

ВИВЧЕННЯ БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ ЕНТЕРОКОКІВ, ВИДІЛЕНИХ З РІЗНИХ ЕКОТОПІВ

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова
Національної академії медичних наук України» (м. Харків)

elenzhor@ukr.net

Робота виконана в лабораторії загальної мікробіології з Музеєм мікроорганізмів ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних наук України» у рамках планової НДР «Розробка засобів впливу на біоплівкоутворення у мікроорганізмів роду *Enterococcus*», № державної реєстрації 0115U000547.

Вступ. Виявлення у мікроорганізмів здатності утворювати біоплівки викликало в останні роки значний інтерес, як серед мікробіологів, так і серед спеціалістів з клінічної медицини. За даними різних авторів достеменно встановлена роль біоплівок у 60-80% випадків хронічних та рецидивуючих захворювань мікробної етіології [2, 5, 9]. На сьогодні серйозну загрозу для практичної медицини становить біоплівкоутворення шпитальними штамами бактерій. Ентерококи, насамперед *Enterococcus faecium* та *Enterococcus faecalis*, є третьою за розповсюдженістю причиною шпитальних інфекцій, більшість з яких пов'язана з використанням постійного медичного обладнання [6, 8]. Важливим кроком у патогенезі цих інфекцій є колонізація біогенних та абіогенних поверхонь ентерококами і формування біоплівок. Особливого значення це набуває у відділеннях інтенсивної терапії, хірургічних стаціонарах, оскільки утворення біоплівок – причина виникнення важких катетер- і вентилятор-асоційованих внутрішньолікарняних інфекцій, сепсисів, пневмоній і ендокардитів. Неефективна антибіотикотерапія інфекцій, що супроводжуються утворенням біоплівок, призводить до значних економічних витрат [1, 3].

Незважаючи на досить чисельну кількість публікацій щодо патогенного потенціалу ентерококів, здатність до утворення біоплівок цими мікроорганізмами вивчена недостатньо. Більш вивчено біоплівкоутворення у *Enterococcus faecalis*, за даними деяких авторів близько 80% клінічних штамів цього виду здатні утворювати біоплівки [7, 10].

Мета дослідження – провести вивчення здатності до біоплівкоутворення у ентерококів, виділених з різних екоотопів.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводили на штамів, виділених з патологічного матеріалу: ліквору (12) та сечі (11) хворих на нейрохірургічну патологію (НХП) після оперативного втручання; поверхні трофічних виразок (11) та кишечника (5) хворих на цукровий діабет (ЦД); сечі, уретри (28) хворих на інфекції сечовивідних шляхів (ІСВШ); ки-

шечника (13) хворих на гострі кишкові інфекції (ГКІ). Для порівняння обрано штами, ізольовані з кишечника здорових осіб (23).

Здатність ентерококів формувати біоплівки вивчали фотометричним методом у нашій модифікації. Нами було запропоновано використання стерильних одноразових пластикових 4-х секційних чашок Петрі. Мікробну суспензію добової культури ентерококів щільністю 0,5 од. за Mc Farland готували за допомогою денсилометра. У кожний сектор 4-секційної пластикової чашки Петрі вносили по 1,75 мл TSB-середовища з 1% глюкозою, додавали по 0,25 мл мікробної суспензії ентерококів, для контролю – 0,25 мл середовища. Інкубували при температурі 37 °С на протязі 48 годин, триразово відмивали фосфатно-сольовим буферним розчином (рН 7,2-7,4), висушували при кімнатній температурі на протязі 30 хв. Та фарбували біоплівки 1% водним розчином кристал-віолету. Елюацію біоплівкової маси проводили дворазово 2-ма мл етанолу/ізопропанолу (1:1) на протязі 20 хв. Вимірювання оптичної щільності елюата здійснювали на спектрофотометрі СФ-56Л при довжині хвилі 590 нм.

За інтенсивністю біоплівкоутворення ентерококи розподіляли на штами з високим, середнім та низьким ступенем згідно рекомендаціям Stepanovic S. et al. [4].

