

# МІКРОБІОЛОГІЯ

© Лазарев Є. В., Воробей Є. С., Воронкова О. С.

УДК 579. 61:616-078

Лазарев Є. В., Воробей Є. С., Воронкова О. С.

## ЧУТЛИВІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ ТА ЛІКУВАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ БАКТЕРІОФАГІВ ПЛІВКОУТВОРЮЮЧИХ ТА НЕПЛІВКОУТВОРЮЮЧИХ ШТАМІВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКА

Дніпропетровський національний університет ім. Олеса Гончара

(м. Дніпропетровськ)

Дана робота є фрагментом НДР «Теоретичні та практичні основи життєдіяльності мікробіоценозів, форм взаємовідносин з тваринами і рослинами», форм держ. реєстрації 0112U000192, тема № 1-262-12.

**Вступ.** Відомо, що більшість бактерій існують в природі не у вигляді вільноплаваючих клітин, а у вигляді специфічно організованих структур – біоплівки. Причому самі бактерії становлять лише 5-35% маси біоплівки, інша частина – це міжбактеріальний матрикс [9, 16]. Ці природні співтовариства бактерій функціонують як скоординований консорціум [10]. Така форма існування надає бактеріям масу переваг. Біоплівка більш стійка до впливу несприятливих чинників фізичної, хімічної та біологічної природи порівняно з вільноплаваючими бактеріями, а також до дії імунної системи організму-господаря і антибактеріальних препаратів [12, 14]. Бактерії в складі біоплівки здатні виживати при впливі антибактеріальних сполук у таких високих концентраціях, які не можуть бути досягнуті в організмі людини при стандартних дозуваннях [11]. Основним фактором стійкості біоплівки є екзополісахаридний матрикс, що виробляється клітинами бактерій відразу після прикріплення до субстрату. Він має складну структуру і змінюється в результаті адаптації бактерій до умов навколишнього середовища, його основу складають екзополісахариди, ліпополісахариди, глікопротеїни і протеоглікани [3].

Загалом, проблема антибіотикорезистентності умовно-патогенної флори, незважаючи на всі зусилля, стає неконтрольованою. Тому в усьому світі ведеться пошук альтернативних засобів бактеріальної терапії. І в цьому сенсі найбільший інтерес представляють бактеріофаги. Багато вчених вважають, що використання фагів для лікування і профілактики бактеріальних інфекцій має стати успішним напрямком [13, 15]. Але основною умовою успішного застосування є перевірка виділеної культури мікроорганізмів на чутливість до відповідного бактеріофагу або антибіотику.

**Метою роботи** було дослідження біологічних властивостей *S. aureus*, їх здатності до плівкоутворення, чутливості до дії антибіотиків різних груп та лікувальних препаратів бактеріофагів.

**Об'єкт і методи дослідження.** Досліджували властивості 13 штамів *S. aureus*, виділених з репродуктивного тракту жінок, з колекції культур кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпропетровського національного університету ім. О. Гончара. Ідентифікацію бактерій проводили згідно з переліком ознак, наведених у Визначнику бактерій Берджі [4], за допомогою тест-системи ApiStaph, виробництва BioMerieux, Франція.

Здатність до плівкоутворення визначали на 96-луночних планшетах. Для цього добову культуру розводили у 0,5% стерильному фізіологічному розчині за стандартом каламутності  $1 \times 10^9$  мікробних клітин в 1 мл. Отриману суспензію в кількості 50 мкл вносили в лунки 96-лунокового планшета, що містили 150 мкл м'ясо-пептонного бульйону. Інкубували при 37°C 72 години. Утворені біоплівки обережно знімали бактеріологічною петлею, поміщали на знежирене предметне скло та фарбували кристалічним фіолетовим для візуалізації клітин у складі біоплівки.

Також дослідження здатності до плівкоутворення проводили на пластикових чашках Петрі діаметром 4,5 см. Для цього 0,4 мл суспензії досліджуваного штаму, що відповідала за стандартом каламутності  $1 \times 10^9$  кл/мл, засівали у 1,6 мл м'ясо-пептонного бульйону. Інкубацію проводили в аналогічних умовах. Після інкубації залишки поживного середовища обережно відбирали, тричі промивали буферним розчином для видалення планктонних клітин та фарбували кристалічним фіолетовим.

