

© Колектив авторів, 2016
УДК 615.28-06:616.98:576.851.252
DOI 10.11603/1681-2727.2016.4.7212

С.А. Деркач, І.А. Воронкіна, Л.С. Габишева, І.А. Крилова, Н.М. Куцай

ВПЛИВ АНТИБІОТИКІВ НА БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ MSSA ТА MRSA ШТАМАМИ СТАФІЛОКОКА

Державна установа «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України»,
Харківський національний медичний університет

Проведено експериментальне вивчення впливу антибіотиків (амоксациліну/клавуланату, гентаміцину та ципрофлоксацину) на процес біоплівкоутворення метициліночутливими (MSSA) та метицилінорезистентними (MRSA) штамми стафілокока та їх дії на вже сформовані «зрілі» біоплівки.

Ключові слова: стафілококові біоплівки, метицилінорезистентні та метициліночутливі штами *S. aureus*, особливості впливу антибіотиків.

У науковій літературі активно вивчається такий важливий мікробіологічний і клінічний феномен, як біоплівкоутворення. Відомо, що біоплівки здатні утворювати більше 90 % вивчених видів бактерій, а їх формування було виявлено більш ніж при 80 % хронічних захворювань мікробної етіології [1, 2].

Близько 60 % усіх внутрішньолікарняних інфекцій зумовлені мікроорганізмами, які знаходяться в біоплівках. Концентрація антибіотиків для досягнення бактерицидного ефекту для мікроорганізмів, структурованих у біоплівку, може бути в 10-100 разів (залежно від природи антибіотика) вище, ніж для планктонних форм даної бактерії. Крім того, патогени в біоплівці взаємодіють з імунною системою хазяїна. Антигени бактерій біоплівки стимулюють синтез антитіл, але при цьому є стійкими до них та до інших механізмів захисту організму. У результаті така імунна відповідь може вражати тканини органів, замість створення стійкого імунітету [3, 4].

Стаціонарне лікування антибіотиками здатне знищити лише планктонні форми даної бактерії, в той час як іммобілізовані в біоплівку патогени здатні виживати і розмножуватись після припинення терапії.

В останній час активно вивчається такий важливий напрямок наукових досліджень, як пошук шляхів руйнування біоплівок або запобігання їх формуванню різними бактеріями та їх асоціаціями. Цілий ряд факторів, що відповідають за резистентність біоплівок до антибіотиків, уже визначено і описано в літературі, але більшість питань залишається нез'ясованими.

Наявність чітко сконструйованого консорціуму бактерій у матриці біоплівки забезпечує виживання з

метою збереження виду, чим можна пояснити той факт, що в природі не існує препаратів, у тому числі антибіотиків і антисептиків, застосування яких гарантувало б повне знищення мікроорганізмів у будь-якій екологічній ніші.

Отже, надійні засоби боротьби з біоплівками відсутні. Ця проблема потребує подальшого вивчення.

Антибіотики за дією на бактерійні біоплівки розділяють на два типи. До першого належать препарати, які проникають у біоплівку та пригнічують або знищують мікроорганізми, що їх утворюють. Другий тип – біоциди, які практично не проникають в біоплівки, але ефективно гальмують їх зростання та розповсюдження за рахунок мігруючих бактерій [5, 6].

Відомо, що відмінності в дії антибіотиків можуть проявлятися у віддалених результатах лікування. Використання антибіотиків, які не проникають у біоплівку, дуже швидко приводить до формування стійких штамів. При цьому частіше виникають рецидиви і формуються хронічні захворювання інфекційного ґенезу.

Особлива роль патогенних стафілококів у формуванні хронічних гнійно-запальних захворювань зумовлена здатністю до персистенції у структурованих біоплівках на абіотичних (суглобні протези, катетери, штучні клапани серця, судинні протези тощо) та біотичних поверхнях (слизові оболонки, ендотелій внутрішніх органів, кишечника, ранові поверхні тощо).

