

© Кащик О. О., Воронкова О. С., Вінніков А.І.

УДК 579.864:616.1

Кащик О. О., Воронкова О. С., Вінніков А.І.

ФАГОЧУТЛИВІСТЬ СТАФІЛОКОКІВ У БІОПЛІВЦІ

Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара (м. Дніпропетровськ)

k_alexa7@mail.ru

Роботу було виконано у межах держбюджетної теми «Структурно-функціональні особливості природних мікробіоценозів та механізми біологічної дії мікробних препаратів» (№ державної реєстрації 0115U002385), що виконується на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара.

Вступ. Згідно сучасним уявленням більшість мікроорганізмів – господарів фагів, існують у навколишньому середовищі у вигляді специфічно організованих, прикріплених до субстрату біоплівки, що формуються на поверхні розділу різних фаз [6]. В даний час є багато визначень біоплівок. Зазвичай вони являють собою складні агрегати мікроорганізмів, прикріплені до інертних поверхонь, і включають продукти їх життєдіяльності [8]. Це складні динамічні структури, в яких відбуваються різні метаболічні процеси, а також взаємодія між клітинами і їх компонентами. У природньому середовищі – це змішані мікробні спільноти, де в більшості переважають прокариоти, але зустрічаються і еукаріоти [5].

Лізис бактеріальних клітин в біоплівці може відбуватися як природним шляхом при їх старінні, так і при взаємодії з бактеріофагами. Коли фаг вступає в контакт з біоплівкою, подальші взаємодії відбуваються в залежності від сприйнятливості бактерій біоплівки до фагу і наявності рецепторних ділянок. Якщо бактеріофаг також володіє ферментами, що розкладають полісахариди, або здійснює лізис мікробних клітин, то цілісність біоплівки може бути швидко порушена. Однак може скластися і співіснування між фагом і бактеріями-господарями всередині біоплівки. Далеко не до кінця зрозумілі взаємовідношення біоплівки з бактеріофагами, тому ця проблема потребує подальшого вивчення [3,4].

У зв'язку з цим, **метою роботи** було дослідити чутливість до лікувальних препаратів бактеріофагів штамів *Staphylococcus aureus*, виділених при дисбіозі шлунково-кишкового тракту.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження зі штамми стафілококів проводили на базі лабораторії мікробіології та імунології ДУ «НДІ Гастроентерології НАМН України».

Об'єктом дослідження була частота виявлення чутливості до бактеріофагів біоплівкоутворюючих штамів золотистого стафілокока.

Предмет дослідження складала штамми *S. aureus*, виділені від 51 особи з дисбіозами шлунково-кишкового тракту (ШКТ). Матеріалом для досліджень були зразки фекалій (n=51). Виділення, ідентифікацію та дослідження біологічних властивостей бактерій проводили згідно з наказом «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования» [1].

Всі культури, ідентифіковані як належні до виду *S. aureus* досліджували на прояв плазмокоагуляційної, ліпазної, лецитіназної, гемолітичної та фібринолітичної активності. Визначали їх здатність до утворення біоплівки та чутливість до лікувальних препаратів бактеріофагів.

Для визначення здатності до формування біоплівки чисту культуру виділеного штаму висівали у лунки імунологічного планшета у кількості не менше 10⁵ КУО/мл. Планшет інкубували при +37°C протягом 3 діб. Якщо у цей період формувалася біоплівка – поверхневий чи придонний ріст у лунці, що давав плівку, яка при видаленні середовища осідала на стінках, то штам вважали плівкоутворюючим.

Вивчення чутливості до бактеріофагів здійснювали крапельним методом [2] для препаратів стафілококовий бактеріофаг стафілококовий рідкий, інтестіфаг та іобактеріофаг (НПО «Микроген», РФ).

