

ЗДАТНІСТЬ ДО БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ ІЗОЛЯТІВ *S. aureus*, ВИДІЛЕНИХ З РІЗНИХ ЕКОНІШ

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова
Національної академії медичних наук України» (м. Харків)

Робота виконана в рамках планової НДР лабораторії біохімії мікроорганізмів та поживних середовищ ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» «Дослідження біологічних властивостей мікроорганізмів при культивуванні на модифікованих поживних середовищах, що включають рослинні компоненти», № держ. реєстрації 011U004738.

Вступ. Інфекції, в яких етіологічним чинником є *S. aureus*, включають більш ніж 100 нозологічних форм. Стафілококи здатні вражати практично будь-які органи і тканини організму людини. Найбільш часто спостерігаються варіабельні ураження шкіри і м'яких тканин, а також різні гнійно-запальні захворювання органів і систем людини, що характеризуються різноманітним течією – від легких до найтяжчих генералізованих форм. *S. aureus* відіграє провідну роль при виникненні позалікарняних гнійно-запальних захворювань різної локалізації і займає лідируючі позиції в етіологічній структурі нозокоміальних інфекцій [10]. За даними літератури стафілококи володіють здатністю до формування хронічних (персистентних) інфекцій, які розвиваються як в нативних тканинах, так і на інвазивних матеріалах, штучно впроваджуваних в організм. Такі інфекції пов'язані з утворенням біоплівки. [3, 4, 8, 9, 13]. Більше 99% бактеріальних популяцій існують в природних екосистемах не у вигляді вільно плаваючих планктонних клітин, а у вигляді специфічно організованих, прикріплених до субстратів біоплівок, утворення яких представлено складним регульованим біологічним процесом [20]. Здатність формувати біоплівки є складовою частиною життєвого циклу більшості мікроорганізмів і успішною стратегією захисту бактерій від несприятливих факторів середовища. Відомо, що біоплівки здатні утворювати більше 90% вивчених видів бактерій, а їх формування виявляється більш ніж при 80% хронічних захворювань мікробної етіології [2, 5, 14]. Вивчення біоплівок в даний час викликає величезний інтерес дослідників, головним чином, у зв'язку з тим, що цей спосіб існування бактерій створює великі проблеми в медичній практиці [15].

Здатність бактерій формувати біоплівки розглядається в даний час як фактор їх патогенності [1, 17]. Формування біоплівок – дуже складний, багатостадійний процес. Перше обумовлено фізико-хімічними процесами взаємодії бактерій з поверхнею: електростатичної та гідрофобної взаємодії, броунівського руху. Неспецифічне прикріплення

здійснюється до біотичних та абіотичних об'єктів більшою мірою зворотно. Специфічне прикріплення відбувається після молекулярних взаємодій між молекулами – адгезинів та рецепторів клітин макроорганізму. Важливу роль в адгезії мікроорганізмів до різних поверхонь грають також електричні заряди. Бактеріальна поверхня заряджена негативно, причому у грампозитивних мікроорганізмів це обумовлено наявністю в клітинній стінці тейхоевих і ліпотейхоевих кислот. Біоплівкоутворюючі бактерії спілкуються поміж собою секреторними медіаторами (аутоіндукторами), які служать основою їхньої соціальної поведінки, або quorum sensing – QS [6, 7, 16, 19].

Мета роботи – вивчити здатність до біоплівкоутворення клінічних ізолятів *S. aureus*, виділених з різних еконіш багатопротиповного стаціонару.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктом дослідження були 323 штами *S. aureus*, з них 216 ізольовані з клінічного матеріалу від хворих, що знаходились на лікуванні у багатопротиповному стаціонарі (відокремлюване верхніх дихальних шляхів, трофічних виразок нижніх кінцівок, вуха, очей, сеча), 62 штами, виділені з об'єктів зовнішнього середовища багатопротиповного стаціонару (повітря маніпуляційних, змиви з поверхонь) і 45 штамів, ізольованих з носоглотки медичного персоналу багатопротиповного стаціонару. Виділення і ідентифікацію штамів *S. aureus* здійснювали бактеріологічним методом на підставі вивчення культуральних, біохімічних і морфологічних властивостей мікроорганізмів відповідно до нормативних документів [12]. Дослідження здатності до формування біоплівок мікроорганізмами проводили згідно з методикою [18].

