

D. H. Zhyvytsia, O. V. Samoilenko, V. H. Kazeka

Hormonal disorders in patients with HIV infection

SI "Zaporizhzhia Medical Academy of Postgraduate Education
of the Ministry of Health"

Introduction. HIV infection is a prolonged infectious disease that develops as a result of infection with human immunodeficiency virus (HIV) and is characterized by progressive damage the immune system. The disturbance in the functioning of the immune system that occurs during HIV infection can cause the disturbances in the secretion of hormones and thus to dysregulation of many organs and systems.

Aim. To investigate endocrine status in patients with HIV infection by serum hormone parameters depending on the stage of the disease.

Methods. There were examined 25 patients with HIV infection. The control group consisted of 15 HIV-negative healthy individuals. Immunological examination included the determination of the absolute and relative levels of T lymphocytes (CD3 +), T helper (CD4 +), T-killer cells (CD8 +), immunoreactivity index (CD4 + / CD8 +) using monoclonal antibodies by flow cytometry COULTER * EPISS * XL (Beckman Coulter, France). The determination of adrenal hormones (cortisol, sulfate dehydroepiandrosteron - DHEA), thyroid stimulating hormone (TSH), thyroid hormones (free thyroxine - T4, free triiodothyronine - T3) in serum was carried out by ELISA using Vector-Best (Russia).

Results. There were analysed the changes in the levels of adrenal hormones and thyroid hormones and the immune status in 25 patients with HIV-infection. The decrease in serum dehydroepiandrosterona, free thyroxine and free triiodothyronine, with a compensatory increase in TSH was observed in the patients with HIV infection. There was a significant increase in serum cortisol (30 times), which is a sign of the stress situations against the background of the concomitant opportunistic infections. The immunological study showed a significant reduction in the absolute number of CD4-lymphocytes (8 times) and in the relative number (3.6 times).

Conclusion. There was observed a decrease in serum dehydroepiandrosterona and thyroid hormones, with a compensatory increase in TSH in the patients with HIV infection. The patients with HIV infection had a significant increase in serum cortisol, which is a sign of the stressful situation against the background of the concomitant opportunistic infections.

Key words: HIV-infection, dehydroepiandrosteron, thyroxin, triiodothyronin, TSH, cortisol, CD4-lymphocyt.

© О.В. ПОКАС, 2013

О.В. Покас

ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК КЛІНІЧНИМИ ШТАМАМИ УМОВНО-ПАТОГЕННИХ МІКРООРГАНІЗМІВ, ВИДІЛЕНИХ З РІЗНОГО БІОЛОГІЧНОГО МАТЕРІАЛУ

ДУ „Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського
НАМН України”, м. Київ

Вступ. На сучасному етапі встановлено, що розвиток ряду інфекційних захворювань пов'язаний із мікроорганізмами певного виду або асоціацією різних видів, здатних до утворення біоплівки.

Мета. Визначити здатність до формування біоплівок штамами стафілококів, ентерококів, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, виділених з різного біологічного матеріалу. Матеріали. 47 штамів ентерококів, 37 стафілококів, 36 *Pseudomonas aeruginosa*, 10 *Klebsiella pneumoniae*, виділених з різного біологічного матеріалу від хворих із гнійно-запальними процесами.

Результати. Здатність до формування біоплівок визначали на плоскодонних планшетах для імуноферментного аналізу, кількість сформованої біоплівки оцінювали по інтенсивності забарвлення спиртового розчину на фотометрі за довжини хвилі 630 нм. Показано, що штами *Enterococcus faecalis*, виділені з крові, характери-зувались найменшою здатністю утворювати біоплівку, найбільшою – штами, виділені з харкотиння. Штами *Staphylococcus haemolyticus*, виділені з крові, утворювали більш кількісну біоплівку, ніж *Staphylococcus epidermidis*. Найбільш кількісну біоплівку утворювали штами *P.aeruginosa*, особливо ізоляти з ран. Встановлено, що мікроорганізми різних видів, виділені з різного біологічного матеріалу, відрізняються за здатністю утворювати біоплівку, цей показник є штамспецифічним.