Чутливість досліджуваних штамів до антибіотиків визначали диск-дифузійним методом згідно з наказом МОЗ України №167 «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» [6] з використанням стандартних дисків. Вивчали чутливість досліджуваних штамів до пеніцилінів (бензилпеніцилін 10 ОД), цефалоспоринових (цефазолін 30 мкг, цефуроксим 30 мкг, цефтріаксон 30 мкг), карбапенемів (іміпенем 10 мкг), макролідів (еритроміцин 15 мкг), тетрациклінів (доксидиклін 30 мкг), аміноглікозидів (нетилміцин 30 мкг), лінкозамідів (кліндаміцин 2 мкг), фторхінолонів (офлоксацин 5 мкг), оксазолідонів (лінезолід 30 мкг) (ЗАО

«Научно-исследовательский центр фармакотерапии», РФ).

Чутливість штамів до фагів з лікувальних препаратів бактеріофаг стафілококовий рідкий, піобактеріофаг полівалентний та інтесті-бактеріофаг рідкий (НПО «Микроген», РФ) визначали крапельним методом [7].

На наведених у тексті малюнках представлені усереднені дані трьох експериментів.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Відповідно до мети роботи було вивчено властивості 13 штамів *S. aureus*. При вивченні плівкоутворення досліджуваних культур наявність плівок була відмічена у 8 штамів (61,5%). При мікроскопії біоплівок виявлені окремі групи клітин стафілококів.

При визначенні чутливості до антибіотиків було визначено, що найбільш чутливими штамми

виявилися до цефазоліну, імipенему, доксицикліну, нетилміцину, кліндаміцину, офлоксацину та лінезоліду. Чутливість до них коливалася у межах від 84,6% до 100,0%. Низька чутливість спостерігалася до бензилпеніциліну та еритроміцину (23,1%).

У наших дослідженнях при розподілі штамів за здатністю до плівкоутворення було виявлено відмінності між чутливістю до антибіотиків у плівкоутворюючих та неплівкоутворюючих штамів. Суттєво відрізнялася чутливість цих груп штамів до цефуроксиму. Серед плівкоутворюючих штамів чутливість не перевищувала 25%, тоді як серед неплівкоутворюючих була значно вище (80%). Чутливість до кліндаміцину мала меншу розбіжність: 75% у плівкоутворюючих штамів та 100% у неплівкоутворюючих. У випадку з лінезолідом відмічалася зворотна тенденція. Чутливість плівкоутворюючих штамів була вище, ніж неплівкоутворюючих (100% і 80% відповідно). Результати чутливості плівкоутворюючих та неплівкоутворюючих штамів *S. aureus* представлені на **рис. 1**.

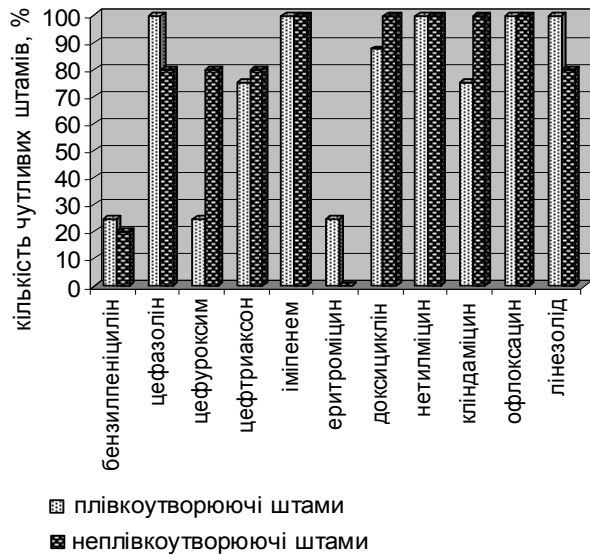
У кожному випадку резистентність пов'язана з порушенням взаємодії антибіотика і його мішені. Класичними вважаються п'ять типів механізмів стійкості до антибіотиків: модифікація мішені, інактивація антибіотика, активне виведення антибіотика з мікробної клітини (ефлюкс), порушення проникності зовнішніх структур мікробної клітини, формування метаболічного «шунта» [5]. Для клітин у складі біоплівок характерні всі типи резистентності, а також ряд додаткових, обумовлених організацією у плівку [8]. Одним з них є перешкодження проникненню антибіотиків в глибокі шари біоплівки і безпосередньому контакту з бактеріальними клітинами [8].

Також вивчали чутливість 13 штамів *S. aureus* до піобактеріофагу полівалентного, інтесті-бактеріофагу рідкого і стафілококового бактеріофагу рідкого. Найбільша чутливість спостерігалася до стафілококового бактеріофагу рідкого (46,2%), найменша – до піобактеріофагу полівалентного (23,1%).