Результати досліджень та їх обговорення. При проведенні досліджень було відібрано 51 зразок біологічного матеріалу. За результатами досліджень було встановлено, що у 31 зразку з 51 дослідженого було виявлено стафілококи, що склали 60,8% (рис. 1).

За результатами видової ідентифікації встановлена належність виділених штамів до 3 видів (рис. 2).

Частка *S. aureus* серед виділених штамів стафілококів була найбільшою і становила 51% (26 штамів). Також зі значною частотою, яка була майже однаковою з попереднім значенням, виділяли *S. epidermidis* – 45% (23 штамми). Найменша частка

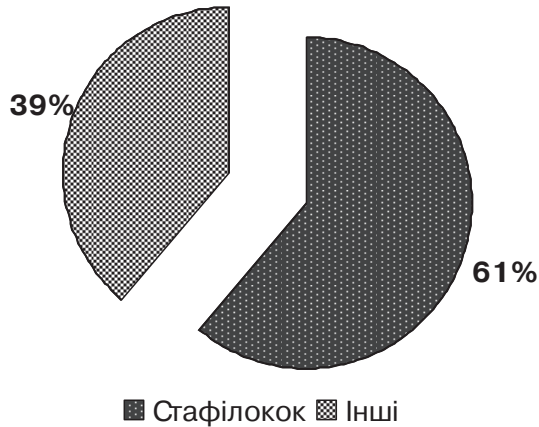


Рис. 1. Частота виявлення стафілококів при дисбіозі ШКТ

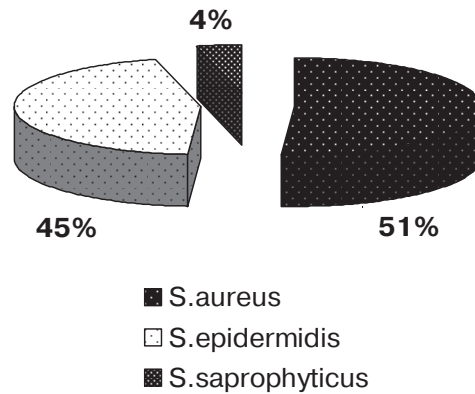


Рис. 2. Видовий спектр стафілококів

серед виділених штамів – 4% (2 штами) була ідентифікована як належна до виду *S. saprophyticus*.

Для всіх штамів *S. aureus* було проведено дослідження здатності утворювати біоплівку. Показано, що 19 (73%) штамів утворювали біоплівку, інші 7 (27%) – не проявили здатності до утворення біоплівки (рис. 3).

Вивчення чутливості до бактеріофагів дозволило встановити, що всі 26 штамів золотистого стафілокока мали чутливість до фагів з якого-небудь із застосованих лікувальних препаратів (Піобактеріофаг, Інтестіфаг та Бактеріофаг стафілококовий рідкий). Деякі штами проявляли чутливість до всіх препаратів, інші – до окремих (рис. 4).

Значної різниці між чутливістю до фагів з лікувальних препаратів «Піобактеріофаг» та «Бактеріофаг стафілококовий» не виявлено. Близько 80-90% штамів були чутливими до них. Виняток складало використання препарату «Інтесті-бактеріофаг»: серед плівкоутворюючих ізолятів чутливими було 51%.

Плями лізису були повними або з бактеріальним ростом, що свідчило про більше чи менше виражену

чутливість до фагів з певних препаратів. У групі плівкоутворюючих штамів зливний лізис зафіксовано для 51% штамів.

Відсутність 100%-го ефекту чутливості є типовим явищем для фаготерапії, адже рецептори на поверхні бактеріальної клітини та рецептори фагів є варіативними структурами. При використанні моновалентних фагів ефект зазвичай не сягає і 15% для штамів бактерій, отриманих з різних джерел. Саме того на сучасному етапі досліджень рекомендується [9] використання «фагових коктейлів», до складу яких входять різні бактеріофаги. Така змішана система дозволить при використанні фагів досягти більшої ефективності дії.