Ключові слова: біоплівки, умовно-патогенні мікроорганізми.

ВСТУП

Відкриття та вивчення біоплівок є одним із важливих досягнень медичної та клінічної мікробіології за останні роки. На сьогодні відомо, що непатогенні бактерії, коменсали людини, існують у вигляді мультивидових популяцій, із складними системами саморегуляції, утворюючи нормальні мікроценози шкіри, кишківника, слизових оболонок, що мають надзвичайно високе фізіологічне значення для макроорганізму [8].

Також інтенсивно досліджується роль бактеріальних біоплівок в патології людини, оскільки встановлено, що більш ніж 65% всіх інфекційних захворювань, таких як пневмонія, інфекції верхніх дихальних шляхів, інфекції сечовивідних шляхів, простатити, вагінальна інфекція, остеомиєліти, ендокардити, інфекція хірургічних імплантатів, тощо, обумовлені мікроорганізмами, що існують у вигляді біоплівок [1,9]. Особливо важливим є те, що мікроорганізми у біоплівках більш життєздатні у присутності агресивних речовин, факторів імунного захисту, а їх резистентність до антибіотиків зростає у 1000 разів у порівнянні з вільними, планктонними клітинами. Тому формування біоплівок у вогнищі запалення призводить до хронізації інфекційного процесу і супроводжується незадовільними результатами антибіотикотерапії [3,4].

Найбільш актуальними видами мікроорганізмів, здатними до утворення біоплівки при інфекціях є стафілококи, ентерококи, представники родини *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, дріжджоподібні гриби роду *Candida*, які можуть знаходитись у біоплівках в якості поодинокого виду або в асоціаціях та приймати участь в етіопатогенезі запальних процесів різної локалізації [5,7].

Мета - визначити здатність до формування біоплівок штамами стафілококів, ентерококів, *Pseudomonas aeruginosa*, виділених з різного біологічного матеріалу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У досліджах використали 47 штамів *Enterococcus faecalis*, виділених з ліквору (3), крові (4), з трахеостоми (6), кишківника (6), урогенітальних виділень (6), рани (11), харкотиння (3), клапану серця (4), з об'єктів зовнішнього середовища стаціонарів (4); 37 штамів стафілококів: 32 – з ран, 1 – з клапану серця, 4 – з крові та 36 штамів *Pseudomonas aeruginosa*: 28 – з ран, 4 – з сечі, 3 – з харкотиння, 1 – з калу.

ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

Здатність до формування біоплівки мікроорганізмами проводили згідно з методикою Романової Ю.М. із співавт. [2]. Бактеріальні культури вирощували в трипказо-соєвому бульоні (TSB), виробництва bioMerieux (Франція) при температурі 37° С. Визначення проводили в плоскодонних планшетах для імуноферментного аналізу. Нічні культури штамів розводили TSB до 10⁷ КУО/мл, отримані суспензії вносили по 150 мкл у 96-лункову планшету (по 4 лунки для кожного штаму). Для контролю у 4 лунки вносили поживний бульон, в якому вирощували культури. Планшети інкубували при 37°С 24 год. Кількість сформованої біоплівки оцінювали на мікро-спектрофотометрі (Rayto RT-2100C Microplate Reader) за довжини хвилі 630 нм по інтенсивності забарвлення спирту. Кількісним визначенням ступеня утворення біоплівок слугували значення оптичної густини (ОД ОГ). Всі дослідження проведені чотириразово.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При аналізі середнього значення кількості утвореної біоплівки штамми *E. faecalis*, виділених з різних біоматеріалів та зовнішнього середовища (рис. 1.), можна сказати, що найбільшою здатністю до утворення біоплівок володіли штами, виділені з харкотиння (0,28±0,08 ОД ОГ), а найменшою штами, виділені з крові – 0,07±0,015 ОД ОГ та з зовнішнього середовища – 0,06±0,005 ОД ОГ ($p < 0,05$). Майже однакову біоплівку утворювали штами, виділені з ліквору (0,09±0,025 ОД ОГ), рани (0,11±0,036 ОД ОГ), трахеостоми (0,099±0,02 ОД ОГ) та клапанів (0,1±0,005 ОД ОГ). За даною характеристикою групи штамів між собою не відрізнялись ($p > 0,05$). Штами, виділені з урогенітального тракту та кишківника мали середні значення (0,12±0,016 та 0,16±0,03 ОД ОГ відповідно).