Таким чином, можна підсумувати, що наукові дослідження різних аспектів формування (або руйнування) бактерійних біоплівок є актуальним і перспективним напрямком, який дозволить змінити підходи до діагностики і лікування цілого ряду інфекцій, в тому числі і гнійно-запальних захворювань стафілококової етіології.

Метою дослідження була оцінка впливу антибіотиків на стафілококові біоплівки та визначення доцільності їх застосування для терапії стафілококової інфекції.

Матеріали і методи

Штами *S. aureus* ATCC № 25923, свіжевиучений метицилінорезистентний (MRSA) № 22, антибіотики: амоксацилін/клавуланат, гентаміцин, ципрофлоксацин.

Визначення біоплівкоутворювальних властивостей стафілококів проводили методом культуральних планшетів, запропонованим D. Christensen в модифікації Ю.М. Романової [7, 8].

Суть даного способу полягає в наступному: приготування бактерійного ізоляту, інкубація 18-24 год при температурі +35 °С у трипсин-соєвому бульйоні (ТСБ) з об'ємною часткою глюкози 1 %, доведення до концентрації суспензії 0,5 по Мак Фарланду з подальшим розведенням її ТСБ у відношенні 1:100 (3×10^6 КУО/мл). Розведену культуру вносять в полістиролові лунки панелі планшета по 200 мкл. Для негативного контролю використовують стерильний ТСБ. Планшет накривають кришкою й інкубують при температурі +35 °С протягом 24-48 год. Для видалення планктонних форм стафілокока лунки відмивають 3 рази 1 М розчином фосфатного буфера. Фарбування біоплівок здійснюють 1 % розчином кристалічного фіолетового, який вносять у лунки по 200 мкл, витримують 25 хв при кімнатній

температурі, видаляють і трикратно промивають 1 М фосфатним буфером. Для екстракції кристалічного фіолетового в кожну лунку додають по 200 мкл 96 % етанолу. Оптичну щільність спиртового розчину кристалічного фіолетового вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 578 нм, інтенсивність фарбування спирту відповідає ступеню утворення біоплівки.

Вплив антибіотиків вивчали таким чином: при одночасному внесенні їх у лунки з бульйонною культурою стафілокока, доведеною до концентрації 10^5 КУО/мл (дія на «молоді» біоплівки) та при додаванні на вже сформовані 24-годинні біоплівки («зрілі»).

Антибіотики використовували у порогових, надпорогових (у 10 разів більших) та підпорогових (у 2 та 10 разів менших) дозах. За порогову приймали дозу антибіотика, яка відповідає його МІК по відношенню до планктонної культури (табл. 1) [9].

Таблиця 1

Дози антибактерійних препаратів (мг/мл)

Антибіотик	Надпорогова	Порогова	Підпорогові	
Амоксицилін/клавуланат	5,0/2,5	0,5/0,25	0,25/0,12	0,1/0,05
Гентаміцин	10,0	4,0	1,0	0,5
Ципрофлоксацин	5,0	1,0	0,5	0,25

Оцінку ефекту дії біоцидів проводили за % інгібіції, який розраховували за формулою:

$$\% \text{ інгібіції} = \frac{(\text{контр ОЩ} - \text{тест ОЩ})}{\text{контр ОЩ}} \times 100 \quad (1)$$

де контр ОЩ – оптична щільність біоплівки культури;

тест ОЩ – оптична щільність біоплівки після дії на неї антибіотика [10].

Для оцінки дії біоцидів на біоплівкові культури стафілокока з кожної лунки проводили висів. Для цього біоплівки, що сформувались, руйнували механічним шляхом (мікробіологічною петлею), додавали 0,2 мл МПБ та переносили 0,1 мл отриманої суспензії в пробірку з 0,9 мл бульйону з 2 % глюкози, інкубували 2 год при 35 °С, потім по 0,1 мл висівали на м'ясо-пептонний (МПА) та жовтково-сольовий агар (ЖСА). Посіви інкубували при 35 °С протягом 18-20 год. Далі оцінювали наявність росту культури стафілокока та робили кількісну оцінку [11].