Слід відмітити, що одним з недоліків фагів, з-за якого вони поступилися антибіотикам, є висока специфічність до клітини господаря. Так, вірус здатен знищити лише чутливі штами, а тому при діагностичній помилці (неправильне визначення збудника) або при нечутливості штаму бактерії до даного вірусу, можливі невдачі терапії. У цьому сенсі антибіотики широкого спектру дії мають значні переваги

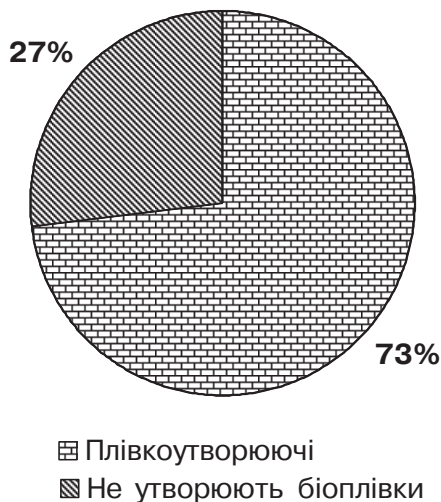


Рис. 3. Частота виявлення здатних до утворення біоплівки штамів

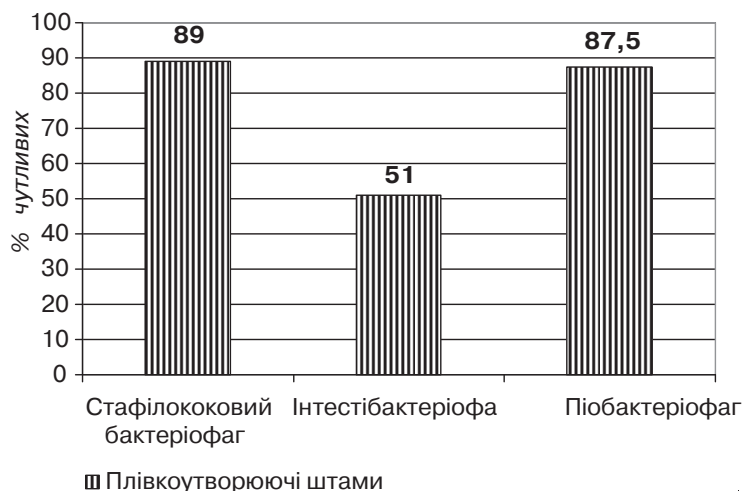


Рис. 4. Частота виявлення чутливих до фагів з лікувальних препаратів штамів золотистого стафілокока

над бактеріофагами: вони знищують всі мікроорганізми, у тому числі і збудника ураження [7].

Висновки

1. Встановлено, що частота виявлення стафілококів при дисбіозі ШКТ у досліджуваному матеріалі складала 60,8% (31 зразок містив ці бактерії).

2. Всі виделені штами стафілококів було ідентифіковано як належні до видів: *S. aureus* – 26 (51%), *S. epidermidis* – 23 (45%), *S. saprophyticus* – 2 (4%).

3. Показано, що 16 (61,5%) штамів *S. aureus* утворювали біоплівку. Понад 70% плівкоутворюючих штамів продукували плазмокоагулазу, ліпазу, лецитіназу, желатиназу та гемолізину.

4. Понад 87,5% штамів були чутливими до «Піобактеріофагу» та «Бактеріофагу стафілококового»,

до «Інтестіфагу» серед плівкоутворюючих ізолятів чутливими були 51%.

Перспективи подальших досліджень. З огляду на думку про те, що лише антибіотикотерапії при підозрі на дисбіоз може бути недостатньо слід здійснювати пошук додаткових маркерів, у тому числі і серед біологічних властивостей мікроорганізмів, що можуть вирішити проблему дисбіозу. Насамперед мова йде про бактеріофаготерапію, як один з шляхів лікування дисбіозу.