Бактеріальні культури вирощували в поживному бульйоні при температурі 37°C. Визначення проводили в плоскодонних планшетах для імуноферментного аналізу. Добові культури штамів розводили рідким поживним середовищем до концентрації 10⁷ КУО/мл, отримані суспензії вносили по 150 мкл у лунки планшета. Для контролю фону також вносили поживний бульйон, в якому інкубували культури. Як рідке поживне середовище використовували трипказо-соевий бульйон (TSB), виробництва bioMérieux, Франція та трипказо-соевий бульйон з 2% вмістом глюкози (TSBG). Планшет інкубували при 37°C 24 год. Потім вміст лунок видаляли і вносили по 150 мкл 0,1 спиртового розчину барвнику кристал-віолету. Лунки, заповнені барвником, інкубували при кімнатній температурі протягом 45

Таблиця 1
Рівень біоплівкоутворення штамів *S. aureus*, виділених з різних еконіш

Здатність до біоплівкоутворення	Еконіша вилучення штамів <i>S. aureus</i>		
	Клінічний матеріал від пацієнтів (n=216)	Об'єкти зовнішнього середовища (n=62)	Медперсонал (n=45)
Відсутня/слабка (%)	10,6±0,1	3,2±0,3	6,7±0,3
Середня (%)	60,7±0,3	43,6±0,5	62,2±0,1
Висока (%)	28,7±0,1	53,2±0,1	31,1±0,4

Таблиця 2
Середні показники оптичної щільності біоплівок *S. aureus*, виділених з різних еконіш

Еконіша вилучення штамів <i>S. aureus</i>	Кількість штамів	Показники оптичної щільності (M±m)
Клінічний матеріал від пацієнтів	216	0,187±0,02
Об'єкти зовнішнього середовища	62	0,231±0,01
Медперсонал	45	0,208±0,01

хвилин. Потім барвник видаляли, а лунки триразово промивали дистильованою водою. У відмиті від незв'язаної фарби лунки вносили по 250 мкл 96% етилового спирту і залишали на 45 хвилин при кімнатній температурі.

Стафілококова біоплівка забарвлювалась кристалічним фіолетовим, оптична щільність вимірювалась Bio rad auto reader (model 450,) при довжині хвилі 450 нм. Для нівелювання похибки, пов'язаної з оптичною щільністю компонентів поживного середовища, зв'язаних з планшетом, значення оптичної щільності контрольної лунки (стерильне поживне середовище) віднімали від результатів, отриманих для дослідних проб.

Отримані значення оптичної щільності приймали за здатність до утворення біоплівок. Здатність до утворення біоплівок відсутня / слабка при оптичній щільності < 0,120; середня – 0,120-0,240; висока – > 0,240.

Дослідження проводили в трьох повтореннях. Статистичну обробку експериментальних даних проводили за допомогою комп'ютерної програми Statistica 10,0.

Результати досліджень та їх обговорення.

Результати вивчення здатності до біоплівкоутворення виділених штамів *S. aureus* узагальнені і представлені в таблицях 1, 2.

За результатами проведеного дослідження було встановлено, що здатність до формування біоплівки у виділених ізолятів *S. aureus* різнилася. Так, показник оптичної щільності *S. aureus*, ізольованих від пацієнтів, знаходився в межах 0,068 до 0,297, при цьому 10,6% штамів мали слабку здатність до біоплівкоутворення, 60,7% мали середню здатність до біоплівкоутворення та 28,7% мали високу здатність

до біоплівкоутворення. Показник оптичної щільності *S. aureus*, ізольованих з госпітальних об'єктів, знаходився в межах 0,102 до 0,375. Слабку здатність до біоплівкоутворення мало 3,2%, 43,6% мали середню здатність до біоплівкоутворення, високу здатність до біоплівкоутворення мало 53,2%.

