

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ГНОЙНЫХ МЕНИНГИТОВ У НОВОРОЖДЕННЫХ НЕДОНОШЕННЫХ ДЕТЕЙ НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

Н.Г. Малыш<sup>1</sup>, Л.В. Авдеева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Сумской государственной университет, медицинский институт

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины, Киев

Установлено увеличение удельного веса гнойных менингитов в структуре заболеваемости недоношенных новорожденных детей на гнойно-воспалительные заболевания с 3,2% — у 2005 г. до 11,7% — у 2009 г. Риск развития гнойного менингита возрастает если новорожденные находятся в отделении интенсивной терапии новорожденных, имеют при рождении очень низкий и экстремально низкий вес тела и болеют пневмонией. Преимущественно возбудителем гнойных менингитов есть *E. faecalis*, причем выделение у (77,8±12,4)% случаев из фекалий *E. faecalis*, свидетельствует об эндогенном инфицировании недоношенных малышей.

**Ключевые слова:** недоношенные новорожденные, менингит, факторы риска.

## EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF PURULENT MENINGITISES IN NEW-BORNS PREMATURES ON MODERN ETAPE

N.G. Malysh<sup>1</sup>, L.V. Avdeeva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Sumy State University, Medical Institute

<sup>2</sup>D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virusology NAS of Ukraine, Kiev

The increasing of proportion of purulent meningitises in the structure of new-borns premature's morbidity by pyo-inflammatories diseases from 3,2% in 2005 till 11,7% in 2009 of was registered. The risk of development of purulent meningitis increased if infants were at the new-born intensive care department and had at birth very low and extremely low body weight or pneumonia. *E. faecalis* was a pathogen of purulent meningitises mostly, and was found in (77,8±12,4)% cases of fecal culture, that can evidence of endogenous infection in new-borns premature's.

**Key words:** new-borns premature's, meningitis, risk factors.

**Рецензент:** д. мед. н., професор О.І. Поліщук

УДК 663.031:579.24+579.841.1

О.В. Покас<sup>1</sup>, О.І. Поліщук<sup>1</sup>, Т.С. Тодосійчук<sup>2</sup>

## ДІЯ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ „ЦИТОРЕЦИФЕН-М” НА ЗДАТНІСТЬ ДО УТВОРЕННЯ БІОПЛІВОК ШТАМАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

<sup>1</sup>ДУ “Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського АМН України”, м. Київ

<sup>2</sup>Національний технічний університет України “Київський політехнічний інститут”, м. Київ

**Представлені результати дослідження дії ферментного препарату “Циторецифен-М” на здатність формування біоплівки штамми *Pseudomonas aeruginosa* та вплив ферменту на вже сформовану біоплівку**

**Ключові слова:** біоплівка, *Pseudomonas aeruginosa*, ферментний препарат “Циторецифен-М”

**З**а останні 50 років відбулось революційне переосмислення щодо того, що мікроорганізми

існують у природі не індивідуально, а переважно у вигляді структурованих мікробних спільнот — біоплівки. Здатність до утворення біоплівки — одна з основних стратегій виживання бактерій не тільки в зовнішньому середовищі, а й у макроорганізмах. Бактерії у біофільмах виявляються у 1000 разів стійкішими до антибактеріальних препаратів та інших несприятливих для них факторів порівняно з тими ж бактеріями поза біоплівками. Близько 60% хронічних бактеріальних та мікотичних

© О.В. Покас, О.І. Поліщук, Т.С. Тодосійчук

інфекцій сьогодні пов'язують з біоплівками. Однією з важливих задач сучасної медицини є створення препаратів здатних не тільки запобігати утворенню мікроорганізмами біоплівок, але також і здатних зруйновувати вже сформовані біоплівки, що внесе суттєвий вклад у боротьбу з небезпечними для життя хронічними інфекціями [9, 10].