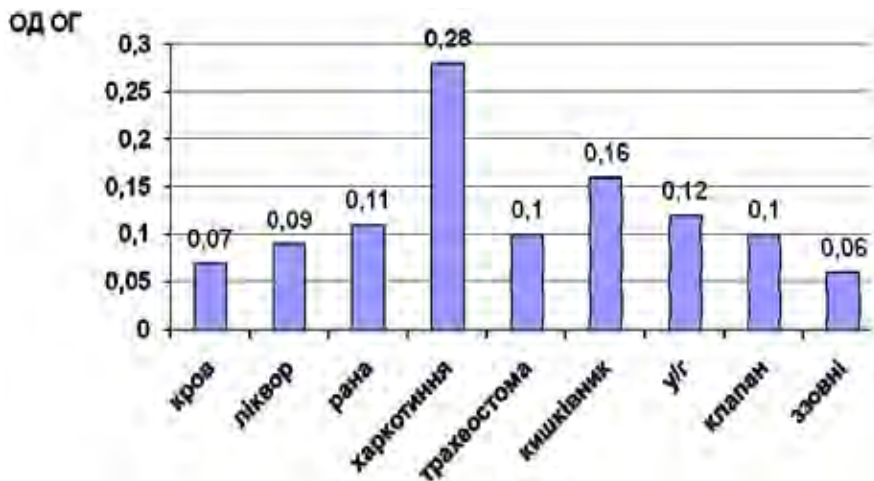


Рис. 1. Кількісна оцінка біоплівок штамів ентерококів, виділених з різних біотопів та зовнішнього середовища

Вивчення здатності до утворення біоплівок клінічними штамми *E. faecalis* показало, що штами, виділені з однакових біотопів відрізнялись за здатністю до утворення біоплівок. Так, штами, виділені з ліквору, утворювали біоплівку в межах від $0,058 \pm 0,008$ до $0,14 \pm$

0,038 ОД ОГ ($p > 0,05$), з штамів, виділених з крові №703 ($0,11 \pm 0,01$ ОД ОГ) утворював більшу кількість біоплівки ($p < 0,05$), ніж інші штами. Найбільшу здатність до утворення біоплівки серед мікроорганізмів, виділених з трахеостоми, мав штам № 64 - $0,19 \pm 0,09$ ОД ОГ, найменшу - №25 та № 1103 - $0,06 \pm 0,01$ ОД ОГ ($p > 0,05$). Штам №93, виділений з кишківник, утворював біоплівку більшу ($0,34 \pm 0,065$ ОД ОГ), ніж штами №89, 119, виділені з того ж виду біоматеріалу ($0,08 \pm 0,005$ ОД ОГ) ($p < 0,05$). *A. E. faecalis* №843, виділений з уrogenітального матеріалу, мав більшу здатність до утворення біоплівки ($0,19 \pm 0,03$ ОД ОГ), ніж штами № 481 та 503 ($0,076 \pm 0,009$ та $0,096 \pm 0,012$ ОД ОГ) ($p < 0,05$). Виділені з ран штами також мали різну здатність щодо утворення біоплівки, кількість її була в межах $0,45 \pm 0,165 - 0,023 \pm 0,003$ ОД ОГ, штам №55 утворював більшу кількість біоплівку, ніж штами №1483, 1480, 1481, 1482, 1490 та 936 ($p < 0,05$). Штами виділені з харкотиння не відрізнялись між собою за здатністю формувати біоплівку. Майже на одному рівні утворювали біоплівку і штами виділені з клапанів серця. Штами виділені з зовнішнього середовища утворювали майже однакову біоплівку в межах від $0,045 \pm 0,008$ до $0,067 \pm 0,004$ ОД ОГ ($p > 0,05$).