Отримані результати досліджень оброблено методом варіаційної статистики за допомогою програми MS Excel 2003 з використанням стандартного відхилення (σ) та критерію χ^2 [12, 13].

Результати досліджень та їх обговорення

В останні роки у літературі з'явилася значна кількість публікацій, присвячених вивченню різних аспектів вза-

ємодії антибіотиків і бактерійних біоплівок. Результати таких досліджень носять, в основному, фрагментарний характер. Різні штами, антибіотики, дози, різні експериментальні моделі не дозволяють на сьогодні дати чіткі відповіді на питання як саме оцінити взаємодію того чи іншого антибіотика з різними видами бактерій. На даному етапі важливе накопичення різнопланової інформації у даному аспекті.

Завданням наших досліджень було визначення впливу на процес біоплівкоутворення MRSA та MSSA штамми стафілокока різних доз антибіотиків, які широко застосовуються при лікуванні захворювань стафілокової етіології – амоксициліну/клавуланату, гентаміцину та ципрофлоксацину.

Результати вивчення впливу амоксициліну/клавуланату на процес утворення ATCC штамом «молодих» біоплівок показали наявність дозозалежного ефекту: при порогових і надпорогових концентраціях має місце зменшення показників ОЩ ($\chi^2 < 0,05$) (мал. 1). При зменшенні дози амоксициліну/клавуланату у 2 і 10 разів ОЩ біоплівки не відрізнялася від контрольних показників ($\chi^2 > 0,05$).

На «зрілі» біоплівки суттєвого впливу не виявлено як при порогових концентраціях препарату, так і при підпорогових. При надпороговому значенні дози мало місце зменшення показників ОЩ ($\chi^2 < 0,05$).

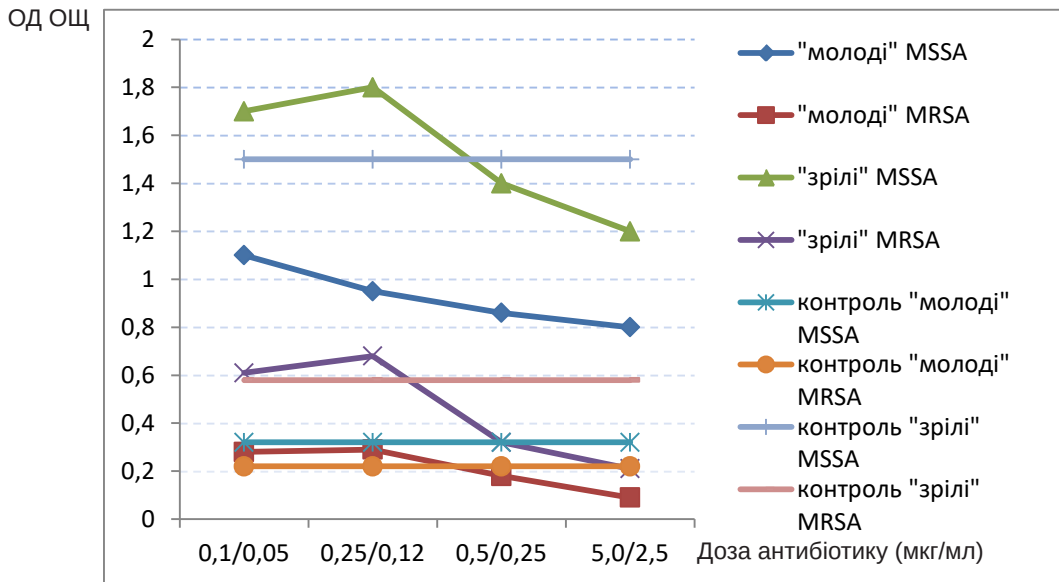
ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Суттєво відмінними були результати визначення впливу амоксициліну/клавуланату на ступень біоплівкоутворення метицилінорезистентного штаму (№ 22) (мал. 1).

У всіх в експерименті концентраціях антибіотика зазначалося збільшення показників ОЩ «молодих» біоплівок, що свідчить про здатність амоксициліну/клаву-

ланату стимулювати біоплівкоутворення метицилінорезистентних штамів стафілокока.

