

УДК 579.861.2:616-092.4-085.281

А.Я. Циганенко, О.В. Лупай, М.М. Мішина, С.М. Граматюк
Харківський національний медичний університет

ВИЗНАЧЕННЯ ПРОТИМІКРОБНОЇ ДІЇ ПРЕПАРАТУ ГАТИМАК НА ПЛАНКТОННІ КЛІТИНИ ТА БІОПЛІВКИ ШТАМІВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN VITRO

Встановлено, що здатність до утворення біоплівок у виділених штамів *S. aureus* є різною. Чутливість до антибіотика Гатимак планктонних клітин майже в 6 разів більша, ніж біоплівок. Мікроорганізми у формі біоплівки набагато стійкіші до дії Гатимаку, ніж планктонні клітини.

Ключові слова: біоплівки, *S. aureus*, антибіотикорезистентність, катетер-асоційовані інфекції.

Останнім часом однією з найпоширеніших причин гнійно-запальних інфекцій, таких як пневмонії, ендокардити, ранові інфекції, остеомієліти, інфекції урогенітального тракту, є золотистий стафілокок. Цей збудник також здатен викликати госпітальні й так звані катетер-асоційовані інфекції [1].

Тяжкість перебігу стафілококових інфекцій пов'язана з наявністю факторів патогенності і вірулентості збудника та розладами імунної системи організму. До факторів патогенності золотистого стафілокока відносяться компоненти клітинної стінки (пептидоглікани, тейхоєві кислоти, білок А), ферменти агресії, можливість утворення токсинів і формування біоплівок [1].

Біоплівки утворюються на будь-якому матеріалі як біогенного, так і абіогенного походження, який контактує з будь-якою рідиною, де можуть існувати мікроорганізми [2, 3].

Вісімдесят п'ять відсотків маси біоплівки займає екстрацелюлярний матрикс, який складається з екзополісахаридів і виділяється мікробами. Він здійснює важливі функції в життєдіяльності біоплівки, є потужним біологічним клеєм, за допомогою якого біоплівка міцно прикріплюється до поверхні матеріалу [4].

Понад 60 % усіх внутрішньолікарняних інфекцій є результатом діяльності мікроорганізмів, що знаходяться у біоплівках [3]. Формування мікробних біоплівок на синтетичних імплантатах, особливо у осіб з ослабленим імунітетом, може приводити до роз-

витку сепсису і смерті пацієнтів [3, 5]. Вважається, що бактерії в біоплівках можуть обмінюватися плазмідами, які містять гени, відповідальні за резистентність до антибіотиків [4].

Поява резистентних мікроорганізмів особливо небезпечна у випадку їхнього росту і розмноження в умовах стаціонара, оскільки вони здатні поширюватися від пацієнта до пацієнта через руки медичного персоналу [6].

Антибіотики й фактори імунітету більш ефективно діють на планктонні форми мікроорганізмів, ніж на біоплівки. Частина мікробних клітин, які утворюють матрикс, залишаються недоступними для фагоцитів, ці мікроби виживають і після скасування антибактеріальної терапії. Вони можуть знову розмножуватися і викликати рецидив захворювання.

Можна припустити, що застосування антибіотика знищує велику частину популяції, залишаючи невелику кількість персистентів. Якщо концентрація антибіотика тимчасово знижується чи терапія припиняється, зникають симптоми захворювання, персистенти знову починають зростати, утворюють біоплівки, від яких згодом знову почнуть відділятися планктонні клітини. Цей динамічний механізм пояснює і рецидиви інфекцій, які пов'язані з біоплівками, і потребу в тривалому лікуванні антибіотиками ряду інфекцій [2, 6].

Отже, стійкість біоплівки до антибактеріальної терапії, на відміну від планктон-

© А.Я. Циганенко, О.В. Лупай, М.М. Мішина, С.М. Граматюк, 2012

них клітин, не обов'язково пов'язана з високим рівнем генетично опосередкованої резистентності до антибіотиків у бактерій. Після терапії залишається деяка кількість персистентів, які будуть виживати значно краще за своїх планктонних клонів, бо вони не руйнуються імунною системою макроорганізму [6].

