

УДК 615.28:579.861.2:579.61:616-078

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЗДАТНОСТІ ДО ПЛІВКОУТВОРЕННЯ МЕТИЦИЛІНОРЕЗИСТЕНТНИХ ТА МЕТИЦИЛІНОЧУТЛИВИХ ШТАМІВ СТАФІЛОКОКУ

Воронкіна І.А., Деркач С.А., Крилова І.А.,
Габишева Л.С.

Державна установа «Інститут мікробіології та
імунології ім. І.І. Мечникова Національної
академії медичних наук України»
61057, м. Харків, вул. Пушкінська, 14-16,
imiamn@ukr.net

Незважаючи на те, що основним напрямком боротьби зі збудниками інфекційних захворювань залишається пошук лікарських засобів, які пригнічують ріст і розмноження мікроорганізмів, доводиться визнати, що досягти елімінації збудника, та, відповідно, необхідної концентрації антибактеріального препарату в тканинах організму, вдається далеко не завжди. На думку більшості науковців, вказана проблема пов'язана зі здатністю бактерій до персистенції шляхом модифікаційної мінливості біологічних властивостей, у тому числі і біоплівкоутворення [1].

В останні роки з'явилися публікації, в яких підтверджується тенденція до зростання циркуляції полірезистентних штамів як серед Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA), так і Methicillin-Susceptible *Staphylococcus Aureus* (MSSA) стафілококів.

У наших попередніх дослідженнях було встановлено, що основним етіологічним чинником гнійно-запальних захворювань різної локалізації залишається стафілокок (73,2%). Звертає на себе увагу і той факт, що близько 33,0 % циркулюючих в регіоні позалікарняних штамів були ідентифіковані як метицилінорезистентні. Показана наявність проблеми вибору антибактеріальної терапії захворювань, зумовлених такими штамми.

Високі показники антибіотико- та фагорезистентності MRS-штамів свідчать про актуальність пошуку нових напрямків боротьби зі стафілоковою інфекцією, зумовленою такими штамми.

У бактерій в біоплівках змінюється експресія майже 40 % бактеріальних генів, які беруть участь у процесах мембранного транспорту, секреції, синтезу фосфоліпідів і ліпосахаридів, регуляції інших генів. При цьому можлива як активація експресії генів, так і їх репресії [16].

Виходячи з цього доцільно визначити, чи впливає наявність метицилінорезистентності на біоплівкоутворення та як змінюється чутливість штамів стафілококу, у стані біоплівки, до дії антибіотиків та інших біоцидів.

Першим кроком утворення бактеріальної біоплівки є адгезія мікроорганізмів до поверхні з наступною колонізацією [2, 3]. Адгезія залежить від достатньо великої кількості різних факторів: виду мікроорганізму, фізичних та хімічних властивостей

поверхонь, на яких формується біоплівка, ряду екологічних факторів, продуктів експресії відповідних генів та ін.

На сьогодні, вчені прийшли до висновку, що процес адгезії починається, коли створюється необхідна сума екологічних параметрів, що стимулюють перехід від існування у вільній (планктонній) формі до життя на поверхні [3].

У медицині існує чимало методів вивчення біоплівкоутворення. Культивування в динамічних системах дозволяє створити умови, максимально близькі до тих, що існують у макроорганізмі. Основним недоліком цих методів є необхідність використання обладнання складних конструкцій, труднощі зі стерилізацією внутрішніх поверхонь апаратів. Інша група методів ґрунтується на створенні статичних умов культивування мікроорганізмів, найбільш часто при цьому використовують 96-лунокові пластикові планшети у різних модифікаціях. Суть методу полягає у наступному: інкубування певної каламутності та певного об'єму вносять у лунки планшету, після інкубації в оптимальних умовах планктонна фаза популяції видаляється разом з поживним середовищем, біоплівки, що утворились, виявляють різними способами [3]. Прикріплення бактерій до поверхонь може бути неспецифічним та специфічним. В основі неспецифічного механізму лежать фізико-хімічні процеси взаємодії бактерій з поверхнями (електростатичні, гідрофобні). Специфічне прикріплення можливе після молекулярних взаємодій між молекулами-адгезинами та рецепторами клітин-хазяїна [3, 4, 5]. Таким чином, використання планшетів навіть одного виробника може призводити до різних результатів дослідження, що обумовлено фізико-хімічними особливостями. Крім цього, на формування біоплівок при використанні даного методу мають вплив склад поживних середовищ (мікронутрієнтний та електролітний) та ступінь аерації.