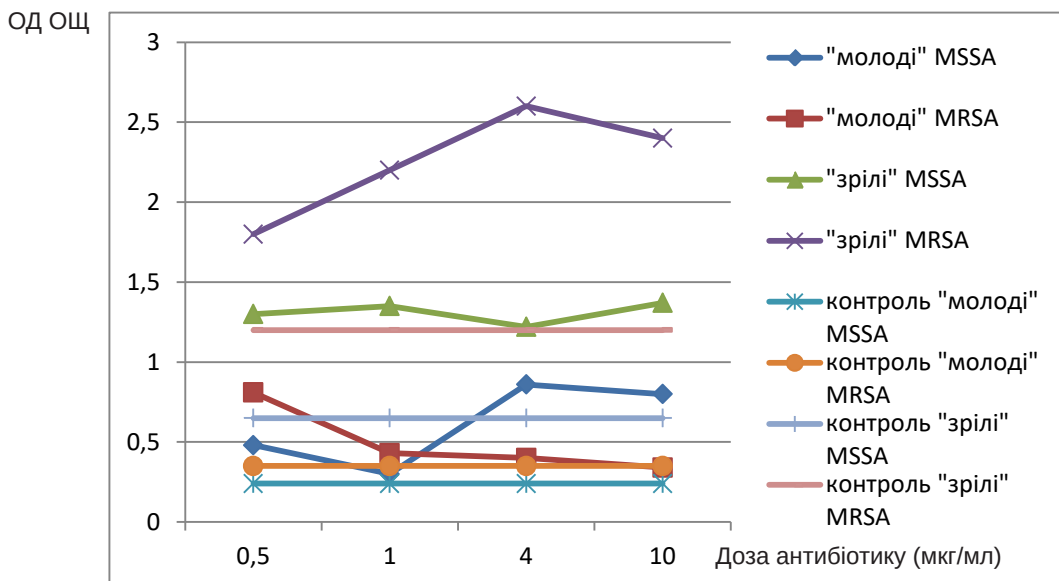
При визначенні ОЩ «зрілих» біоплівок, утворених метицилінорезистентним штамом № 22, достовірної різниці з контрольним зразком не виявлено (незалежно від концентрації амоксициліну/клавуланату) (мал. 1).



Мал. 1. Результати визначення дії амоксициліну/клавуланату на «молоді» та «зрілі» біоплівки MSSA та MRSA штамів.

Гентаміцин сприяв біоплівкоутворенню «молодих» біоплівок MSSA та MRSA штамів лише при підпороговій концентрації (мал. 2).

На вже сформовану біоплівку («зрілу»), утворену як MSSA, так і MRSA штамами, відзначено стимуляційну дію (збільшення значень ОЩ при всіх концентраціях антибіотика) (мал. 2).



Мал. 2. Результати визначення дії гентаміцину на «молоді» та «зрілі» біоплівки MSSA та MRSA штамів.

Це може свідчити про те, що гентаміцин при застосуванні на ранньому етапі інфікування в низьких і навіть терапевтичних дозах не інгібує процес біоплівкоутворення стафілококами, хоча і не стимулює його.

