

**ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ БІОПЛІВКОУТВОРЮЮЧИХ ТА
НЕУТВОРЮЮЧИХ ПЛІВКУ ШТАМІВ ЗОЛОТИСТОГО
СТАФІЛОКОКУ ДО БАКТЕРІОФАГІВ**

**Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара
(м. Дніпро)**

alinadzigunenko@ukr.net

Робота виконана у рамках держбюджетної теми № 1-294-15 «Структурно-функціональні особливості природних мікробіоценозів та механізми біологічної дії антимікробних препаратів».

Вступ. Існування бактерій у навколишньому середовищі та організмі людини відбувається у складі структурно організованих конгломератів, оточених захисним полісахаридним матриксом, знаних як біоплівки. Такий стан є основним і надає певні переваги порівняно з існуванням у планктонній формі [1].

Найбільш відомим плівкоутворюючим мікроорганізмом, що викликає ураження людини, є стафілокок [2]. Ці бактерії активно формують біоплівки в організмі людини і на поверхні медичного приладдя (катетерів, протезів, імплантатів).

При існуванні у плівці відмічається підвищена стійкість бактерій до несприятливих факторів зовнішнього середовища, у тому числі до впливу різних антимікробних агентів, а також до дії імунної системи організму-господаря [3,4].

Незважаючи на те, що зараз з'явилась велика кількість робіт, присвячених дослідженню мікробних біоплівок та методів боротьби з ними, відносно мало вивчається вплив різних факторів на біоплівки, що має на меті розробку заходів боротьби з ними в клінічних умовах. Дослідження в цьому напрямку мають стати основою для подальшого розуміння аспектів взаємодії клітин у біоплівці та розробки більш ефективних методів знищення біоплівок різного походження за допомогою різних чинників у медицині.

З огляду на це **метою роботи** було дослідити чутливість до лікувальних препаратів бактеріофагів серед плівкоутворюючих та неутворюючих плівку штамів золотистого стафілокока.

Об'єкт і методи досліджень. Дослідження проводили на базі лабораторії мікробіології та імунології ДУ «НДІ Гастроентерології НАМН України» (м. Дніпро).

Об'єктом дослідження була чутливість біоплівкоутворюючих та неутворюючих плівку штамів золотистого стафілокока до лікувальних фагів.

З носу та зіву осіб-добровольців було відібрано 54 зразки біологічного матеріалу, що містив грампозитивні коки. Ідентифікацію стафілококів проводили відповідно до рекомендацій Наказу № 535 «Об'єднання мікробіологічних (бактеріологічних) методів дослідження, використовуваних в

клініко-діагностических лабораторіях лікувально-профілактичних установ» [5].

Для визначення здатності до формування біоплівки чисту культуру виділеного штаму висівали у лунки 6-лункового планшета у кількості не менше 10^5 КУО/мл у 2 мл живильного середовища (МПБ). Планшет інкубували при $+37^{\circ}\text{C}$ 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. На один 6-лунковий імунологічний планшет засівали по 3 комірки для кожного штаму. Відповідь про здатність до плівкоутворення вважали позитивною, якщо принаймні у одній лунці з трьох формувалася плівка протягом 72 годин.

Для визначення чутливості штамів до бактеріофагів використовували метод Фішера [6]. Визначення чутливості до лікувальних препаратів бактеріофагів здійснювали для препаратів «Піобактеріофаг полівалентний» (Секстафаг), «Інтесті-фаг» та «Бактеріофаг стафілококовий рідкий» (НПП «Микроген», РФ). Враховували наявність та характер зони лізису у місці нанесення краплини фагового препарату.

Результати дослідження та їх обговорення. З дослідженого біологічного матеріалу було виділено 26 штамів, які ідентифікували як належні до виду *Staphylococcus aureus*. Встановлено, що 16 (61,5%) з них утворювали біоплівку, інші 10 (38,5%) – не проявили здатності до утворення біоплівки.