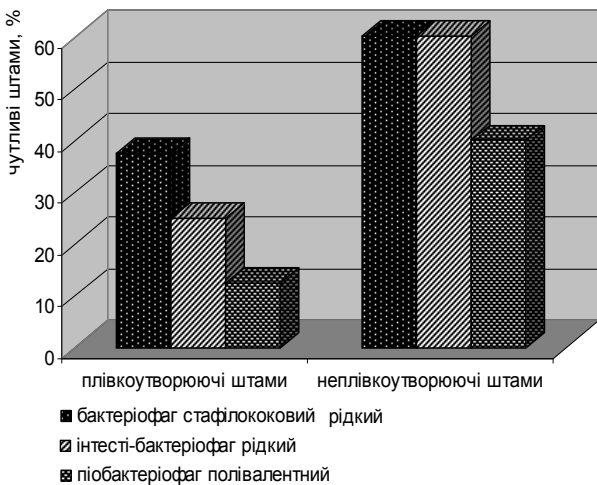
Чутливість до препаратів бактеріофагів значно різнилася у плівкоутворюючих та неплівкоутворюючих штамів. Так чутливість до стафілококового бактеріофагу у плівкоутворюючих штамів складала 37,5%, тоді як у неплівкоутворюючих – 60%. Аналогічна картина спостерігалася і для інтесті-бактеріофагу та піобактеріофагу: чутливість неплівкоутворюючих штамів була вище (60% та 40% відповідно) ніж плівкоутворюючих (25% та 12,5% відповідно). Результати чутливості даних штамів в залежності від їх здатності до плівкоутворення до дії фагів представлені на **рис. 2**.

Проаналізувавши отримані дані щодо чутливості вивчених штамів до препаратів бактеріофагів та порівнявши їх з даними інших дослідників [1, 2], згідно з якими до піобактеріофагу полівалентного були чутливими 81,3% штамів *S. aureus*, до стафілококового бактеріофагу – 65,6%, а загальна фагочутливість стафілококів складала 69%, було визначено, що чутливість вивчених нами штамів була нижче.

У наших дослідженнях при вивченні чутливості до препаратів бактеріофагів плівкоутворюючих та неплівкоутворюючих штамів *S. aureus* було виявлено, що здатні до плівкоутворення штамми були менш



**Рис. 1. Порівняльна характеристика чутливості до антибіотиків плівкоутворюючих та неплівкоутворюючих штамів *S. aureus* (n = 13).**



**Рис. 2. Порівняльна характеристика чутливості до лікувальних препаратів бактеріофагів плівкоутворюючих та неплівкоутворюючих штамів *S. aureus* (n = 13).**

чутливими до усіх вивчених препаратів. Крім того у неплівкоутворюючих штамів спостерігалася висока чутливість не тільки до стафілококового бактеріофагу рідкого, а й до інтесті-бактеріофагу рідкого.

Таким чином, було підтверджено, що здатні до утворення біоплівки штами мали більш високу резистентність до дії антибактеріальних засобів та лікувальних препаратів бактеріофагів, що ускладнює боротьбу з ними.

### Висновки.

1. Здатність до плівкоутворення була відмічена у 8 штамів з 13, що склало 61,5% їх загальної кількості.

2. При визначенні чутливості до антибіотиків було визначено, що плівкоутворюючі штами проявили найбільшу чутливість до цефазоліну, імipенему, доксицикліну, нетилміцину, офлоксацину та лінезоліду (понад 87,5%); неплівкоутворюючі штами проявили високу чутливість до усіх антибіотиків окрім бензилпеніциліну та еритроміцину. Низька

чутливість серед штамів обох груп спостерігалася до бензилпеніциліну та еритроміцину (23,1%).

3. При вивченні чутливості виділених штамів стафілококу до лікувальних препаратів бактеріофагів було визначено, що найбільша чутливість спостерігалася до стафілококового бактеріофагу рідкого (46,2%), найменша – до піобактеріофагу полівалентного (23,1%).

**Перспективи подальших досліджень.** Отримані нами результати свідчать, що плівкоутворюючі штами бактерій більш резистентні до дії антибактеріальних засобів та лікувальних препаратів бактеріофагів, що ускладнює боротьбу з ними. Тому перспективним є подальше проведення більш детальних досліджень впливу на планктонні культури та вже сформовані біоплівки цих штамів різних речовин, що дасть змогу розробити стратегії їх використання для боротьби з ураженнями людини, опосередкованими плівкоутворюючими штамми бактерій.