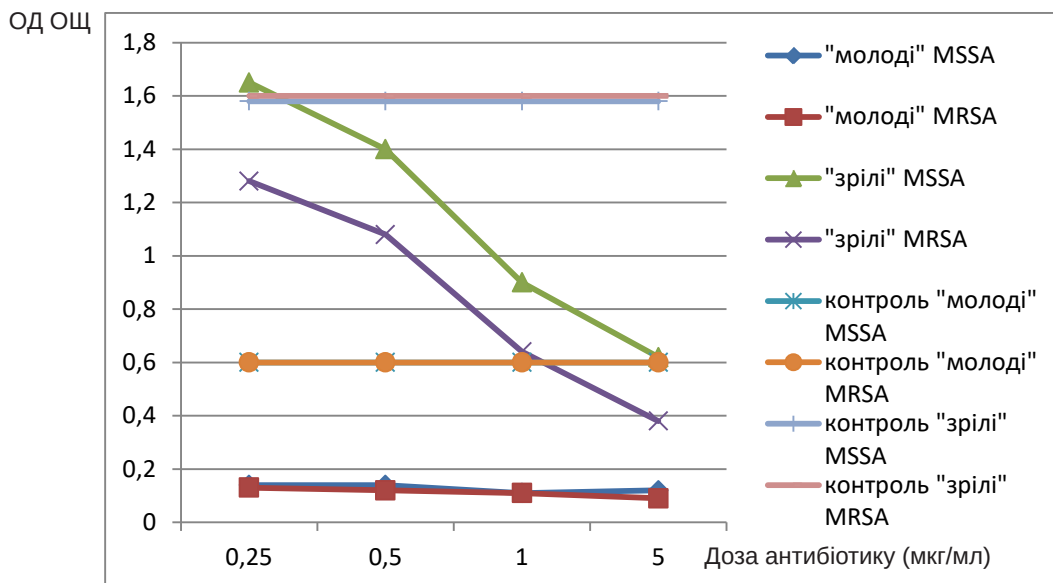
У віддалені строки, коли біоплівки вже сформувались, можливе стимулювання більш інтенсивного плівкоутворення, що, своєю чергою, знижує активність антибіотикотерапії при хронічному перебігу захворювання.

Найбільша інгібуюча активність плівкоутворення «молодих» біоплівок була виявлена при дії ципрофлоксацину:

у всіх взятих концентраціях (від 0,25 до 5,0 мкг/мл) було зафіксовано зниження ОД ОЩ ($\chi^2 < 0,05$) (мал. 3).

Деякі інші результати отримані при вивченні впливу ципрофлоксацину на уже сформовані («зрілі») біоплівки (мал. 3).

У пороговій (0,5 мкг/мл) та надпороговій концентраціях (5,0 мкг/мл) антибіотик викликав руйнацію сформованих біоплівок, що засвідчує у 3-4 рази зменшення показників ОД ОЩ «зрілих» біоплівок, сформованих як MSSA, так і MRSA штамми.



Мал. 3. Результати визначення дії ципрофлоксацину на «молоді» та «зрілі» біоплівки MSSA та MRSA штамів.

Безумовно, ці дослідження є недостатніми для формування остаточних висновків, так як мали пошуковий характер і потребують повторення експериментів на більшій кількості штамів, особливо внутрішньолікарняних, з генетично підтвердженою метицилінорезистентністю.

Аналізуючи результати бактеріологічного контролю (висіви з лунок після контакту культури з антибіотиками), слід зазначити, що росту культур стафілокока із «молодих» біоплівок не було в жодному випадку (табл. 2). Пояснюється цей ефект, можливо, тим, що частина культури могла загинути під дією антибіотиків, а частина знаходилась у «стресовому» стані й втратила можливість зростати на живильному середовищі.

Виявляється дія амоксициліну/клавуланату на «зрілі» біоплівки в порогових і підпорогових (у 2 та 10 разів менших) концентраціях, коли відмічалась наявність росту культур стафілокока (від поодиноких колоній MSSA штамів до 10^3 КУО/мл – MRSA), але він був сут-

тєво меншим, ніж при висівах із контрольних стафілококових біоплівок (без антибіотика) ($\chi^2 < 0,05$). Це вказує на можливість виживання стафілокока в біоплівках після застосування цього β -лактамного антибіотика в терапевтичних дозах.

Відсутність росту культур мала місце при висіві із «зрілих» біоплівок після дії на них гентаміцину в пороговій і надпороговій концентраціях, що може свідчити про певну дифузю антибіотика до 24-годинних біоплівок і їх бактерицидну дію або про перехід культури до некультурабельного стану. Аналогічні дані при вивченні антибіотиків на деякі культури УПМ були отримані й іншими авторами [14-17].

Аналізуючи дію ципрофлоксацину, можна зробити висновок, що даний антибіотик проявляв високу антибактерійну активність, що підтверджується негативними результатами висіву (табл. 2).