Вивчення чутливості до бактеріофагів дозволило встановити, що всі вони були чутливі до фагів з якогось-небудь із застосованих лікувальних препаратів (Піобактеріофаг, Інтестіфаг та Бактеріофаг стафілококовий рідкий). Деякі штами проявляли чутливість до всіх препаратів, інші – до окремих (**рис.**).

Значної різниці між чутливістю до фагів з лікувальних препаратів «Піобактеріофаг» та «Бактеріофаг стафілококовий» серед плівко- та неплівкоутворюючих штамів не виявлено. Близько 80-90% штамів були чутливими до них. Виняток складало використання препарату «Інтесті-бактеріофаг»: серед плівкоутворюючих ізолятів чутливими було 56,3%, в той час як показник для неплівкоутворюючих штамів становив 70%.

Плями лізису були повними або з бактеріальним ростом, що свідчило про більше чи менше виражену чутливість до фагів з певних препаратів. Зливний

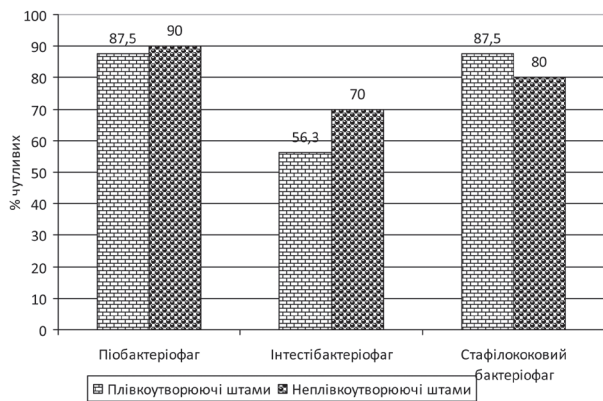


Рис. Частота виявлення чутливих до фагів з лікувальних препаратів штамів золотистого стафілокока.

лізис відмічали лише для 61,5% штамів золотистого стафілокока. Інші штами показували ріст бактеріальних колоній у місці нанесення плями фагового препарату. Зливний лізис переважно був характерний для неутворюючих плівку штамів (80%). У групі плівкоутворюючих штамів зливний лізис зафіксовано для 50% 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 тому на сучасному етапі досліджень рекомендується [7] 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 над бактеріофагами: вони

знищують всі мікроорганізми, у тому числі і збудника ураження [10]. У той же час серед бактерій зараз швидко поширюється резистентність до антибіотиків [9], а введення нових препаратів у клініку стає дедалі більш обмеженим через їх високу токсичність, низьку ефективність, потребу у великих дозах тощо. Так, з 2000 року і до сьогодні у клінічну практику було введено всього 20 нових препаратів [11]. З цих міркувань використання «фагових коктейлів» може вирішити питання вузького спектру дії вірусів бактерій і наблизити ефективність фагових препаратів до антибіотиків. Дослідження ефективності застосування «фагових коктейлів» [7] показало, що при використанні їх для терапії інфекцій у тварин відбувається достовірне зниження летальності. Крім того, фаги виявляються ефективними і проти біоплівки навіть антибіотикорезистентних мікроорганізмів, що надає їм додаткових переваг перед застосуванням антибіотиків [8].

Висновки

1. При дослідженні 54 зразків біологічного матеріалу з верхніх дихальних шляхів у 26 (48%) виявлено *S. aureus*.
2. Встановлено, що 16 (61,5%) штамів *S. aureus* утворювали біоплівку.
3. Понад 80% штамів були чутливими до «Піобактеріофагу» та «Бактеріофагу стафілококового», до «Інтегібактеріофагу» серед плівкоутворюючих ізолятів чутливими було 56,3%, в той час як показник для неплівкоутворюючих штамів становив 70%.