Для кількісної оцінки на фотометрі утвореної в планшетах біоплівки дослідники використовують різну довжину хвиль 450 нм, 540 нм, 562 нм, 630 нм, 650 нм та ін.

Отже, даний метод є досить поширеним, але основним його недоліком є те, що не існують стандарти, які б дозволяли уніфікувати його для усіх лабораторій.

Мета цієї роботи – оптимізація параметрів постановки тесту для виявлення здатності до біоплівкоутворення метицилінорезистентних (MRSA) та метициліночутливих (MSSA) штамів.

Матеріали та методи

Об'єкт дослідження – штами *Staphylococcus aureus* з лабораторного музею з визначеною в попередніх дослідженнях метициліночутливістю, штами *S.aureus*, свіжевиручені від хворих гнійно-запальними захворюваннями різної локалізації

Ідентифікацію мікроорганізмів та визначення метицилінорезистентності здійснювали згідно діючих рекомендацій [6, 7].

Визначення біоплівкоутворюючих властивостей стафілококів здійснювали методом культуральних планшетів D. Christensen [8, 9, 10]. Отримані результати досліджень обробляли методом

варіаційної статистики за допомогою програми MS Excel 2000, Biostat з використанням критерію χ^2 [11, 12].

Результати та обговорення

Для культивування стафілококів використовували поживний бульйон (HiMedia, Індія), поживний бульйон з об'ємною часткою глюкози 2 %, з об'ємною часткою NaCl 6 %, з об'ємною часткою NaCl 7 %.

Відомо, що глюкоза підсилює активність головного елементу матриксу стафілокової біоплівки - полісахаридного міжклітинного адгезину (PIA – polysaccharide intercellular adnesin) [13]. Одним із стандартних стрес-факторів, котрі використовують для вивчення процесу біоплівкоутворення, є наявність у поживному середовищі NaCl. За літературними даними, стафілококові біоплівки по-різному реагують на присутність NaCl: в одних випадках сольовий стрес мав стимулюючу дію на процеси біоплівкоутворення, в інших – не мав ніякого впливу [13, 14]

У дослідах використовували 3 штами *S. aureus* (№ 14 MRSA, № 15 MRSA, № 68 MSSA та *S. aureus* ATCC №25923 - MSSA). Бактеріальні ізоляти інкубували у відповідних поживних середовищах (поживний бульйон, поживний бульйон з об'ємною часткою глюкози 2 %, з об'ємною часткою NaCl 6 %, з об'ємною часткою NaCl з 7 %) 18 годин при 35 °C у стаціонарних умовах, потім у цих середовищах готували завис мікроорганізмів 0,5 одиниць за шкалою McFarland (Од McF).

Для виявлення біоплівкоутворення використовували стерильні плоскодонні 96-лункові планшети. Кожну лунку наповнювали 0,2 мл (200 мкл) готової суспензії (по 3 лунки для кожного штаму). У якості контролю – тільки відповідне поживне середовище, для перевірки стерильності та неспецифічного зв'язування компонентів поживного середовища з планшетом.

