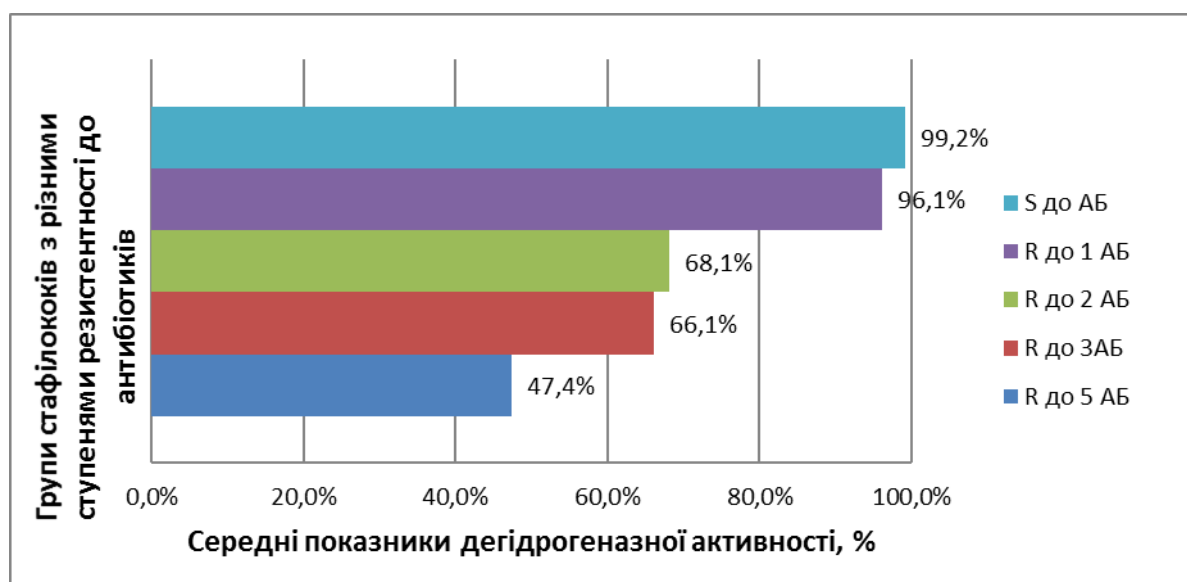


Рис.3 Прояв активності дегідрогеназ у чутливих та антибіотикорезистентних штамів стафілококів

Проведений порівняльний аналіз даних виміру оптичної густини інтенсивності кольорової реакції показав, що для резистентних до п'яти антибіотиків варіантів стафілококів показники активності дегідрогеназ були найменшими і склали в середньому 47,4% від контролю. Катаболічна активність у штамів, які проявляли стійкість до трьох антибіотиків, була трохи вище і складала 66,1%, а у стійких до двох препаратів – 68,1%. У варіантів, резистентних тільки до одного із антибіотичних препаратів, рівень

Онищенко П. С., Гаврилюк В. Г.

дегідрогеназної активності сягав 96,1% від контролю. Показники катаболічної активності у чутливих до всіх досліджуваних антибіотиків штамів стафілококів були найвищі і наближались в середньому до 100%-вої відмітки. Таким чином, з набуттям стійкості до антибіотиків у стафілококів відзначено порівняно низьку активність ферментів катаболічного обміну на відміну від показників ферментативної активності чутливих до антибіотиків варіантів та, чим до більшої кількості антибіотиків клінічні ізоляти стафілококів проявляють резистентність, тим менший рівень активності дегідрогеназ у них виявляється.

При вивченні поведінки мікроорганізмів у біоплівках деякими науковцями було встановлено, що метаболічні профілі клітин в асоціаціях мають відмінності порівняно з вільноживучими бактеріями [2,8,9]. Це спонукало до проведення порівняльного аналізу катаболічної активності у штамів стафілококів в залежності від здатності до утворення біоплівок (рис 4).