В літературі наводяться дані щодо здатності азитроміцину впливати на біоплівку, утворену *P. aeruginosa* [11], субінгібуючих концентрацій діклоксациліну на утворення біоплівок *S. epidermidis* та *S. haemolyticus* [8], впливу екзогенних протеолітичних ферментів на бактерії в біоплівках, зокрема вобензиму [6].

На сьогоднішній день в Україні практично не зустрічаються повідомлення про іммобілізовані протимікробні ферментні препарати поверхневого використання, що застосовуються у медичній практиці, однак, інтенсивні розробки в цьому напрямку ведуться [1, 4]. Одним із таких перспективних препаратів є ферментний нативний препарат Циторецифен та іммобілізований препарат Циторецифен-М, що розроблені на кафедрі промислової біотехнології НТУУ “КПІ”, які потребують всебічного вивчення впливу на мікроорганізми.

**Метою роботи** було вивчення дії ферментного препарату “Циторецифен-М” на утворення біоплівок штамми *Pseudomonas aeruginosa* та впливу на вже сформовану біоплівку.

### Матеріали та методи дослідження

В роботі використовували клінічні штами *Pseudomonas aeruginosa*, виділені з ран у хворих з інфекціями області хірургічного втручання. В якості ферменту використовували експериментальний іммобілізований препарат “Циторецифен-М”, що був отриманий шляхом адсорбційної іммобілізації на аеросилі марки Силікс А-300 [3]. Циторецифен є бактеріолітичним ферментним комплексом, що синтезується мікробним штамом-продуцентом *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* IMB Ac-5001 та містить глікозидази, мурамідази, протеїнази, протеази тощо. В попередній роботі [7] була кількісно визначена бактеріостатична дія препарату і в даному експерименті ми використовували концентрацію 25 мг/мл.

Дослідження здатності до формування біоплівок мікроорганізмами проводили згідно з методиками Романової Ю.М. із співав. [5].

1. Бактеріальні культури вирощували в триптиказосоевому бульйоні при температурі 37°C. Визначення проводили в плоскодонних планшетах для імуноферментного аналізу. Нічні культури штамів

розводили поживним середовищем 1:100, отримані суспензії вносили по 150 мкл у лунки планшет (в 4 лунки для кожного штаму). Для контролю фону також у 4 лунки вносили поживний бульйон, в якому інкубували культури. В якості поживного бульйона використовували триптиказосоевий бульйон. Планшету інкубували певний час при 37°C. Фермент “Циторецифен-М” в концентрації 25 мг/мл вносили в різні строки формування біоплівки: разом з мікробною масою (інкубували 48 год), після росту біоплівки протягом 48 год (інкубація з ферментом 24 год). Потім вміст лунок видаляли і вносили по 150 мкл дистильованої води та 15 мкл 1% спиртового розчину барвнику кристал фіолету. Лунки, заповнені барвником, інкубували при кімнатній температурі протягом 45 хвилин. Потім барвник видаляли, а лунки триразово промивали дистильованою водою. У відміті від незв'язаної фарби лунки вносили по 250 мкл етилового спирту і залишали на 45 хвилин при кімнатній температурі. Кількість сформованої біоплівки оцінювали по інтенсивності забарвлення спирту на фотометрі за довжини хвилі 630 нм. Кількісним визначенням ступеня утворення біоплівок слугували значення оптичної густини (ОД ОГ).

2. Культури мікроорганізмів в концентрації 0,5 McFarland Standart вносили по 4 мл в чашки с покривними скельцями. Чашки інкубували певний час при 37°C. Фермент в концентрації 25 мг/мл вносили в різні строки формування біоплівок: разом з мікробною масою (інкубували 48 год), після росту біоплівки протягом 48 год (інкубація з ферментом 24 год). Після інкубації покривні скельця відмивали дистильованою водою, фіксували 10 хвилин 96% етиловим спиртом і забарвлювали розчином генціанфіолету. Сформовану біоплівку оцінювали за допомогою світлової мікроскопії на мікроскопі Olympus CX-41 при 400-кратному збільшенні із наступним фотографуванням за допомогою цифрового фотоапарату.