Оцінка біоплівок за ступенем забарвлення аніліновими барвниками (кристалічним фіолетовим, сафраніном)

Результати висіву культури стафілокока після дії антибіотиків на свіжо сформовані та «зрілі» біоплівки

Антибіотик	Доза препарату (мкг/мл)	«Молоді» біоплівки			«Зрілі» біоплівки		
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> №12	<i>S. aureus</i> №22	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> №12	<i>S. aureus</i> №22
Амоксицилін/клавуланат	5,0/2,5	-	-	-	-	-	-
	0,5/0,25	-	-	-	10 ¹	10 ¹	10 ²
	0,25/0,12	-	-	-	10 ²	10 ²	10 ³
	0,1/0,05	-	-	-	10 ³	10 ³	10 ⁴
Гентаміцин	10,0	-	-	-	-	-	-
	4,0	-	-	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	10 ¹	10 ¹	10 ¹
	0,5	-	-	-	10 ²	10 ²	10 ²
Ципрофлоксацин	5,0	-	-	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-	-	-
	0,5	-	-	-	-	-	-
	0,25	-	-	-	-	-	-
	К*	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵

Примітка. К* – контроль (біоплівкова культура штаму стафілокока без біоциду).

є традиційною [9]. Проте дані літератури, як і отримані нами результати досліджень, свідчать про відносну ефективність застосування даного способу при оцінці ранніх етапів біоплівкоутворення (до 12 год), коли на поверхні фіксується невелика кількість біоплівкової маси (клітин бактерій і матриксу) [18]. В патогенезі ж біоплівкоутворювального процесу найбільш критичними є саме перші години контамінації адгезивних поверхонь, так як у цей час незріла біоплівка є чутливішою до антибактерійних препаратів, ніж у більш зрілому стані. Кількісна оцінка ранньої біоплівки важлива для теоретичних досліджень при оцінці результатів експерименту, коли необхідно проаналізувати вплив на неї різних біоцидів. У наших експериментах вдалося виявити різний вплив біоцидів на культури стафілококів, здебільшого внаслідок порівняння з контролем показників життєздатності бактерій, а характеристика матриксу потребує додаткових досліджень.

Висновки

1. Амоксицилін/клавуланат у порогових і надпорогових дозах проявляв антибактерійну активність відносно MSSA штамів, зменшуючи показники ОЩ біоплівок, в той час як відносно MRSA штамів мало місце стимулювання біоплівкоутворення. На вже сформовані біоплівки цей препарат суттєво не впливав, що підтверджується результатами висіву біоплівкових культур стафілокока.

2. Гентаміцин сприяв утворенню «молодих» біоплівок лише при підпороговій концентрації, хоча інгібіції даного процесу не помічалось і при застосуванні препарату в порогових й навіть надпорогових дозах. Виявлено здатність даного антибіотика, незалежно від

доз, підвищувати ОЩ «зрілих» біоплівок, що вказує на неефективність його застосування при хронічних рецидивних формах захворювань.

3. Найбільша інгібуюча активність біоплівкоутворення виявлена при дії ципрофлоксацину. До того ж у порогових і надпорогових дозах антибіотик спричинював руйнацію вже сформованих «зрілих» біоплівок, утворених як MSSA, так і MRSA штамми.

4. При підпороговій концентрації ципрофлоксацину збільшення або зменшення ОЩ «зрілих» біоплівок не зафіксовано ($\chi^2 > 0,05$). Це свідчить про те, що при недотриманні схеми та дозування навіть таких ефективних антибактерійних препаратів, як пefлоксацини, не відбувається руйнація сформованих біоплівок, що сприяє персистенції збудника.