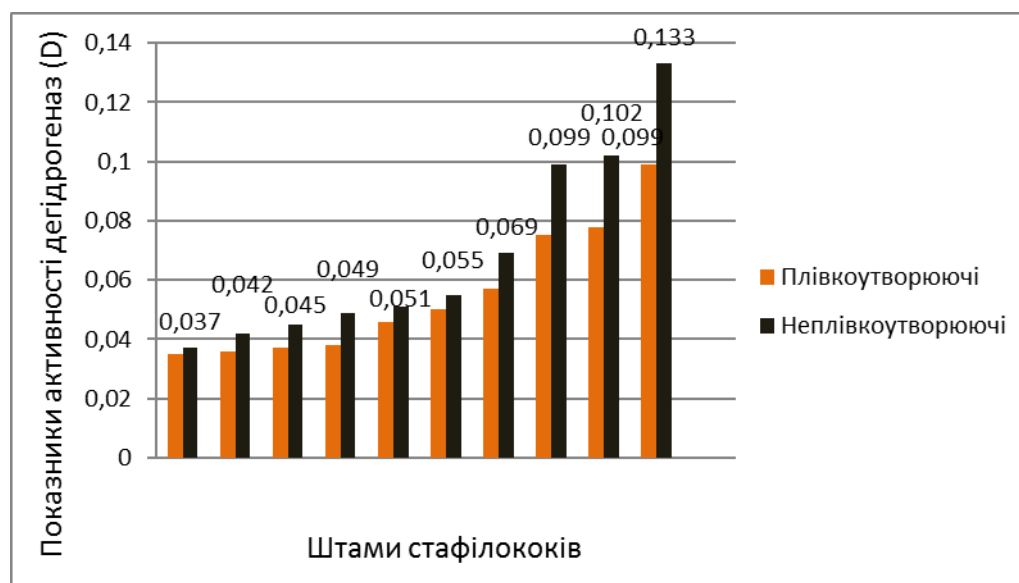


Рис. 4 Порівняльний аналіз прояву катаболічної активності у штамів стафілококів здатних і не здатних до утворення біоплівок

У плівкоутворюючих штамів стафілококів були виявлені менші значення активності дегідрогеназ, межі прояву яких визначено від 0,035 D до 0,099 D, порівняно з неплівкоутворюючими варіантами. Показники катаболічної активності у клінічних ізолятів, що не здатні утворювати біоплівки, коливались

Онищенко П. С., Гаврилюк В. Г.

від 0,037 D до 0,133 D. Можна констатувати, що для плівкоутворюючих штамів характерний більш повільний обмін речовин, катаболічні реакції протікають з меншою швидкістю. Серед плівкоутворюючих штамів ті, які були стійкими до більшого числа антибіотиків, відрізнялись меншими значеннями активності дегідрогеназ, ніж чутливі до антибіотичних препаратів клінічні ізоляти стафілококів. І серед неплівкоутворюючих стафілококів вищий рівень катаболічної активності проявляли штами, які виявились більш чутливими до антибіотиків.

Таким чином, при порівнянні даних виміру дегідрогеназної активності у стафілококів з різним ступенем стійкості до антибіотиків та здатності до формування біоплівки показано, що всі резистентні варіанти проявляли меншу катаболічну активність порівняно з чутливими ізолятами, а плівкоутворюючі штами виявились більш метаболічно інертними на відміну від стафілококів не здатних до утворення біоплівки.

Висновки та перспективи. Встановлено більш високі рівні стійкості до антибіотиків у плівкоутворюючих штамів стафілококів у порівнянні з варіантами, не здатними до формування біоплівки.

Серед коагулазопозитивних стафілококів частіше реєструється здатність до плівкоутворення та розвивається резистентність до антибіотичних препаратів на відміну від коагулазонегативних видів.

Результати дослідження активності дегідрогеназ свідчать про уповільнення процесів енергетичного метаболізму в клітинах плівкоутворюючих стафілококів порівняно з планктонними формами.

Показано корелятивну залежність прояву катаболічної активності від частоти розвитку резистентності до антибактеріальних препаратів: штами стафілококів з множинною стійкістю до ряду антибіотиків відрізняються значно меншою активністю ферментів енергетичного обміну в порівнянні з чутливими варіантами.

Отримані дані свідчать про необхідність подальшого вивчення різних властивостей мікроорганізмів, які здатні формувати біоплівки на будь-яких

Онищенко П. С., Гаврилюк В. Г.