Отримані кількісні результати досліджень піддавали статистичній обробці загальноприйнятими методами варіаційної статистики з розрахунком середньої арифметичної ( $\bar{M}$ ), середньоквадратичного відхилення ( $\sigma$ ), помилки середньої арифметичної ( $m$ ), оцінкою достовірності розбіжностей за критерієм Ст'юдента ( $t$ ), з урахуванням рівня значущості ( $p$ ) та із використанням програми “Біостат” [2].

### Результати та їх обговорення

Встановлено, що досліджувані штами вже через 24 год утворюють на поверхні покривних

**Таблиця 1.** Кількісна оцінка біоплівки утвореної штамами *P. aeruginosa* без ферменту та з ферментом

Досліджені штами	Час інкубації	Значення ОД ОГ (М+м)
<i>P. aeruginosa</i> 278	48 год	0,237±0,08
<i>P. aeruginosa</i> 278 + фермент	48 год	0,048±0,02
<i>P. aeruginosa</i> 278	72 год	0,313±0,015
<i>P. aeruginosa</i> 278 + фермент	48 год + 24 год	0,054±0,015
<i>P. aeruginosa</i> 353	48 год	0,22±0,05
<i>P. aeruginosa</i> 353 + фермент	48 год	0,043±0,015
<i>P. aeruginosa</i> 353	72 год	0,504±0,03
<i>P. aeruginosa</i> 353 + фермент	48 год + 24 год	0,14±0,035

скелець та на дні лунок планшету біоплівку, яка збільшується по площі та густині при продовженні культивування.

Як видно з таблиці 1 штам *P. aeruginosa* 278 утворював біоплівку в 1,3 рази більшу протягом 72 год (0,313±0,015 ОД ОГ), ніж за 48 год (0,237±0,08 ОД ОГ), але без достовірної різниці. А штам *P. aeruginosa* 353 за 72 год утворював більш кількісну біоплівку в 2,3 рази ( $p < 0,05$ ) (0,504±0,03 ОД ОГ), ніж за 48 год (0,22±0,05 ОД ОГ).

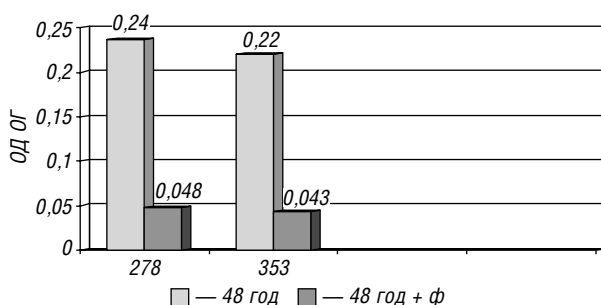
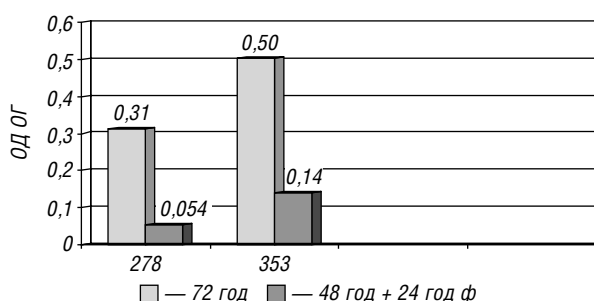
Культивування мікроорганізмів разом з ферментом призвело до утворення менш кількісної біоплівки. Обидва штами з одночасним внесенням ферменту при інкубації 48 год формували біоплівку (штам 278 — 0,048±0,02, штам 353 — 0,043±0,015 ОД ОГ), що майже в 5 разів менше ( $p < 0,05$ ) порівняно із культивуванням без внесення ферменту (0,313±0,015 та 0,504±0,03 ОД ОГ відповідно). Отримані дані свідчать, що фермент “Циторецифен-М” в концентрації 25 мг/мл пригнічує утворення біоплівок мікроорганізмами *P. aeruginosa* (рис. 1).