Статистична обробка отриманих результатів проведена з обчисленням t-критерія Стьюдента з визначенням частоти (P,%) і стандартної похибки (m). Різницю вважали статистично достовірною при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Аналіз результатів проведених досліджень показав, що серед усіх взятих в дослід ентерококів здатність до біоплівкоутворення визначена у 65,1% штамів (табл.). При цьому, кількість біоплівкоутворюючих штамів серед *E. faecalis* була високою і складала 86,2%, що узгоджується з даними інших авторів [7, 10]. Значно меншу здатність до плівкоутворення, за нашими результатами, встановлено у *E. faecium*. Так, питома вага біоплівкоутворюючих ентерококів цього виду складала лише 29,0%. Такі ж самі закономірності було встановлено при аналізі даних щодо здатності до біоплівкоутворення клінічних штамів ентерококів. Кількість біоплівкоутворюючих штамів серед ентерококів, виділених з патологічного матеріалу хворих, дорівнювала 71,3%, при цьому серед *E. faecalis* цей показник сягав 87,0%, серед *E. faecium* – 38,5%.

Слід відмітити, що здатність ентерококів до біоплівкоутворення була різною у залежності від екотопу виділення. Найбільша кількість біоплівкоутворюючих ентерококів визначена серед штамів, ізольованих із поверхні трофічних виразок хворих на ЦД та з сечі й уретри хворих на ІСВШ ($p < 0,05$). Цей показник у ентерококів, вилучених з ліквору та з сечі хворих на НХП, кишечника хворих на ЦД і ГКІ достовірно не відрізнявся від аналогічного показника у штамів, виділених з кишечника здорових осіб ($p > 0,05$). На наш погляд, це можна пояснити тим, що за видовим складом ентерококів, що ізольовані від хворих на ІСВШ та ЦД, були представлені переважно *E. faecalis*; а серед штамів, які було вилучено від хворих на НХП, домінували *E. faecium*.

Слід підкреслити, що ентерококи характеризувались різною інтенсивністю біоплівкоутворення. Так, встановлено, що серед біоплівкоутворюючих ентерококів, вилучених з ран та кишечника хворих на ЦД, домінували штамми з високою здатністю до біоплівкоутворення, їх кількість дорівнювала 60,0% та 66,7%, зі середнім – 40,0% і 33,3% відповідно. Штамів з низьким ступенем біоплівкоутворення у цій групі не виявлено.

Серед біоплівкоутворюючих ентерококів, вилучених від хворих на ІСВШ, кількість штамів з високою здатністю до біоплівкоутворення була високою і складала (52,0)%. Достовірної різниці між кількістю ентерококів зі середнім (28,0%) та низьким (20,0%) ступенем біоплівкоутворення у цій групі не виявлено ($p > 0,05$).

Встановлено, що серед біоплівкоутворюючих ентерококів, вилучених з ліквору та сечі хворих на НХП, кількість штамів з високою здатністю до біоплівкоутворення

складала 33,3% та 14,3%, із середнім 50,0% та 28,6%, з низьким ступенем 16,7% та 57,1% відповідно.

Таким чином, слід відзначити, що серед штамів, вилучених з ліквору хворих на НХП, переважали штамми з середнім та високим ступенем біоплівкоутворення, тоді як серед ентерококів, виділених з сечі хворих на НХП – з низьким ($p < 0,05$).

За результатами досліджень ентерококів, вилучених з кишечника хворих на ГКІ, штамми за ступенем біоплівкоутворення розподілялись наступним чином: з високим – 33,3%, із середнім – 50,0%, з низьким ступенем біоплівкоутворення – 16,7%.

В результаті проведених досліджень нами були відібрані штамми ентерококів з високою здатністю до біоплівкоутворення для подальшої роботи.

Висновки. з усіх досліджених ентерококів здатність до біоплівкоутворення визначена у 65,1% штамів. Встановлено, що кількість біоплівкоутворюючих штамів серед *E. faecalis* була достовірно вищою, ніж *E. faecium*, і складала 86,2% та 29,0% відповідно. Найбільша кількість біоплівкоутворюючих ентерококів визначена серед штамів, ізольованих із поверхні трофічних виразок хворих на ЦД (90,9%) та з сечі й уретри хворих на ІСВШ (89,3%). Ентерококи характеризувались різною інтенсивністю біоплівкоутворення. Найбільша кількість штамів з високим ступенем була визначена серед ентерококів, виділених з сечі й уретри хворих на ІСВШ (52,0%).

Перспективи подальших досліджень. У подальшому планується провести дослідження по визначенню найбільш ефективних сполук з потенціалом інгібувальної дії на біоплівки.