Література

1. Лямин, А. В., Боткин, Е. А., Жестков, А. В. (2012). Проблемы в медицине, связанные с бактериальными плёнками. *Клиническая микробиология. Антимикробная химиотерапия*, 14(4), 268-275.
2. Голуб, А. В. (2012). Бактериальные биопленки – новая цель терапии? *Клиническая микробиология. Антимикробная химиотерапия*, 14(1), 23-30.
3. Чеботарь, И. В., Маянский, Н. А., Кончакова, Е. Д. (2012). Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий. *Клиническая микробиология. Антимикробная химиотерапия*, 14(1), 51-58.
4. Мавров, И. И., Васильченко, В. Н., Белозоров, А. П. (2007). Биопленки и Quorum sensing у микроорганизмов. Биопленки и проблема эффективности антибактериальной терапии. *Дерматология и венерология*, 4(38), 19-42.
5. Блатун, Л. А. (2004) *Результаты применения различных лекарственных форм препарата Мирамистин в хирургической практике* [Электронный ресурс] <http://www.miramistin.ru/prof/khirurgiya/rezultati-primeneniya>

6. Бухарин, О. В., Чуркина, Л. Н., Перунова, Н. Б. (2012). Влияние антистафилококкового антибиотика батумина на биоплёнообразование микроорганизмов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, (2), 8-12.
7. Романова, Ю. М., Гинцбург, А. Л. (2011). Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, (3), 100-110.
8. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., Beachey, E. H. (1985). Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices. *J. Clin. Microbiol.*, 22(6), 996-1006 .
9. ВОЗ, Женева (1994). *Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии*. М.: Медицина.
10. Божкова, С. А., Краснова, М. В. (2014). Биопленкообразование клинических штаммов MRSA под воздействием антибиотиков в сыворотках крови. *Проблемы медицинской микологии*, 16(2), 11.
11. Elkhatib, W. F., Khairalla, A. S., Ashour H. M. (2011). Evaluation of different microtiter plate-based methods for the quantitative assessment of Staphylococcus aureus biofilms. *Future Microbiology*, 9(6), 725-735.
12. ГОСТ 10.444.1 – 84 (СТСЭВ 3833 – 82) (1985). *Приготовление растворов, реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе*. Введ. 1985-07-01. М.: Медицина.
13. Лапач, С. М., Чубенко, А. В., Бабич, П. Н. (2001). *Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel*. К.: МОПЮН.
14. Хмель, И. А. (2013). *Биопленки бактерий и связанные с ними трудности медицинской практики (обзор литературы)* [Электронный ресурс] www.img.ras.ru/files/PUBLIC/Add_mat/Biofilms.doc
15. Алексеева, Н. В., Степанова, Т. В., Толордава, Э. Р. (2010). Разработка средств борьбы с биоплёнками: влияние препарата «Лапрот» (на основе человеческого лактоферрина) и антибиотика ципрофлоксацина на рост и процесс образования биоплёнок бактериями *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Медицинский алфавит. Лаборатория*, (3), 4-9.
16. Lazar, V., Chifiriuc, M.C. (2010). Medical significance and new therapeutic strategies for biofilm associated infections. *Roum. Arch. Microbiol. Immunol.*, 69(3), 125-138.
17. Честнова, Т. В. (2013). Обзор методов борьбы с микробными биопленками при воспалительных заболеваниях. *Вестник новых медицинских технологий*, (1), 2-13.
18. Чеботарь, И. В. (2014). Биопленки *Staphylococcus aureus*: структурно-функциональные характеристики и взаимоотношения с нейтрофилами. *Дисс. докт. мед. наук*. Нижний Новгород.

ANTIBIOTICS IMPACT ON FORMATION OF BIOFILMS MSSA AND MRSA STRAINS OF STAPHYLOCOCCI

S.A. Derkach, I.A. Voronkina, L.S. Habysheva, I.A. Krylov, N.M. Kutsay

I.I. Mechnykov Institute of Microbiology and Immunology, Kharkiv National Medical University

SUMMARY. *Experimental study the effect of antibiotics (amoksatsyllin/clavulanat, gentamicin and ciprofloxacin) to process formation of biofilms MSSA and MRSA strains of staphylococcus and their effect on the already established «mature» biofilm.*

Key words: *staphylococcal biofilms, MSSA and MRSA, peculiarities of antibiotics.*

Отримано 26.08.2016 р.