Однією з важливих задач сучасної медицини є створення препаратів здатних не тільки запобігати утворенню мікроорганізмами біоплівок, але також

і здатних зруйновувати утворені вже біоплівки. В зв'язку з цим однією із задач нашого дослідження було вивчення дії ферменту “Циторецифен-М” на вже сформовану протягом 48 год біоплівку.

Встановлено, що при внесенні ферменту через 48 год інкубації кількість біоплівки утвореної штамом *P. aeruginosa* 278 (0,054±0,015 ОД ОГ) зменшилась майже в 6 разів ( $p < 0,05$ ) в порівнянні зі штамом інкубованим 72 год без ферменту (0,313±0,015 ОД ОГ), а біоплівка штама 353 (0,14±0,035 ОД ОГ) — в 3,6 разів ( $p < 0,05$ ) (табл. 1, рис. 2).

Внесення таких ферментів, як папаїн, трипсин, вобензим в кількості 100 мг/л при інкубації 24 год призводило до збільшення маси біоплівки, зниження дози вобензиму до 50–5 мг/л в аналогічних умовах призводило до пригнічення утворення біоплівки [6]. Таким чином, пригнічення мало дозозалежний ефект, що свідчить про специфічність ефекту. Папаїн та вобензим в дозі 0,5–50 мг/л пригнічують формування біоплівки кишкової палички. При зниженні дози ферменту до 0,5 мг/л цей ефект знижувався. Отже, на основі вищенаведеного можна стверджувати, що фермент “Циторецифен-М” діє на вже сформовану біоплівку та призводить до її суттєвого зменшення.

**Рис 1.** Кількісна оцінка біоплівок утворених за 48 год штамами *P. aeruginosa* без ферменту та з ферментом**Рис 2.** Кількісна оцінка біоплівок утворених за штамами *P. aeruginosa* за 72 год без ферменту та з ферментом

Біоплівки мають характерну архітектуру, яка складається з мікроколоній, заключених в екзополімерний матрикс, пронизаний заповненими рідиною каналами, по яким відбувається надходження поживних речовин та кисню і виведення кінцевих продуктів метаболізму. На рис. 3(А). зображена біоплівка утворена *P. aeruginosa* 278 протягом 48 год, де видно конгломерати бактерій, тяжі, розташовані як поодинокі, так і скупченнями. На рис. 3(Б) де зображена біоплівка утворена штамом *P. aeruginosa* 278 з внесеним ферментом протягом 48 год зовсім інша картина, скупчення конгломератів і тяжів не спостерігається, в полі зору клітини розташовані поодинокі, або невеликими скупченнями. Біоплівка утворена штамом *P. aeruginosa* 278 з внесеним ферментом через 48 год та подальшої інкубації 24 год, яка зображена на рис. 3(В), являла собою проміжну картину серед двох попередніх, тут можна спостерігати як і поодинокі тяжі, так і невеликі скупчення клітин. Можливо, це можна пояснити, тим, що фермент діяв протягом 24 год і біоплівка ще до кінця не зруйнована.

Стосовно біоплівки, утвореної штамом *P. aeruginosa* 535 (рис. 4.), можна сказати, що

мікроскопічно вона виражена більш слабкою, але також ми бачимо конгломерати і тяжі, в присутності ферменту — лише поодинокі клітини.

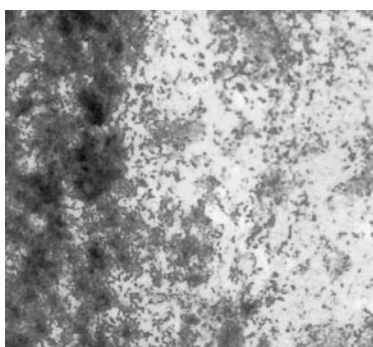
Таким чином нами співставлені дані щодо визначення утворення біоплівки, як методом фотометричним — на основі вимірювань оптичної густини утвореного біосубстрату, так і методом світлової мікроскопії пофарбованих препаратів.