Показник оптичної щільності ізолятів *S. aureus* з носоглотки медперсоналу знаходився в межах від 0,115 до 0,318. Слабку здатність до біоплівкоутворення мали 6,7% штамів, 62,2% мали середню здатність до біоплівкоутворення, високу здатність до біоплівкоутворення мали 31,1%. Приведені данні свідчать, що всі досліджувані культури *S. aureus* проявляли в основному високу і середню здатність до біоплівкоутворення.

Найвищий показник біоплівкоутворення визначено у штамів, вилучених з об'єктів зовнішнього середовища, який у 1,9 рази перевищував аналогічний показник штамів, виділених з клінічного матеріалу від пацієнтів, і в 1,7 рази – штамів, виділених від медперсоналу (p < 0,05).

Середній показник оптичної щільності (таблиця 2) біоплівок ізолятів *S. aureus* від пацієнтів склав 0,187, у медперсоналу аналогічний показник склав 0,208, що в 1,1 рази перевищує показник середньої оптичної щільності від пацієнтів (p < 0,01). Найвищий середній показник оптичної щільності біоплівок *S. aureus*, вилучених з об'єктів зовнішнього середовища склав 0,231, що в 1,3 рази перевищував середній показник оптичної щільності *S. aureus* вилучених від пацієнтів, та в 1,1 рази перевищував оптичної щільності *S. aureus* виділених від медперсоналу (p < 0,01).

Наші дослідження показали, що серед виділених штамів з високою здатністю до біоплівкоутворення достовірно переважають штами, ізольовані з об'єктів зовнішнього середовища. Імовірно можна припустити, що висока здатність до біоплівкоутворення штамів *S. aureus* є показником патогенності при тривалій персистенції даного патогена у зовнішньому середовищі. Дане припущення підтверджується попередніми дослідженнями з вивчення адгезивних властивостей ізолятів стафілококу, вилучених з об'єктів зовнішнього середовища [11].

Висновки.

1. Здатність до плівкоутворення була виявлена у всіх досліджуваних штамів *S. aureus*, виділених з різних еконіш.

2. Виявлено, що досліджувані штами *S. aureus* мали різну здатність до біоплівкоутворення. Так, найвищу здатність до біоплівкоутворення мали штами, ізольовані з об'єктів зовнішнього середовища, тому даний показник можна вважати одним з чинників персистування.

Перспективи подальших досліджень. Отримані нами результати досліджень свідчать про необхідність подальшого вивчення біоплівкоутворення стафілококів, як одного з найважливіших факторів патогенності та персистенції, розробки методів визначення чутливості стафілококів, що знаходяться у стані біоплівки, до антимікробних препаратів з метою ефективного вибору антибактеріальної терапії стафілокової інфекції.