Автори висловлюють подяку завідувачу лабораторії мікробіології та імунології ДУ «НДІ Гастроентерології НАМН України» (м. Дніпропетровськ) кандидату біологічних наук, доценту В. Є. Кудрявцевій за можливість проведення досліджень на базі лабораторії.

Література

1. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ № 535. – [чинний від 22.04.1985р.]. – М.: МОЗ СССР, 1985. – 65 с.
2. Поліщук В. П. Посібник з практичних занять з курсу «Загальна вірусологія» / В. П. Поліщук, І. Г. Будзанівська, Т. П. Шевченко. – К.: Фітосоціоцентр, 2005. – 204 с.
3. High abundance of viruses found in aquatic environments / O. Bergh, K. Borsheim, G. Bratbak, M. Heldal // J. Nature. – 1989. – Vol. 340. – P. 467-468.
4. Levin B. R. Coevolution in bacteria and their viruses and plasmids / B. R. Levin, R. E. Lenski // Co-evolution. Sunderland / eds. D.J. Futuyama, M. Slatkin. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. – 1983. – P. 99-127.
5. Microbial biofilms / J. W. Costerton [et al.] // J. Annu. Rev. Microbiol. – 1995. – Vol. 49. – P. 711-745.
6. O'Toole G. A. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis / G. A. O'Toole, R. Kolter // Mol Microbiol. – 1998. – Vol. 28 (3). – P. 449-461.
7. O'Flaherty S. Bacteriophage and their lysins for elimination of infectious bacteria / S. O'Flaherty, R. P. Ross, A. Coffey // J. FEMS Microbiol. Rev. – 2009. – Vol. 33. – P. 801-819.
8. Stent G. S. Molecular Biology of Bacterial Viruses / G. S. Stent. – San Francisco, CA: WH Freeman and Co., 1963.
9. The interaction of phage and biofilms / W. Sutherland [et al.] // J. FEMS Microbiol. Lett. – 2004. – Vol. 232. – P. 1-16.

УДК 579.864:616.1

ФАГОЧУТЛИВІСТЬ СТАФІЛОКОКІВ У БІОПЛІВЦІ

Кащик О. О., Воронкова О. С., Вінников А. І.

Резюме. Активне поширення штамів стафілококів як збудників уражень людини та значна їх стійкість до антибіотиків вказують на необхідність пошуку лікарських засобів, до яких мікроорганізми є чутливими. По відношенню до стафілококів такими препаратами можуть стати бактеріофаги. Метою роботи було дослідити чутливість до лікувальних препаратів бактеріофагів штамів *S. aureus*, виділених при дисбіозі шлунково-кишкового тракту. Для проведення досліджень використані бактеріологічні та вірусологічні методи. У результаті дослідження встановлено, що у 31 (60,8%) зразку були виявлені стафілококи, з яких 26 (51%) штамів віднесено до виду *S. aureus*, 23 (45%) штамів – до *S. epidermidis* та 2 (4%) – до *S. saprophyticus*. Понад 87,5% штамів були чутливими до «Піобактеріофагу» та «Бактеріофагу стафілококового рідкого», а до «Інтестіфагу» серед плівкоутворюючих ізолятів чутливими були 51%.

Ключові слова: стафілокок, біоплівка, фагочутливість, дисбіоз.

УДК 579.864: 616.1

ФАГОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ СТАФИЛОКОКОВ В БИОПЛЕНКЕ

Кащик А. А., Воронкова О. С., Винников А. И.