Таблиця

Розподіл штамів ентерококів за ступенем біоплівкоутворення

Екоtop виділення ентерококів	Здатність до біоплівкоутворення у ентерококів			
	відсутнє	низького ступеня	середнього ступеня	високого ступеня
	абс. число (P, %)	абс. число (P, %)	абс. число (P, %)	абс. число (P, %)
Ліквор хворих на НХП (12)	6 (50,0)	1 (8,3)	3 (25,0)	2 (16,7)
Сеча хворих на НХП (11)	4 (36,4)	4 (36,4)	2 (18,2)	1 (9,0)
Трофічні виразки хворих на ЦД (11)	1 (9,1)	0	4 (36,4)	6 (54,5)
Кишечник хворих на ЦД (5)	2 (40,0)	0	1 (20,0)	2 (40,0)
Сеча, уретра хворих на ІСВШ (28)	3 (10,7)	5 (17,9)	7 (25,0)	13 (46,4)
Кишечник хворих на ГКІ (13)	7 (53,8)	1 (7,7)	3 (23,1)	2 (15,4)
Кишечник здорових осіб (23)	13 (56,5)	3 (13,0)	2 (8,7)	5 (21,8)
Всього (103)	36 (34,9)	14 (13,6)	22 (21,4)	31 (30,1)

Література

1. Голуб А.В. Бактериальные биопленки – новая цель терапии? / А.В. Голуб // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2012. – Том 14, № 1. – С. 23–29.
2. Гостев В.В. Бактериальные биопленки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 4–15.
3. Микробные биопленки в хирургии / Ю.С. Винник, О.В. Перьянова, Е.В. Онзуль [и др.] // Новости хирургии. – 2010. – Т. 18, № 6. – С. 115–125.
4. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation / S. Stepanovic [et al.] // Journal of Microbiological Methods. – 2000. – № 40. – P. 175–179.

5. Biel M.A. Photodynamic therapy of bacterial and fungal biofilm infections / M.A. Biel // *Methods Mol. Biol.* – 2010. – № 635. – P. 175-194.
6. Hall-Stoodley L. Evolving concepts in biofilm infections / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // *Cell Microbiol.* – 2009. – № 11(7). – P. 1034-43.
7. Mohamed J.A. Biofilm formation by enterococci / J.A. Mohamed, D.B. Huang // *J. Med. Microbiol.* – 2007. – № 56. – P. 1581-1588.
8. Pilin and sortase residues critical for endocarditis- and biofilm-associated pilus biogenesis in *Enterococcus faecalis* / H.V. Nielsen, A.L. Flores-Mireles, A.L. Kau [et al.] // *J. Bacteriol.* – 2013. – № 195. – P. 4484–4495.
9. Pintucci J.P. Biofilms and infections of the upper respiratory tract / J.P. Pintucci, S. Corno, M. Garotta // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* – 2010. – Vol. 14. – P. 683–690.
10. Ramadhan A. A. Biofilm formation and esp gene carriage in enterococci / A. A. Ramadhan, E. Hegedus // *J. Clin. Pathol.* – 2005. – № 58. – P. 685–686.

УДК 579.61:579.86:579.26:57.055

ВИВЧЕННЯ БІОПЛІВКУОТВОРЕННЯ ЕНТЕРОКОКІВ, ВИДІЛЕНИХ З РІЗНИХ ЕКОТОПІВ

Мироненко Л.Г., Перетятко О.Г., Ягнюк Ю. А.

Резюме. Вивчено здатність до біоплівкуотворення клінічних штамів ентерококів, виділених з різних екопів у хворих на цукровий діабет, нейрохірургічну патологію, інфекції сечовивідних шляхів, гострі кишкові інфекції. Встановлено, що з досліджених клінічних штамів ентерококів здатність до утворення біоплівок визначена у 71,3%, причому, кількість біоплівкуотворюючих штамів серед *E. faecalis* була достовірно вищою, ніж серед *E. faecium*. Найбільша кількість біоплівкуотворюючих ентерококів визначена серед штамів, ізольованих із поверхні трофічних виразок хворих на цукровий діабет (90,9%) та з сечі й уретри хворих на інфекції сечовивідних шляхів (89,3%). Ентерококи, виділені з різних екопів, характеризувались різною інтенсивністю утворення біоплівок. Найбільша кількість штамів з високим ступенем біоплівкуотворення була визначена серед ентерококів, виділених з сечі й уретри хворих на інфекції сечовивідних шляхів (52,0%).

Ключові слова: біоплівкуотворення, *E. faecalis*, *E. faecium*, екотопи.

УДК 579.61:579.86:579.26:57.055

ИЗУЧЕНИЕ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ ЭНТЕРОКОККОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ЭКОТОПОВ

Мироненко Л.Г., Перетятко Е.Г., Ягнюк Ю. А.