Література

1. Афиногенова Л. Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А. Г. Афиногенова, Е. Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. – 2011. – №3. – С. 119-125.
2. Бухарин О. В. Влияние антистафилококкового антибиотика батумина на биопленкообразование микроорганизмов / О. В. Бухарин, Л. Н. Чуркина, Н. Б. Перунова // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунологии. – 2012. – №2. – С. 8-12.
3. Бухарин О. В. Действие батумина на биопленки *Klebsiella pneumoniae* / О. В. Бухарин, Л. Н. Чуркина, Н. Б. Перунова, Е. В. Иванова // Матеріали XIII з'їзду товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського. – Ялта, 2013. – С. 226.
4. Воробей Є. С. Вплив лікувальних препаратів бактеріофагів на біоплівки *Staphylococcus aureus* / Є. С. Воробей, О. С. Воронкова, А. І. Вініков, С. М. Коваленко, Г. П. Шматко // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип. 2, том 3 (109). – С. 223-229.
5. Гостев В. В. Бактериальные биопленки и инфекции / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – №2. – С. – 4-15.
6. Лямин А. В. Методы выявления биопленок в медицине / А. В. Лямин, Е. А. Боткин, А. В. Жестков // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2012. – Т. 1, №1. – С. 17-22.
7. Маянский А. Н. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение / А. Н. Маянский, И. В. Чеботарь // Журн. микробиол. – 2011. – №1. – С. 101-108.
8. Маянский А. Н. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение / А. Н. Маянский, И. В. Чеботарь // Журн. микробиол. – 2011. – №1. – С. 101-108.
9. М'гясоєдов В. В. Оцінка ефективності впливу низького інтенсивного ультразвукового випромінювання на сформовані біоплівки та попередження формування біоплівок *E. coli* та *S. aureus* / В. В. М'гясоєдов, М. М. Мішина, В. Б. Давиденко // Епідеміологічні дослідження в клінічній медицині: досягнення та перспективи: Матеріали міжнародної науково-практичної конференції. – Харків, 2013. – С. 175.
10. Пономаренко С. В. Микробиологические аспекты стафилококковой инфекции на современном этапе (обзор литературы) / С. В. Пономаренко // Аналі Мечніківського інституту. – 2013. – №3. – С. 13-17.
11. Пономаренко С. В. Адгезивні властивості штамів *Staphylococcus aureus* виділених з різних еконіш / С. В. Пономаренко, Т. П. Осолодченко, Е. В. Порт, Е. В. Менкус // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип. 2, том 3 (109). – С. 230-232.
12. Приказ МЗ СССР «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» №535 от 22 апреля 1985. Режим доступа: <http://jurbase.ru/postr/docum1140/part5.htm>.
13. Рижкова Т. А. Вплив умов культивування на біоплівкоутворення *Staphylococcus aureus* [Текст] / Т. А. Рижкова, С. В. Калініченко, О. О. Кротких, Л. А. Ждамарова, О. А. Шикова // Матеріали XIII з'їзду товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського. – Ялта, 2013. – С. 319.
14. Романова Ю. М. Способность к формированию биопленок в искусственных системах различных штаммов *Salmonella typhimurium* / Ю. М. Романова, Н. В. Алексеева, Т. А. Смирнова [и др.] // Журн. микробиол. – 2006. – №4. – С. 38-42.
15. Хренов П. А. Обзор методов борьбы с микробными биопленками при воспалительных заболеваниях / П. А. Хренов, Т. В. Честнова // Вестник новых медицинских технологий. – 2013. – №1. – С. 24-26.
16. Aparna M. S. Biofilms: microbes and disease / M. S. Aparna, M. S. S. Yadav // Braz. J. Infect. Dis. – 2008. – №12 (6). – P. 526-530.
17. Hall-Stoodley L. Evolving concepts in biofilm infections / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // Cell Microbiol. – 2009. – Vol. 11, №7. – P. 1034–1043.
18. Mathur T. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evolution of three different screening methods / T. Mathur, S. Singhal, S Khan [et al.] // Indian Journal of Medical Microbiology. – 2006. – Vol 24, №1. – P. 25-29.
19. Pintucci J. P. Biofilms and infections of the upper respiratory tract / J. P. Pintucci, S. Corno, M. Carotta // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. – 2010. – Vol. 14. – P. 83-90.
20. Wolcott R. D. Chronic wounds and the medical biofilm paradigm / R. D. Wolcott [et al.] // J. Wound Care. – 2010. – Vol. 19, №2. – P. 45–50.

УДК 616. 002:576. 851. 2:579. 2

**ЗДАТНІСТЬ ДО БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ ІЗОЛЯТІВ *S. AUREUS*, ВИДІЛЕНИХ З РІЗНИХ ЕКОНІШ
Пономаренко С. В., Воронкіна І. А., Осолодченко Т. П., Порт О. В., Пірцхалава Т. В.**

Резюме. В результаті вивчення циркулюючих штамів *Staphylococcus aureus*, вилучених в багатопрофільному стаціонарі, було визначено їх здатність до формування біоплівки, яку вивчали за величиною оптичної густини біоплівки. Наші дослідження показали, що серед виділених штамів з високою здатністю до біоплівкоутворення достовірно переважають штами, ізольовані з об'єктів зовнішнього середовища, які у 1,9 рази перевищували аналогічний показник штамів, виділених з клінічного матеріалу від пацієнтів, і в 1,7 рази – штамів, виділених від медперсоналу. Середній показник оптичної щільності *S. aureus*, вилучених з об'єктів зовнішнього середовища склав 0,231.

Ключові слова: *Staphylococcus aureus*, циркулюючі штами, біоплівкоутворення.