### Висновки

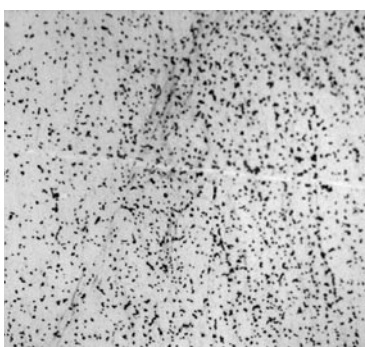
1. Ферментний препарат “Циторецифен-М” при його внесенні в концентрації 25 мг/мл безпосередньо на початку культивування штамів *P. aeruginosa* призводив до пригнічення утворення бактеріальної біоплівки.

2. Ферментний препарат “Циторецифен-М” при внесенні в концентрації 25 мг/мл у біосистему із уже сформованою штамми *P. aeruginosa* біоплівкою призводив до її суттєвого зменшення.

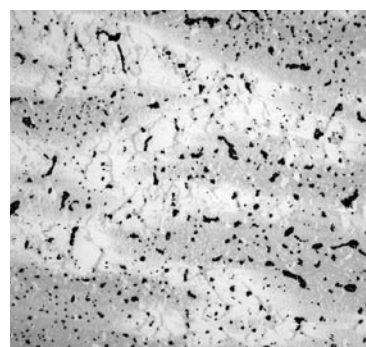
3. Пригнічення утворення біоплівки штамми *P. aeruginosa* та її суттєве зменшення під дією ферментного препарату “Циторецифен-М” підтверджено методами фотометричним із вимірюванням оптичної густини та світлової мікроскопії.



а

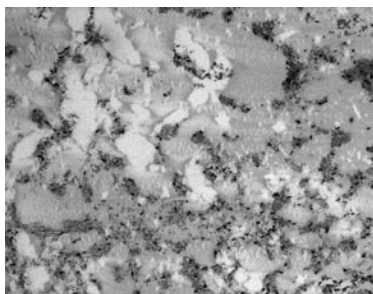


б

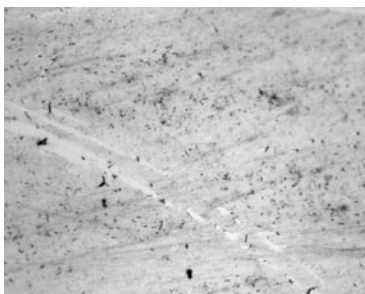


в

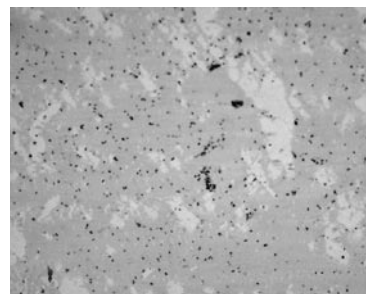
**Рис. 3.** Біоплівка утворена штамом *P. aeruginosa* 278: а — протягом 48 год без ферменту, б — протягом 48 год з внесеним ферментом, в — з внесеним ферментом через 48 год та подальшої інкубації 24 год



а



б



в

**Рис. 4.** Біоплівка утворена штамом *P. aeruginosa* 535: а — протягом 48 год без ферменту, б — протягом 48 год з внесеним ферментом, в — з внесеним ферментом через 48 год та подальшої інкубації 24 год

**Перспективи подальших досліджень** полягають в визначенні дії ферментного препарату “Циторецифен-М” на формування біоплівки грам-позитивними