Досліджена здатність до утворення біоплівок штамми стафілококів, виділених з різного біологічного матеріалу, найбільша кількість була виділена з ран, а саме 32 штами. Більша частина штамів стафілококів, виділених з ран належала до виду *S.aureus* – 62%, 25% представлені *S.epidermidis* та 13% - *S.haemolyticus*. Штами, виділені з ран утворювали біоплівку в межах $0,04 \pm 0,0015 - 0,25 \pm 0,01$ ОД ОГ. При аналізі середнього значення кількості утвореної біоплівки штамми, виділеними з ран ($0,1 \pm 0,01$ ОД ОГ) можна сказати, що штами *S.haemolyticus* утворювали більшу кількість біоплівку ($0,14 \pm 0,07$ ОД ОГ), ніж *S.epidermidis* ($0,08 \pm 0,01$ ОД ОГ), але достовірно не відрізнялись між собою (рис.2). Згідно даних літератури [6] штами стафілококів, що утворюють кількісну біоплівку $< 0,12$ ОД ОГ відносять до штамів слабопродукуючих або не продукуючих біоплівку, в межах $0,12 - 0,24$ – до середньопродукуючих, $a > 0,24$ ОД – до сильнопродукуючих штамів. Враховуючи цю класифікацію тільки 3 штами, виділені з ран можна віднести до середньопродукуючих та 1 штам до сильнопродукуючих, решта виявилися слабопродукуючими, або навіть непродукуючими.

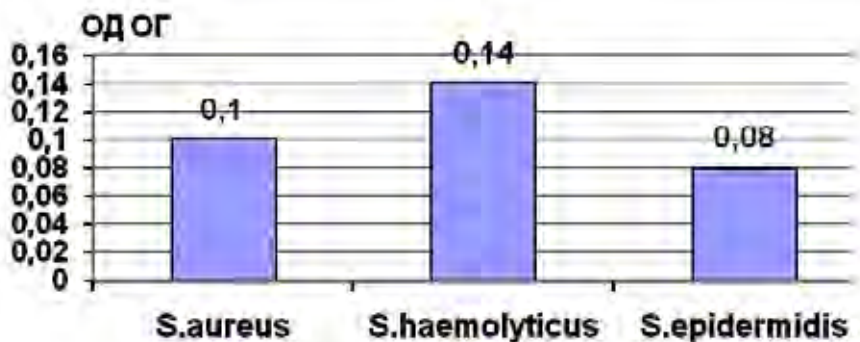


Рис. 2. Кількісна оцінка біоплівок утворених штамми стафілококів, виділених з ран

ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

З клапану був виділений штам *S.epidermidis*, який утворював біоплівку $0,096 \pm 0,01$ ОД ОГ, з крові 3 штами *S.haemolyticus* та *S.epidermidis*, середнє кількісне значення утвореної біоплівки $0,167 \pm 0,065$ ОД ОГ. З крові тільки 1 штам, а саме *S.epidermidis* виявився середньопродукующим біоплівку.

Також визначена здатність утворювати біоплівку штамами *P.aeruginosa*, виділених з різного біологічного матеріалу, переважно з ран. Так, штами виділені з ран утворювали біоплівку в межах від $1,68 \pm 0,08$ до $0,12 \pm 0,03$ ОД ОГ. Найбільш кількісну біоплівку утворювали штами №1492, 1053, 1217, 1435 та 1278 ($1,68 \pm 0,08$ – $1,24 \pm 0,01$ ОД ОГ), за цією здатністю між собою дані штами не відрізнялись. Слабку біоплівку утворювали 13 штамів ($0,12 \pm 0,03$ – $0,37 \pm 0,05$ ОД ОГ), які теж за цією ознакою не відрізнялись. З штами виділені з харкотиння утворювали слабку біоплівку в межах $0,41 \pm 0,025$ – $0,09 \pm 0,015$ ОД ОГ, а штами виділені з сечі в межах $1,3 \pm 0,1$ – $0,29 \pm 0,02$ ОД ОГ. При аналізі середнього значення кількості утвореної біоплівки штамами, виділених з різних біоматеріалів (рис. 3.), можна сказати, що більшою здатністю до утворення біоплівок володіли штами, виділені з ран ($0,58 \pm 0,07$ ОД ОГ) та з сечі ($0,65 \pm 0,23$ ОД ОГ), ніж штами, виділені з харкотиння ($0,21 \pm 0,1$ ОД ОГ) та з калу ($0,32 \pm 0,05$ ОД ОГ) ($p > 0,05$).