Метою даної роботи було вивчення здатності до формування біоплівки ізолятів і референтних штамів *S. aureus* ATCC 25923 та визначення дії протимікробного препарату Гатимакс на планктонні клітини та біоплівки *in vitro*.

Матеріал і методи. Ізоляти *S. aureus* у кількості 24, з них 11 із зіву і 13 із носа, були виділені від пацієнтів, які проходили профілактичне обстеження на базі обласної студентської поліклініки м. Харкова. Для вивчення чутливості планктонних клітин і біоплівок був використаний фторхінолон третього покоління Гатимакс (гatifлоксацин).

Для вивчення здатності штамів до утворення біоплівок чисту культуру золотистого стафілокока засівали на поживний агар і інкубували в термостаті 24 год при 37 °С [7]. Змив з агарової культури проводили додаванням 1 мл ізотонічного розчину та доводили до стандарту мутності з урахуванням кількості 10⁹ кл/мл. Біоплівки на дні пластикових планшет, які мають 96 лунок, формували наступним чином: в кожен лунку вносили по 150 мкл поживного бульйону та по 10 мкл культури, окрім останньої лунки, яка була контрольною. Планшети інкубували в термостаті 24 год при 37 °С. Наступного дня вміст лунок відбирали та відмивали тричі ізотонічним розчином. У лунки вносили 150 мкл дистильованої води й 15 мкл 1% -вого спиртового розчину генціанвіолету та інкубували при кімнатній температурі 45 хв. Барвник відбирали та промивали лунку тричі дистильованою водою. Далі в лунку вносили по 250 мкл етилового спирту та інкубували при кімнатній температурі протягом 45 хв. Після цього оптичну щільність біоплівок вимірювали при довжині хвилі 545 нм на світлофотометрі СФ-46.

Також біоплівки формували в пластикових чашках діам. 40 мм, на дні яких поміщали стерильне покривне скло. Вісімнадцятигодинну культуру штамів, розведену 1 : 100, вносили по 4 мл таким чином, щоб суспензія рівномірно розподілялася на дні чашки. Для визначення контрольних показників у декілька чашок вносили стерильне поживне середовище. Чашки розміща-

ли в термостаті при 37 °С на 24 год. Наступного дня вміст чашок обережно відбирали, щоб не зруйнувати сформовану біоплівку, вносили по 4 мл дистильованої води та по 400 мкл 1% -вого спиртового розчину генціанвіолету, залишали при кімнатній температурі на 45 хв. Після цього розчин обережно відбирали та тричі промивали чашки дистильованою водою і підсушували.

Протимікробну дію антибіотика Гатимакс вивчали у полістиролових планшетах. У лунку вносили по 100 мкл поживного середовища й по 10 мкл розведеної за стандартом мутності агарової добової культури золотистого стафілокока. Мінімальну переважну концентрацію (МПК) Гатимаку визначали шляхом двократних розведень. Для визначення дії Гатимаку на планктонні клітини антибіотик вносили в першу лунку в концентрації 16 мг/л і титрували. Інкубацію планшетів проводили при 37 °С на 24 год. Наступного дня вимірювали оптичну щільність на світлофотометрі при довжині хвилі 545 нм.

Для визначення дії МПК Гатимаку на біоплівку препарат вносили в лунку на 2-гу добу в концентрації 16 мг/л і титрували. Інкубацію планшетів проводили при 37 °С на 24 год. Наступного дня оцінювали оптичну щільність на фотометрі при довжині хвилі 545 нм.

Цифрові дані обробляли за допомогою коефіцієнта Стьюдента-Фішера.

Результати. Отримані дані показали, що середня оптична щільність планктонних клітин і біоплівок у штамів, виділених із зіву (S1-S11), склала (1,86±0,32) ОД, виділених із носа (S12-S24) – (1,41±0,22) ОД, контрольні значення референтних штамів – (1,28±0,15) ОД, що мало статистичну різницю між групами $p < 0,05$.

Середня оптична щільність біоплівок у штамів, виділених із зіву (S1-S11), склала (0,49±0,164) ОД, у штамів, які були виділені із носа (S12-S24), – (0,53±0,18) ОД, в контрольній групі ATCC 25923 оптична щільність складала (0,38±0,13) ОД, що мало достовірну статистичну різницю між групами ($p < 0,05$).