мікроорганізмами та дії препарату на мікробні кооперації та виживання бактерій в присутності антибіотиків.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Афиногенов Г.Е. Принципы антисептики в системе борьбы с раневой инфекцией / Г.Е. Афиногенов // Стратегия и тактика применения антисептиков в медицине: Материалы международ. конф. — Винница, 2000. — С. 267.
2. Ашмарин И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев. — Л.: Медгиз. — 1962. — 179 с.
3. Григор'єва М.А. Дослідження готових форм іммобілізованого ферментного препарату Циторецифен для медичного використання / М.А. Григор'єва, Н.В. Москаленко, Т.С. Тодосійчук // Український журнал медичної техніки і технології. — Київ. — 2006. — № 4. — С. 12–20.
4. Крупська Т.В. Адсорбційне закріплення левоміцетину на поверхні високодисперсного кремнезему / Т.В. Крупська, В.М. Барвінченко, В.О. Касперський // Фарм. журнал. — 2006. — № 2. — С. 59–63.
5. Романова Ю.М. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium* / Ю.М. Романова, Н.В. Алексеева, Т.А. Смирнова // Журн. Микробиол. — 2006. — № 4. — С. 38–42.
6. Тец В.В. Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактерии / В.В. Тец, Г.Ю. Кнорринг, Н.К. Артеменко // Антибиотики и химиотерапия. — 2004. — Т. 29, № 12. — С. 9–13.
7. Тодосійчук Т.С. Аспекти медичного застосування іммобілізованого ферментного препарату “Циторецифен-М” / Т.С. Тодосійчук, О.В. Покас, О.І. Поліщук, В.Д. Коновалюк // Ж. “Фармацевтичний журнал” — 2009. — № 5. — С. 107–111.
8. Cerca N. Effect of growth in the presence of subinhibitory concentrations of dicloxacillin on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* biofilms / N. Cerca // Applied and environmental microbiology. — 2005. — № 12. — P. 8677–8682.
9. Costerton J.W. Bacterial biofilms in nature and disease / J.W. Costerton, K.J. Cheng, G.G. Geesey // Annual review of Microbiology. — 1987. — № 41. — P. 435–464.
10. Drenkard E. Pseudomonas biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation / E. Drenkard, F.M. Ausubel // Nature. — 2002. — № 416. — P. 740–743.
11. Nalca Y. Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach / Y. Nalca, L. Jansch // Antimicrob Agents Chemother. — 2006. — № 50. — P. 1580–1688.

### ДЕЙСТВИЕ ФЕРМЕНТА “ЦИТОРЕЦИФЕН-М” НА СПОСОБНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНОК ШТАММАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Е.В. Покас<sup>1</sup>, Е.И. Полищук<sup>1</sup>, Т.С. Тодосійчук<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГУ „Институт эпидемиологии и инфекционных болезней им. Л.В. Громашевского АМН Украины”

<sup>2</sup>Национальный технический университет Украины “Киевский политехнический институт”

Представлены результаты исследования действия ферментного препарата “циторецифен-М” на способность формировать биопленки штаммами *Pseudomonas aeruginosa* и влияние фермента на уже сформированную биопленку.

**Ключевые слова:** биопленка, *Pseudomonas aeruginosa*, ферментный препарат “Циторецифен-М”.

### THE EFFECT OF THE FERMENT “CYTORECIFEN-M” CAPACITY TO FORM BIOFILMS BY STRAINS *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

O.V. Pokas<sup>1</sup>, O.I. Polishchuk<sup>1</sup>, T.S. Todosiychuk<sup>2</sup>

<sup>1</sup>SI “The L.V. Gromashevsky Institute of epidemiology and infectious diseases of AMS of Ukraine”

<sup>2</sup>National Technical University of Ukraine “Kyiv Polytechnic Institute”

The results of the investigation of the effect of the ferment cytopecifen-M upon the capacity to form biofilms by strains *Pseudomonas aeruginosa* and the influence of the ferment upon the formed biofilm are presented.

**Key words:** biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, ferment “Cytorecifen-M”.

**Рецензент:** к. мед. н. І.В. Фільчаков