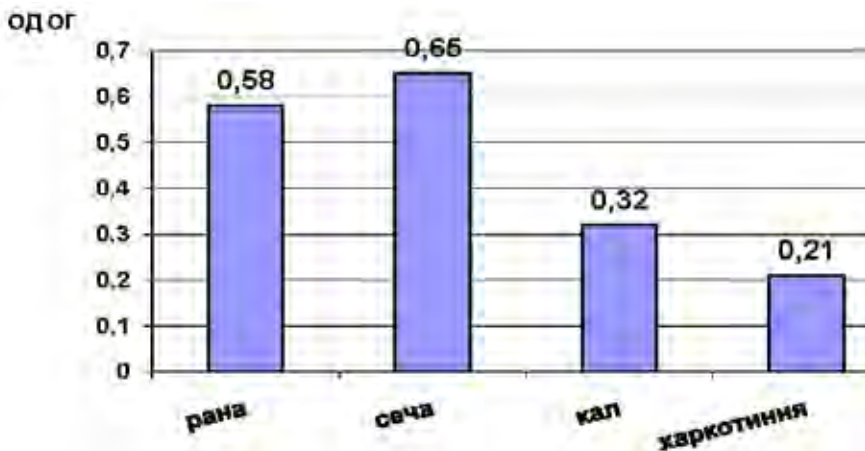


Рис. 3. Кількісна оцінка біоплівок штамів *P. aeruginosa*, виділених з різних біотопів

При дослідженні 10 штамів *K.pneumoniae*, виділених з ран, встановлено, що вони володіли слабкою здатністю до утворення біоплівки. Кількість біоплівки була в межах $0,02 \pm 0,01$ – $0,2 \pm 0,02$ ОД ОГ. Середнє значення становило $0,067 \pm 0,022$ ОД ОГ.

ВИСНОВКИ

- Досліджені нами штами різних видів, виділені з однотипного матеріалу, відрізняються за здатністю утворювати біоплівку.
- Штами *E. faecalis*, виділені з крові, характеризувались найменшою здатністю утворювати біоплівку, найбільшою – штами, виділені з харкотиння.
- Серед штамів стафілококів, виділених з ран, штами *S.haemolyticus* утворювали більш кількісну біоплівку, ніж *S.epidermidis*, без достовірної різниці за цими показниками.

• Серед всіх досліджених мікроорганізмів найбільш кількісну біоплівку утворювали штами *P. aeruginosa*, особливо штами, виділені з ран.

• Отже, досліджені нами штами мікроорганізмів різних видів, виділені з різного біологічного матеріалу відрізняються за здатністю утворювати біоплівку, цей показник є шамоспецифічним.

Подальші дослідження мають бути спрямовані на визначення здатності до формування біоплівок різними видами умовно-патогенних мікроорганізмів, виділених при гострих та хронічних запальних процесах, як в складі одного виду, так і в асоціаціях.

Література

1. Романова Ю.Л., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и в организме хозяина. Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиологии. 2011, 3: 99-109.

2. Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Смирнова Т.А., Андреев А.Л., Диденко Л.В., Гинцбург А.Л. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium*. Журн. микробиол. 2006, 4: 38-42.

3. Сидоренко С.В., Гостев В.В. Бактериальные биопленки и инфекции. Журнал инфектологии. 2010, 2 (3): 4-15.

4. Blango M.G., Mulvey M.A. Persistence of uropathogenic *Escherichia coli* in the face of multiple antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010, 54 (5): 855-863.