Резюме. Активное распространение штаммов стафилококка как возбудителей поражений человека и значительная их устойчивость к антибиотикам указывают на необходимость поиска лекарственных средств, к которым микроорганизмы чувствительны. По отношению к стафилококкам такими препаратами могут стать бактериофаги. Целью работы было исследовать чувствительность к лечебным препаратам бактериофагов штаммов *S. aureus*, выделенных при дисбиозе желудочно-кишечного тракта. Для проведения исследований использованы бактериологические и вирусологические методы. В результате исследования установлено, что у 31 (60,8%) образцах были обнаружены стафилококки, из которых 26 (51%) штаммов отнесены к виду *S. aureus*, 23 (45%) штаммов – к *S. epidermidis* и 2 (4%) – к *S. saprophyticus*. Более 87,5% штаммов были чувствительны к «Пиобактериофагу» и «Бактериофага стафилококкового жидкого», а к «Интестифагу» среди пленкообразующих изолятов чувствительными были 51%.

Ключевые слова: стафилококк, биопленка, фагочутливість, дисбіоз.

UDC 579.864:616.1

SENSITIVITY TO PHAGES OF STAPHYLOCOCCI IN BIOFILM

Kashchik O. O., Voronkova O. S., Vinnikov A. I.

Abstract. According to modern concepts, most microorganisms are carried the phages and been in the environment in the form of specific organized structure, attached to the substrate, known as the biofilms. Lysis of bacterial cells in the biofilm can occur naturally when they are aging, and under the interaction with bacteriophages. When phage have a contact with cells in biofilm, further interactions occur depending on the bacterial susceptibility in film status to phages that depend on the presence of specific phage receptor sites on surface of bacterial cell. If bacteriophage also has enzymes that decompose polysaccharides, or performs lysis of microbial cells, the integrity of the biofilm can be quickly broken. However, it may arise and coexistence between phage and bacteria inside the biofilm-owners. Not well understood the relationship of biofilm and bacteriophages, so this issue needs further study. Active dissemination of staphylococci strains as causative agents of human infection and fact of their resistance to antibiotics point to the need to find the drugs to which these organisms are sensitive. In relation to staphylococci such drugs can be find among bacteriophages.

Phages can be multiply in the biofilm in large amounts to achieve complete infection and kill bacteria – this is a passive process. In contrast, treatment with the active biofilms for achieving direct antibacterial effect requires much less phages. Passive treatment may be carried by the phages modified so that they could not occur productive infection. In some cases passive processing may be implemented using many phages to bacteria that were lysed literally. At least under the passive treatment the phage added as needed to achieve the desired level of destruction of bacterial biofilms, without relying on the completion of phages produced by replication in situ within biofilms. The death of cells in biofilm by a passive treatment is a function of the rate of absorption of the phage, and the opportunities arising from this velocity lysis (active penetration of the phage). With active handling phages should give enough offspring to infection (a large number of output) for their high activity. Thus, the active biofilm treatment requires a high activity during the growth of the phage population. Various attacking enzymes may be combined with phages, or to run the penetration phages or for spreading of bacteria or biofilms, against which may be effective in the or another ingredient exposure. When destroying biofilms are no special differences between the authors of active and passive methods of processing. This is due to the fact that when detecting the formed biofilm bacteria density is already relatively high, and implies that there is at least a small possibility to amplify phage densities sufficient to control biofilms. The aim of research was to investigate the sensitivity to bacteriophages drugs of strains of *S. aureus*, isolated from persons with signs of gastrointestinal tract dysbiosis. For research were use bacteriological and virological methods. In the study was found that 31 (60.8%) samples contain staphylococci, of which 26 (51%) strains identified as *S. aureus*, 23 (45%) strains – as *S. epidermidis* and 2 (4%) – as *S. saprophyticus*. More than 87.5% of strains were susceptible to “Piobacteriophage” and to “Bacteriophage staphylococcal liquid”, and to “Intestiphage” among filmforming isolates susceptible were 51%.

In view of the opinion that the only antibiotic therapy for suspected dysbiosis may not want to search additional markers, including biological properties of microorganisms that can solve the problem of dysbiosis. First of all, it is about phage therapy as one of alternative way to treat the dysbiosis.

Keywords: staphylococci, biofilm, sensitivity to phages, dysbiosis.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.
Стаття надійшла 28.10.2015 року