## Література

1. Габриэлян Н. И. Исследование антибиотико- и фагочувствительности нозокомиальных штаммов микроорганизмов, выделенных от пациентов трансплантологической клиники / Н. И. Габриэлян, Е. М. Горская, Т. С. Спирина [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2011. – Т. XIII, №3. – С. 26-32.
2. Мидленко В. И. Чувствительность к препаратам бактериофагов возбудителей осложненной у больных после травм и оперативных вмешательств на опорно-двигательном аппарате / В. И. Мидленко, Г. А. Шевалаев, И. М. Ефремов // Фундаментальные исследования. – 2013. – №9. – С. 871-874.
3. Немцева Н. В. Регуляция симбиотических взаимодействий в альго-бактериальных ассоциациях / Н. В. Немцева, Е. А. Селиванова, А. О. Плотников [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – №4. – С. 62-66.
4. Определитель бактерий Берджи в 2-х тт: пер. с англ. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – М.: Мир, 1997. – Т. 2. – 368 с.
5. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / [под ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова]. – Смоленск: НИИАХ СГМА, 2002. – 586 с.
6. Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів»: наказ Міністерства охорони здоров'я України № 167 від 05. 04. 2007 р. – К.: МОЗ України, 2007. – 63 с.
7. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. – Кн. 1 / Колл. авторов / Под ред. А. С. Лабинской, Е. Г. Волиной. – М.: БИНОМ, 2008. – 1080 с.
8. Чеботарь И. В. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий / И. В. Чеботарь, А. Н. Маянский, Е. Д. Кончакова [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Том 14, № 1. – С. 51-58.
9. Costerton J. W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg // Science. – 1999. – Vol. 284, № 5418. – P. 1318-1322.
10. Costerton J. W. Microbial biofilms / J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell [et al.] // Annual Review of Microbiology. – 1995. – Vol. 49. – P. 711-745.
11. Donlan R. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R. M. Donlan, J. W. Costerton // Clinical Microbiology Reviews. – 2002. – Vol. 15, №2. – P. 167-193.
12. Fedtke I. Bacterial evasion of innate host defenses – the *Staphylococcus aureus* lesson / I. Fedtke, F. Gotz, A. Peschel // International Journal of Medical Microbiology. – 2004. – Vol. 294, № 1-2. – P. 189-194.
13. Kutateladze M. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or antibiotics / M. Kutateladze, R. Adamia // Trends in Biotechnology. – 2010. – Vol. 28, № 12. – P. 591-595.
14. Mah T. F. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents / T. F. Mah, G. A. O'Toole // Trends in Microbiology. – 2001. – Vol. 9. – P. 34-39.
15. Monk A. B. Bacteriophage applications: where are we now? / A. B. Monk, C. D. Rees, P. Barrov [et al.] // Letters in Applied Microbiology. – 2010. – Vol. 51. – P. 363-369.
16. Watnick P. Biofilm, city of microbes / P. Watnick, R. Kolter // Journal of Bacteriology. – 2000. – Vol. 182, № 10. – P. 2675-2679.

УДК 579.61:616-078

### ЧУТЛИВІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ ТА ЛІКУВАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ БАКТЕРІОФАГІВ ПЛІВКОУТВОРЮЮЧИХ ТА НЕПЛІВКОУТВОРЮЮЧИХ ШТАМІВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКА

Лазарев Є. В., Воробей Є. С., Воронкова О. С.

**Резюме.** В результаті вивчення 13 штамів *S. aureus*, виділених з репродуктивного тракту жінок, було визначено їх здатність формувати біоплівки, чутливість до антибіотиків та комерційних препаратів бактеріофагів. Плівкоутворення спостерігалася у 8 штамів (61,5% їх загальної кількості). Встановлено, що

плівкоутворюючі штами проявили найбільшу чутливість до цефазоліну, іміпенему, доксицикліну, нетилміцину, офлоксацину та лінезоліду (понад 87,5%); неплівкоутворюючі штами проявили високу чутливість до усіх антибіотиків окрім бензилпеніциліну та еритроміцину. Низька чутливість серед штамів обох груп спостерігалася до бензилпеніциліну та еритроміцину (23,1%). Серед препаратів бактериофагів найбільша чутливість спостерігалася до стафілококкового бактериофагу рідкого (46,2%), найменша – до піобактеріофагу полівалентного (23,1%). Здатні до плівкоутворення штами були менш чутливими до усіх вивчених препаратів.