Резюме. Изучена способность к биопленкообразованию клинических штаммов энтерококков, выделенных из разных экотопов у больных сахарным диабетом, с нейрохирургической патологией, инфекциями мочевыводящих путей, острыми кишечными инфекциями. Установлено, что из исследованных клинических штаммов энтерококков способность к образованию биопленок определялась у 71,3%, причем, количество биопленкообразующих штаммов среди *E. faecalis* было достоверно выше, чем среди *E. faecium*. Наибольшее количество биопленкообразующих энтерококков определено среди штаммов, изолированных с поверхности трофических язв больных сахарным диабетом (90,9%), а также из мочи и уретры, больных с инфекциями мочевыводящих путей (89,3%). Энтерококки, выделенные из разных экотопов, характеризовались различной интенсивностью образования биопленок. Наибольшее количество штаммов с высокой степенью биопленкообразования определено среди энтерококков, выделенных из мочи и уретры больных с инфекциями мочевыводящих путей (52,0%).

Ключевые слова: биопленкообразование, *E. faecalis*, *E. faecium*, экотопы.

UDC 579.61:579.86:579.26:57.055

The study of Biofilm Formation of Enterococci Isolated from Various Ecotopes

Myronenko L.G., Peretyatko O.G., Iagnyk J. A.

Abstract. In recent years, scientists from different countries proved that peculiarities of infection processes in inflammatory diseases are connected to the ability of microorganisms to form biofilms. At present, biofilm formation by hospital strains of bacteria constitutes a serious threat to practical medicine. Enterococci, particularly *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*, are the third major cause of hospital infections, most of which involve the use of permanent medical equipment.

The aim of the research was to study the ability of enterococci isolated from different ecotopes to form biofilms.

Objects and methods of research. 80 strains isolated from pathological material studied: cerebrospinal fluid (12) and urine (11) of patients with neurosurgical pathology (NSP) after surgery; venous ulcers surface (11) and intestine (5) of patients with diabetes mellitus (DM); urine, urethra (28) of patients with urinary tract infections (UTI); intestine (13) of patients with acute intestinal infections (All). Strains isolated from the intestine of healthy individuals (23) were selected for comparison.

The ability of enterococci to form biofilms was studied applying our modification of photometric method on SF-56L spectrophotometer at a wavelength of 590 nm.

Results. It was found that the number of enterococci strains isolated from patients with pathological material able to form biofilms equaled to 71.3%, while among *E. faecalis* this figure was 87.0% and among *E. faecium* – 38.5%. The largest number of enterococci able to form biofilms were found among strains isolated from the venous ulcers surface of patients with DM (90.9%) and from urine and urethra of patients with UTI (89.3%) ($p < 0.05$). This figure for enterococci isolated from the cerebrospinal fluid and urine of patients with NSP, intestine of patients with DM and All

were not significantly different from similar strains isolated from the intestine of healthy individuals ($p>0,05$). Among enterococci able to form biofilms that were isolated from wounds and intestine of patients with DM, the strains with high ability to form biofilms dominated, their number amounted to 60.0% and 66.7%, with a medium ability – 40.0% and 33.3%, respectively. No strains with low degree of biofilm formation were found in this group. Among enterococci able to form biofilms that were isolated from patients with UTI, the number of strains with high ability to form biofilms was also high (52.0%). No significant difference between the number of enterococci with average (28.0%) and low (20.0%) degree of biofilm formation was found in this group ($p>0.05$). It was found that among strains of enterococci able to form biofilms that were isolated from the cerebrospinal fluid and urine of patients with NSP, the number of strains with high ability to form biofilms was 33.3% and 14.3%, with average ability – 50.0% and 28.6%, with low ability – 16.7% and 57.1%, respectively. According to the results of the study of enterococci isolated from the intestine of patients with All, strains distributed by the degree of biofilm formation in the following way: with high degree – 33.3%, with average degree – 50.0%, with low degree – 16.7%.

Conclusions. Ability to form biofilms was determined for 71.3% of the studied clinical strains of enterococci. The number of strains able to form biofilms was significantly higher among the *E. faecalis* strains than among the *E. faecium* ones. The largest number of enterococci able to form biofilms were found among strains isolated from the venous ulcers surface of patients with DM and from urine and urethra of patients with UTI. Enterococci, isolated from different ecotopes, were characterized by different intensity of biofilm formation. The largest number of strains with high degree of biofilm formation was identified among enterococci isolated from urine and urethra of patients with UTI.

Keywords: biofilm formation, *E. faecalis*, *E. faecium*, ecotopes.

Рецензент – проф. Лобань Г.А.
Стаття надійшла 22.07.2015 р.