5. Dubravka M., Lazic S., Branka V. Slime production and biofilm forming ability by *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates. *Acta Veterinaria.* 2010, 60 (2-3): 217-226.

6. El-Din S.S., El-Rehewy M.S., Ghazaly M.M. Biofilm formation by blood stream staphylococcal isolates from febrile pediatric cancer patients at south Egypt cancer institute. *Journal of American Science.* 2011, 7: 674-686.

7. El-Shekn N.A., Ayoub A.M., El-Hendawy H.H. In vitro activity of some antimicrobial agents against intact and disrupted biofilm of *Staphylococci* in the indwelling vascular catheter patients. *World Applied Science Journal.* 2010, 10: 108-120.

8. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.* 2009, 11 (7): 1034-1043.

9. Wolcott R.D., Kennrdy J.P., Dowd S.E. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *J. Wound Care.* 2010, 19 (2): 45-53.

Е.В. Покас

Формирование биопленок клиническими штаммами условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из разного биологического материала

ГУ „Институт эпидемиологии и инфекционных болезней имени Л.В.

Громашевского НАМН Украины”, г. Киев

Введение. На современном этапе установлено, что развитие ряда инфекционных болезней связано с микроорганизмами определенного вида или ассоциацией разных видов, способных к образованию биопленки.

Цель. Определить способность к формированию биопленки штаммами стафилококков, энтерококков, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из разного биологического материала.

Материалом. 47 штаммов энтерококков, 37 стафилококков, 36 *Pseudomonas aeruginosa*, 10 *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из разного биологического материала у больных с гнойно-воспалительными процессами.

Результаты. Способность формировать биопленки определяли на плоскостных планшетах для иммуноферментного анализа, количество сформированной биопленки оценивали по интенсивности окрашивания спиртового раствора на фотометре при длине волны 630 нм. Показано, что штаммы *Enterococcus faecalis*, выделенные из крови, характеризовались наименьшей способностью образовывать биопленку, наибольшей – штаммы, выделенные из мокроты. Штаммы *Staphylococcus haemolyticus*, выделенные из крови, образовывали более количественную биопленку, чем *Staphylococcus epidermidis*. Наиболее количественную биопленку образовывали штаммы *P. aeruginosa*, особенно изоляты из ран. Установлено, что микроорганизмы разных видов, выделенные из разного биологического материала, отличаются по способности образовывать биопленку, этот показатель есть штаммоспецифическим.

Ключевые слова: биопленки, условно-патогенные микроорганизмы.

O.V. Pokas

Forming biofilms by clinical strains of conditionally pathogenic microorganisms which are isolated from different biological materials

SI "Institute of Epidemiology and Infectious Diseases named after L. V. Gromashevskiy of the of the National Academy of Medical Sciences",
Kyiv

Introduction. At present, it is established that the development of a number of infectious diseases is connected with the microorganisms of certain kinds or with association of different kinds, which can form biofilms.

Aim. To determine the ability to form biofilms by the staphylococcus, enterococcus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different biological materials. Materials. 47 enterococcus, 37 staphylococcus, 36 *Pseudomonas aeruginosa*, 10 *Klebsiella pneumoniae* strains, isolated from different biological materials of the patients with purulent inflammation. The ability to form biofilms was fixed by flat-bottomed boards for immunofluorescence analysis; the amount of the formed biofilms was determined by intensive colouring of spirit solution at the photometer with the length of the wave 630 nm.

Results. It is shown that the *Enterococcus faecalis* strains isolated from the blood are characterized by the least ability to form biofilms, and the greatest ability had the strains isolated from sputum. The *Staphylococcus haemolyticus* strains isolated from the blood, formed more quantitative biofilms than *Staphylococcus epidermidis* strains. The most quantitative biofilms were formed by *P. aeruginosa* strains, especially those isolated from wounds. It is determined that the microorganisms of different kinds, isolated from different biological materials, differ in their ability to form biofilms, this index is strains specific.

Key words: biofilms, conditionally pathogenic microorganisms.