Перспективи подальших досліджень. Проблема стафілококового носійства є однією з найбільш відомих та актуальних у медичній практиці. Носійство стафілококів може обумовлювати велику кількість ускладнень, зокрема, виникнення хронічних уражень дихальних шляхів. Тому існує постійна потреба у застосуванні лікувальних засобів для вирішення проблеми. Іноді застосування антибіотиків стає обмеженим з-за високого рівня стійкості до них у стафілококів, тому застосування бактеріофагів, до яких проявляють високу чутливість як плівко-, так і неплівкоутворюючі штами золотистих стафілококів, може стати ефективним напрямком терапії.

Література

1. Афиногенова А.Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А.Г. Афиногенова, Е.Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. – 2011. – № 3. – С. 119-125.
2. Белобородова Н.В. Клиническое значение микробных биопленок / Н.В. Белобородова // Российские медицинские вести. – 2010. – Т. XV, № 4. – С. 68-72.
3. Гостев В.В. Бактериальные биопленки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 4-15.
4. Лямин А.В. Проблемы в медицине, связанные с бактериальными биопленками / А.В. Лямин, Е.А. Боткин, А.В. Жестков // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2012. – Т. 14, № 4. – С. 268-275.
5. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ № 535. – [чинний від 22.04.1985 р.]. – М.: МОЗ СССР, 1985. – 65 с.
6. Справочник по применению бактериальных и вирусных препаратов / под ред. С.Г. Дзагурова, Ф.Ф. Резепова. – М: Медицина, 1995. – 116 с.
7. Chan V.K. Phage cocktails and the future of phage therapy / V.K. Chan, S.T. Abedon, C. Loc-Carrillo // Future Microbiol. – 2013. – Vol. 8 (6). – P. 769-783.
8. Hosseiniidoust Z. Formation of biofilms under phage predation: consid erations concerning a biofilm increase / Z. Hosseiniidoust, N. Tufenkji, T.G.M. van de Ven // Biofouling. – 2013. – Vol. 29 (4). – P. 457-468.

9. Lloyd D.H. Alternatives to conventional antimicrobial drugs: a review of future prospects / D.H. Lloyd // *Veterinary Dermatology*. – 2012. – Vol. 23 (4). – P. 299-304.
10. Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy / A. Sulakvelidze, Z. Alavidze, G. Morris jr. // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2001. – Vol. 45 (3). – P. 649-659.
11. Ziemska J. New perspectives on antibacterial drug research / J. Ziemska, A. Rajnisz, J. Solecka // *Cent. Eur. J. Biol.* – 2013. – Vol. 8 (10). – P. 943-957.

УДК 579.61: 616-078

ВИЗНАЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ БІОПЛІВКОУТВОРЮЮЧИХ ТА НЕУТВОРЮЮЧИХ ПЛІВКУ ШТАМІВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФІЛОКОКУ ДО БАКТЕРІОФАГІВ

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

Резюме. Проблема стафілококового носійства є однією з найбільш відомих та актуальних у медичній практиці. Носійство стафілококів може обумовлювати велику кількість ускладнень, зокрема, виникнення хронічних уражень дихальних шляхів. При дослідженні 54 зразків біологічного матеріалу з верхніх дихальних шляхів у 26 (48%) виявлено *S. aureus*. З них 16 (61,5%) штамів утворювали біоплівку. Понад 80% виділених штамів були чутливими до «Піобактеріофагу» та «Бактеріофагу стафілококового», до «Інтестібактеріофагу» серед плівкоутворюючих ізолятів чутливими було 56,3%, в той час як показник для неплівкоутворюючих штамів становив 70%.

Ключові слова: золотистий стафілокок, носійство, біоплівкоутворення, чутливість до фагів.