УДК 616. 002:576. 851. 2:579. 2

СПОСОБНОСТЬ К БИОПЛЁНКООБРАЗОВАНИЮ ИЗОЛЯТОВ *S. AUREUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ЭКОНИШ

Пономаренко С. В., Воронкина И. А., Осолодченко Т. П., Порт А. В., Пирцхалава Т. В.

Резюме. В результате изучения циркулирующих штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных в многопрофильном стационаре, была изучена их способность к формированию биопленки, которую изучали по величине оптической плотности биопленки. Наши исследования показали, что среди выделенных штаммов с высокой способностью к биоплёнкообразованию достоверно преобладают штаммы, изолированные из объектов внешней среды, которые в 1,9 раза превышали аналогичный показатель штаммов, выделенных из клинического материала от пациентов, и в 1,7 раза – штаммов, выделенных от медперсонала. Средний показатель оптической плотности *S. aureus*, изъятых из объектов внешней среды, составил 0,231.

Ключевые слова: *Staphylococcus aureus*, циркулирующие штаммы, биоплёнкообразование.

UDC 616. 002:576. 851. 2:579. 2

The Ability to Biofilm Formation Isolates *S. Aureus*, Received by Different Ecological Niches

Ponomarenko S. V., Voronkina I. A., Osolodchenko T. P. Port O. V., Pirtskhalava T. V.

Abstract. Infections, which the etiologic agent is *S. aureus*, including more than 100 nosological forms. Staphylococci can affect any organs and tissue of the human body. The most frequently observed variable damages of skin and soft tissues, as well as various purulent – inflammatory diseases of human organs and systems.

They were characterized by a variety of flow – from mild to severe generalized forms. *S. aureus* plays a leading role in the occurrence of community-acquired purulent – inflammatory diseases of different localization. They holds a leading position in the etiological structure of nosocomial infections. According to the literature, staphylococci have the ability to form chronic (persistent) infection which develops in native tissues and artificial materials which implementing into the body. Such infections are associated with the formation of biofilms.

Objective: To examine the ability of formation biofilm in clinical isolates of *S. aureus*, received by different ecological niches of multidisciplinary hospital.

Materials and methods: the objects of researching were 323 strains of *S. aureus*, from them 216 received by clinical material from the inpatients of multidisciplinary hospital (mucus of upper respiratory tract, from trophic ulcers of lower limbs, ears, eyes, urine), 62 strains, received by the objects of environment of hospital (air manipulation rooms, washing off from surfaces) and 45 strains, received by the medical personnel's nasopharynx. The biofilm of staphylococcus was painted by crystalline violet; the optical density was measured Bio rad auto reader (model 450) at the wave-length of 450 nm.

For leveling of the error, which connected with optical density of components culture medium related with the plane-table. The value of optical density of control small hole (sterile culture medium) was taken away from results of experience tests.

Were find out that capacity of isolates of *S. aureus* for forming of biofilm were different. Index of optical density of *S. aureus*, isolated from patients, was within the limits of 0,068 to 0,297 and 10,6% strains had weak ability to form biofilm, 60,7% had medium ability for this and 28,7% had a high ability. These data testify that all investigated cultures of *S. aureus* showed mainly a high and middle ability to from biofilm.

The highest index of forming biofilm was at the strains received by the objects of environment, that in 1,9 time exceeded the analogical index of strains, received by clinical material from patients, and in 1,7 time – strains, received by the medical staff ($p < 0,05$). Index of optical density of *S. aureus*, received by hospital objects, was within the limits of 0,102 to 0,375, high ability to form biofilms were 53,2% Index of optical density of isolates of *S. aureus* received by the nasopharynx of medical staff was in limits from 0,115 to 0,318, 6,7% strains had a weak ability to form biofilm, 62,2% had average ability, 31,1% had a high ability for this.

Our research showed that among the strains describe above high ability have the strains received by the objects of environment. Possible to suppose that high ability to from biofilm of strains of *S. aureus* is the index of pathogenicity during long persistence of this pathogen in an environment.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, circulatory strains, biofilm.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.

Стаття надійшла 4. 06. 2014 р.