поверхнях. Результати проведених досліджень можуть служити основою для розробки заходів попередження та боротьби з розповсюдженням антибіотикорезистентних і плівкоутворюючих штамів збудників інфекційних захворювань.

Список використаних джерел

1. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий / И.В. Чеботарь и др. *Клин. Микробиол. антимикроб. Химиотер.* 2012. № 1, т.14. С. 51-58.
2. Афиногенова А.Г., Даровская Е.А. Микробные биопленки. *Травматология и ортопедия России.* 2011. № 3, т. 61. С.119–125.
3. Диденко Л.В., Смирнова Т.А. Структурно-функциональная характеристика биопленок. *Микробиология.* 2010. № 4, т. 79. С. 435–446.
4. Иконников П.А., Белозёрова А.А. Физиология растений : Практикум для студентов Тюмень: Издательство Тюменского государственного университета, 2010, 41 с.
5. Особенности формирования микробных биопленок на различных субстратах. Возможность изучения биопленок на желчных конкрементах / Ю.С Винник и др. *Современные проблемы науки и образования.* 2013. №5.
6. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биопленки и инфекции. *Журнал инфектологии.* 2010. № 3, т. 2. С. 4–15.
7. Романова, Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2011. №3. С. 100–110.
8. Стрелкова Е.А. Стимуляция антибиотиками процесса формирования бактериальных биопленок. *Микробиология.* 2012. № 2, т. 81. С. 282-285.
9. Aiassa V. In vitro oxidant effects of D-glucosamine reduce adhesión and biofilm formation of Staphylococcus epidermidis. *Rev. Argent. Microbiol.* 2012. Vol. 44, № .1. P. 16–20.
10. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002. Vol. 15, № .2. P. 167–193.
11. Kaplan, J.B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications , and potential therapeutic uses. *J. Dent. Res.* 2010. Vol. 89, №.3. P.205-218.
12. Otto M. Staphylococcal biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008. Vol. 322. P. 207-228.
13. Singh R., Ray P., Das A. Penetration of antibiotics through Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. *Antimicrob. Chemother.* 2010. Vol. 65. P. 1955-1958.

References

1. Antibiotikorezistentnost bioplenochnykh bakteriy / I.V. Shebotar i dr. *Klin. Mikrobiol. antimikrob. Himioter.* 2012. № 1, т.14. S. 51-58.
2. Afinogenova A.G., Darovskaya E.A. Mikrobnye bioplenki. *Travmatologiya i ortopediya Rossii.* 2011. № 3, т. 61. S.119–125.

Онищенко П. С., Гаврилюк В. Г.

3. Didenko L.V., Smirnova T.A. Strukturno-funktsyonalnaya harakteristika bioplenok. Mikrobiologiya. 2010. № 4, т. 79. S. 435–446.

4. Ikonnikov P.A., Belozeroва A.A. Fiziologiya rasteniY. : Praktikum dlya studentov Tyumen: Izdatelstvo Tyumenskogo gosudarstvennogo universiteta, 2010, 41 s.

5. Osobennosti formirovaniya mikrobnih bioplenok na razlichnyh substratah. Vozmozhnosti izucheniya bioplenok na zhelchnyh konkrementah / YU.S Vinnik i dr. Sovremennye problem nauki i obrazovaniya. 2013. №5.

6. Gostev V.V., Sidorenko S.V. Bakterialnye bioplenki i infektscy. ZHurnal infektologii. 2010. № 3, т. 2. S. 4–15.

7. Romanova, YU.M., Gintsburg A.L. Bakterialnye bioplenki kak estestvennaya forma sushchestvovaniya bakteriy v okruzhayushchey srede i organizme hozyaina. ZHurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii. 2011. №3. S. 100–110.

8. Strelkova E.A. Stimulyatsiya antibiotikami processa formirovaniya bakterialnykh bioplenok. Mikrobiologiya. 2012. № 2, т. 81. S. 282-285.

9. Aiassa V. In vitro oxidant effects of D-glucosamine reduce adhesion and biofilm formation of Staphylococcus epidermidis. Rev. Argent. Microbiol. 2012. Vol. 44, № .1. P. 16–20.

10. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 2002. Vol. 15, № .2. P. 167–193.

11. Kaplan, J.B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses J. Dent. Res. 2010. Vol. 89, №.3. P.205-218.

12. Otto M. Staphylococcal biofilms. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2008. Vol. 322. P. 207-228.

13. Singh R., Ray P., Das A. Penetration of antibiotics through Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. Antimicrob. Chemother. 2010. Vol. 65. P. 1955-1958.

ИЗУЧЕНИЕ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАМОВ СТАФИЛОКОККОВ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ СТОЙКОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

П. С. Онищенко, В. Г. Гаврилюк

Аннотация. Для проведения мониторинга проявления ряда признаков у клинических изолятов стафилококков, выделенных из дыхательной и пищеварительной систем пациентов Лечебно-диагностического центра (г. Днепр), была определена их способность к формированию биоплёнок. В результате экспериментов по культивированию исследуемых штаммов стафилококков в условиях *in vitro* выявлена достаточно высокая способность к плёнкообразованию у коагулазоположительных вариантов – 60% случаев, а среди коагулазоотрицательных только 33% культур формировали биоплёнки. Сравнительный анализ результатов определения устойчивости к

Онищенко П. С., Гаврилюк В. Г.

антибиотикам у клинических штаммов стафилококков показал, что плёнкообразующие варианты проявляли более высокие уровни резистентности ко всем исследуемым антибиотическим препаратам в отличие от изолятов, необразующих биоплёнки. Явление антибиотикорезистентности чаще регистрировалось у коагулазоположительных стафилококков и значительно меньше – у коагулазоотрицательных видов. Интенсивность катаболизма у исследуемых штаммов стафилококков определяли по общей активности дегидрогеназ по результатам восстановления трифенилтетразолийхлорида до трифенилформазана. Оценка данных измерения оптической плотности интенсивности цветной реакции свидетельствует, что с приобретением устойчивости к антибиотикам у стафилококков ферменты катаболического обмена проявляют активность в меньшей степени по сравнению с чувствительными вариантами и, чем к большему количеству антибиотиков клинические изоляты стафилококков имеют устойчивость, тем ниже уровень активности дегидрогеназ у них выявляется. Все плёнкообразующие штаммы оказались более метаболически инертными в отличие от стафилококков не способных образовывать биоплёнки.

Ключевые слова: стафилококки, антибиотикорезистентность, биоплёнки, катаболическая активность

RESEARCHING METABOLIC PROPERTIES OF CLINICAL STRAINS OF STAPHYLOCOCCUS WITH DIFFERENT GRADE OF RESISTANCE TO ANTIBIOTICS

P. S. Onischenko, V. G. Gavriliuk

Abstract. *The ability of Staphylococcus to form biofilms was determined for monitoring the manifestation of the symptoms range of Staphylococcus clinical isolates extracted from the respiratory and digestive systems of the patients from the Diagnostic and Treatment Center (Dnipro city). As a result of cultivation experiments on the strains of Staphylococcus in vitro, a quite high film formation ability of coagulase-positive variants was revealed in 60% of cases, and only 33% of coagulase-negative cultures formed biofilms. The comparative analysis of the research results of resistance to antibiotics of Staphylococcus clinical strains showed that the film-forming variants have higher resistance levels to all studied antibiotic drugs, in contrast to isolates that didn't form biofilms. The fact of antibiotic resistance was more often detected among coagulase-positive Staphylococcus and rarely among coagulase-negative ones. The catabolism intensity of the studied strains of Staphylococcus was determined by the total activity of dehydrogenases by the results of the recovery of triphenyltetrazolium chloride to triphenylformazan. The valuation of measurement data of the optical density of the color reaction intensity indicates that with the attainment of resistance to antibiotics, Staphylococcus catabolic metabolism ferments show less activity compared with sensitive variants and the higher the number of antibiotics which isolates of Staphylococcus have resistance to, the lower their dehydrogenase activity level. All film-forming strains*

Онищенко П. С., Гаврилюк В. Г.

proved to be more metabolically inert than Staphylococcus, which is not able to form biofilms.

Keywords: *Staphylococcus, antibiotic resistance, biofilms, catabolic activity*