УДК 579.61: 616-078

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩИХ И НЕ ОБРАЗУЮЩИХ ПЛЕНКУ ШТАММОВ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА К БАКТЕРИОФАГАМ

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

Резюме. Проблема стафилококкового носительства является одной из самых известных и актуальных в медицинской практике. Носительство стафилококков может обуславливать большое количество осложнений, в частности возникновение хронических поражений дыхательных путей. При исследовании 54 образцов биологического материала из верхних дыхательных путей в 26 (48%) из них выявлен *S. aureus*. 16 (61,5%) выделенных штаммов *S. aureus* образовывали биопленку. Более 80% выделенных штаммов были чувствительны к «Пиобактериофагу» и «бактериофагу стафилококковому», к «интестибактериофагу» среди пленкообразующих штаммов чувствительными были 56,3%, в то время как показатель для не образующих пленку штаммов составил 70%.

Ключевые слова: золотистый стафилококк, носительство, биопленкообразование, чувствительность к фагам.

UDC 579.61: 616-078

DETERMINATION OF SENSITIVITY OF FILM-FORMING AND NON-FILM-FORMING STRAINS OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS TO BACTERIOPHAGE

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

Abstract. The existence of bacteria in the environment and the human body is composed of structured conglomerates surrounded by a protective polysaccharide matrix, known as biofilms. This status is fundamental and provides certain advantages over the existence of planktonic form. The most famous film-forming microorganisms that causes damage to the human, are staphylococci. In biofilm observed increased resistance of bacteria to adverse environmental factors, including the impact of various antimicrobial agents, and to the action of the immune system of the host, hence the need to search for more effective means against staphylococci, among them the bacteriophages have wide prospects.

The aim of research was to investigate the sensitivity to phages drugs of film-forming and non-film-forming strains of *Staphylococcus aureus*.

Experiments were made at the Laboratory of microbiology and immunology of SI «Research Institute of Gastroenterology NAMS Ukraine» (Dnipro city).

The object of the study was sensitivity of film-forming and non-film-forming strains of *S. aureus* to phages drugs. 54 samples of biological material from the nose and throat were studied. Isolation, identification, determination of the ability to form biofilms and sensitivity to phage of studied *S. aureus* strains were made by standard methods.

From studied biological material 26 strains identified as belonging to the species *S. aureus* were isolated. It was found that 16 (61.5%) of them had an ability to form biofilm, the remaining 10 (38.5%) – did not show the ability to form film. The study of sensitivity to bacteriophages revealed that they all were susceptible to phage with any of the applicable drugs (Piobacteriophage, Intestiphage and Bacteriophage staphylococcal liquid). Some strains show sensitivity to all drugs, others – to certain of it. A significant difference between the sensitivity to phages of medicinal products «Piobacteriophage» and «Bacteriophages staphylococcal» among film-forming and non-film-forming strains was not found. Approximately 80-90% of strains were susceptible to them. Exception amounted use of the drug «Intestiphage»: among film-forming strains part of susceptible isolates was 56.3%, while among non-film-forming strains – 70%. The lytical spots were complete or have bacterial growth, indicating a more or less pronounced sensitivity to phages from certain drugs. Drain lysis noted only for 61.5% of strains of *S. aureus*.

Other strains showed growth of bacterial colonies in place of phage preparation application. Drain lysis was mostly typical for a film forming strains (80%). The lack of 100% sensitivity effect is typical in the phage therapy because receptors on the bacterial cell surface and phage's receptors are variable structures. When using monovalent phage effect usually does not reach 15% of bacterial strains obtained from various sources. It is at this stage of the study recommended to use «phage cocktails» comprising different bacteriophages. This mixed system allow the use of phages achieve more effective action, including against antibiotic-resistant strains.

The problem of staphylococcal carriage is one of the most popular and relevant in medical practice. The carrier of staphylococci can cause a large number of complications, including lesions of chronic airways. Therefore, there is a continuing need in the application of remedies to address the problem. Sometimes use of antibiotics is limited due to the high level of resistance of staphylococci strains to them, so the use of bacteriophages, which exhibit high sensitivity among film-forming and non-film-forming strains of *S. aureus* may be an effective therapy area.

Keywords: staphylococcus aureus, carrier, biofilmformation, sensitivity to phages.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.
Стаття надійшла 01.10.2016 року