**Ключові слова:** стафілококи, плівкоутворення, бактериофаги, антибіотики.

УДК 579. 61:616-078

### **ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ И ЛЕЧЕБНЫМ ПРЕПАРАТАМ БАКТЕРИОФАГОВ ПЛЕНКООБРАЗУЮЩИХ И НЕПЛЕНКООБРАЗУЮЩИХ ШТАММОВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА**

**Лазарев Е. В., Воробей Е. С., Воронкова О. С.**

**Резюме.** В результате изучения 13 штаммов *S. aureus*, выделенных из репродуктивного тракта женщин, были определены их способность формировать биопленки, чувствительность к антибиотикам и коммерческим препаратам бактериофагов. Пленкообразование наблюдалось в 8 штаммов (61,5% их общего количества). Установлено, что пленкообразующие штаммы проявили наибольшую чувствительность к цефазолину, имипенему, доксициклину, нетилмицину, офлоксацину и линезолиду (более 87,5%); непленкообразующие штаммы проявили высокую чувствительность ко всем антибиотикам кроме бензилпенициллина и эритромицина. Низкая чувствительность среди штаммов обеих групп наблюдалась к пенициллину и эритромицину (23,1%). Среди препаратов бактериофагов наибольшая чувствительность наблюдалась к стафилококковому бактериофагу жидкому (46,2%), наименьшая – к пиобактериофагу поливалентному (23,1%). Способные к пленкообразованию штаммы были менее чувствительными ко всем изученным препаратам.

**Ключевые слова:** стафилококки, пленкообразование, бактериофаги, антибиотики.

UDC 579. 61:616-078

### **Sensitivity to Antibiotics and Medicinal Products Bacteriophages the Filmforming and Non-Filmforming Strains of Staphylococcus Aureus**

**Lazarev E. V., Vorobey E. S., Voronkova O. S.**

**Abstract.** As a result of the study of *S. aureus* 13 strains isolated from the reproductive tract of women, their ability to form biofilm, susceptibility to antibiotics and commercial preparations bacteriophages drugs were defined. Under the study of filmformation of experimental cultures for 8 strains (61.5%) ability to form biofilm was showed. Under biofilms microscopy revealed distinct groups of staphylococcicells.

Studied strains were most sensitive to cefazolin, imipenem, doxycycline, netylmicin, clindamycin, ofloxacin and linezolid. Sensitivity to them varied from 84.6% to 100.0%. Low ranges of sensitivity were observed to benzylpenicillin and erythromycin (23. 1%).

In our studies discovered that took place a differences in sensitivity to antibiotics between filmforming and non-filmforming strains. Sensitivity of eperimental strains to cefuroxime had significantly difference. Among the filmforming strain sensitivity was less than 25%, while among non-filmforming strains was higher up to 80%. Sensitivity to clindamycin had less difference: 75% of the filmforming strains and 100% non-filmforming strains were sensitive. In the case of linezolid opposite trend was shown. The sensitivity of filmforming strains was higher than non-filmforming strains (100% and 80% respectively).

Study of the 13 strains of *S. aureus* sensitivity to piobacteriophage polyvalent, intesti-bacteriophages liquid and staphylococcal bacteriophage liquid showed that highest sensitivity was to staphylococcal bacteriophage liquid (46.2%), the lowest – topiobacteriophage polyvalent (23. 1%).

Sensitivity to bacteriophage drugs varied considerably in the filmforming and non-filmforming strains. Sensitivity to staphylococcal bacteriophage of the filmforming strains was 37. 5%, for non-filmforming strains – 60%. A similar pattern was observed for intesti-bacteriophage and piobacteriophage: sensitivity of non-filmforming strains was higher (60% and 40% respectively) comparatively to filmforming (25% and 12.5% respectively).

Study of sensitivity to bacteriophages of *S. aureus* filmforming and non-filmforming strains showed that the ability to filmformation bind with less susceptibility to all studied phages drugs. Also for non-filmforming strains observed high sensitivity not only to staphylococcal bacteriophage liquid, but also to intesti – bacteriophage liquid.

Our results indicate that the film-forming strains of bacteria more resistant to action of antibiotic and bacteriophages drugs make troubles in fighting with them. So promising is the continuation of more detailed studies of the impact on planctonic cultures and biofilms are formed by these strains of different substances, that will help to develop strategies to use them for treatment of the human diseases, caused by filmforming strains of bacteria.

**Key words:** staphylococci, filmformation, bacteriophages, antibiotics.

*Рецензент – проф. Лобань Г. А.*

*Стаття надійшла 21. 05. 2014 р.*