За даними експерименту можна зробити припущення, що здатність до формування біоплівок у всіх штамів є різною. Так, штам S12 – S24, які були виділені з носа, найбільш активно формували біоплівки, тоді як штами S1-S11 – менш активно. Найменшою була здатність до формування біоплівок у референтних штамів.

При визначенні дії Гатимаку на загальну біомасу планктонних клітин і біоплівок отримано наступні дані. Середні значення МПК для штамів S1–S11 склали $(0,44 \pm 0,25)$ мкг/л, для штамів S12–S24 – $(0,76 \pm 0,32)$ мкг/л, для штамів ATCC 25923 – $(0,125 \pm 0,06)$ мкг/л.

При визначенні дії Гатимаку на біоплівки спостерігався прямий кореляційний зв'язок між здатністю формувати стійку біоплівку та МПК препарату. Середні значення МПК для штамів S1–S11 склали $(7,64 \pm 0,32)$ мкг/л, для штамів S12–S24 –

$(8,2 \pm 0,25)$ мкг/л, для референтних штамів – $(6,42 \pm 0,21)$ мкг/л.

Таким чином, здатність до утворення біоплівок у виділених штамів є різною. Найбільшою вона була у штамів, виділених із носа (S12–S24), декілька меншою – у виділених із зіву (S1–S11), найменшою – у референтних штамів. Чутливість до антибіотика Гатимак планктонних клітин майже в 6 разів більша, ніж біоплівок.

Доведено, що мікроорганізми у формі біоплівки набагато стійкіші до дії антибіотика Гатимак, ніж планктонні клітини.

Список літератури

1. Лабинская А. С. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская, Л. П. Блинова, А. С. Ещина. – М. : Медицина, 2005. – 509 с.
2. Costerton J. W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J. W. Costerton, P. S. Stewart, E. P. Greenberg // Science. – 1999. – Vol. 284, № 1318. – P. 22.
3. Costerton J. W. Microbial biofilms / J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell // Ann. Rev. Microbiol. – 1995. – № 49. – P. 711–745.
4. Тец В. В. Бактериальные сообщества / В. В. Тец // Клеточные сообщества. – СПб. : ГМУ, 1998. – С. 15–73.
5. Гинцбург А. Л. «Quorum sensing» или социальное поведение бактерий / А. Л. Гинцбург, Т. С. Ильина, Ю. М. Романова // Микробиология. – 2003. – № 5. – С. 86–93.
6. Camilli A. Bacterial small molecule signaling pathways / A. Camilli, B. Bassler // Science. – 2006. – Vol. 311, № 5764. – P. 1113–1116.
7. Романова Ю. М. Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium* / Ю. М. Романова, Н. В. Алексеева, Т. А. Смирнова // Микробиология. – 2006. – № 4. – С. 38–42.

А.Я. Цыганенко, Е.В. Лупай, М.М. Мишина, С.М. Граматюк

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТА ГАТИМАК НА ПЛАНКТОННЫЕ КЛЕТКИ И БИОПЛЁНКУ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN VITRO

Установлено, что способность к образованию биоплёнок у выделенных штаммов *S. aureus* различна. Чувствительность к антибиотикам Гатимак планктонных клеток почти в 6 раз больше, чем биоплёнок. Микроорганизмы в форме биоплёнок гораздо более стойкие к действию Гатимака, чем планктонные биоклетки.

Ключевые слова: биопленки, *S. aureus*, антибиотикорезистентность, катетер-ассоциированные инфекции.

A.Ya. Tsyganenko, E.V. Lupai, M.M. Mishina, S.N. Gramatyuk

STUDY OF ANTIMICROBIAL ACTION OF GATIMAK ON PLANKTON CELLS AND BIOFILM OF STRAINS *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN VITRO

Found that the ability to form biofilms in selected strains of *S. aureus* is different. Sensitivity to the antibiotic Gatimak planktonic cells of almost 6 times more than the biofilm. The microorganisms in form biofilms is more persistent for action of Gatimak than planktonic cells.

Key words: biofilm, *S. aureus*, antibiotic resistance, catheter-associated infections.

Поступила 28.10.11