Таблиця 1 – Оцінка біоплівкоутворення за показниками ОЩ

Показники ОЩ	Адгезія до поверхні	Здатність до утворення біоплівок
<0,12	Відсутня	Відсутня / слабка
0,12-0,24	Середня	Середня
>0,24	Сильна	Висока

Проведені дослідження показали, що одиниці оптичної щільності (ОД ОЩ) стафілококових біоплівок, утворених через 4 години не мали статистично достовірної різниці, у порівнянні з контролем. Так, ОЩ біоплівок коливались від 0,02 до 0,03 ОД, ОЩ контрольної лунки складала 0,01-0,02 ОД ($\chi^2 > 0,05$). (рис. 1). Показники забарвлення

Планшети інкубували 4, 24, 48 та 72 години при 35 °C. Після інкубації вміст лунок видаляли, лунки промивали 4 рази 0,2 мл фосфатно-сольового буфером (ФСБ рН 7,2) для усунення свободо існуючих «планктонних» бактерій.

Біоплівки, що сформувались, фіксували 2 % розчином (об'ємна частка) ацетату натрію та забарвлювали 0,1 % розчином (масова частка) кристалічного фіолетового упродовж 30 хв при кімнатній температурі. Зайвий барвник видаляли, лунки триразово промивали дистильованою водою, потім планшети висушували на повітрі (30 хв). Для екстракції барвника у лунки додавали 0,2 мл 96 % (об'ємна частка) етанолу і залишали на 60 хв при кімнатній температурі.

Оптичну щільність сформованої біоплівки оцінювали за інтенсивністю забарвлення спирту на фотометрі (StatFax 303 Plus). Оскільки на сьогодні чіткі параметри щодо довжини хвилі для оцінки утвореної біоплівки не встановлені, ми у своїх порівняльних дослідження використовували довжину хвилі 630 нм (максимальну), яка, за літературними даними, є оптимальною для вимірювань при використанні барвника генціан-фіолетового [15].

Для нівелювання похибки, пов'язаної з оптичною щільністю компонентів поживного середовища, адсорбованих на планшеті, значення оптичної щільності контрольної лунки (стерильне поживне середовище) віднімали від результатів отриманих для дослідних проб. Кожний дослід повторювали три рази в паралельних дослідженнях двох експериментаторів.

Отримані значення оптичної щільності (ОЩ) приймали за індекс адгезії бактерій до поверхні та здатності до утворення біоплівок. Для оцінки отриманих результатів використовували параметри, наведені в таблиці 1 [40].

біоплівки через 24-48 годин достовірно відрізнялись, як від контрольних результатів, так і від показників 4-годинних біоплівок (рис. 2).

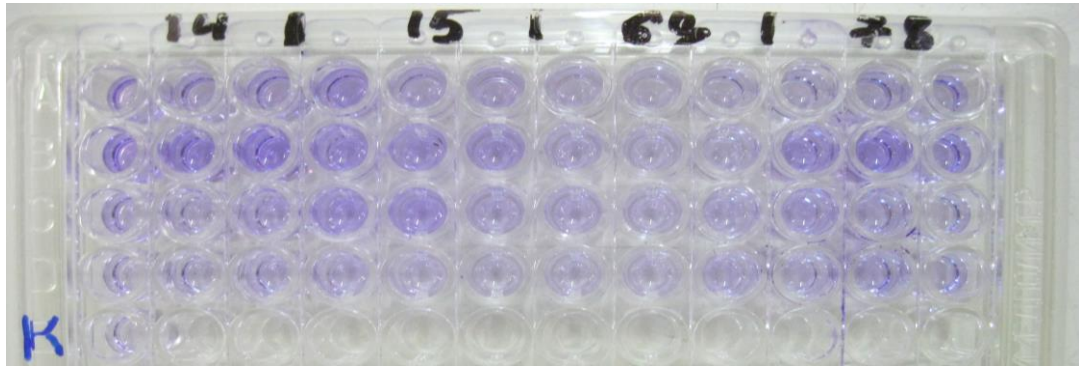


Рисунок 1 – Наявність біоплівки штамів *S. aureus* через 4 години, (к – контрольна лунка)

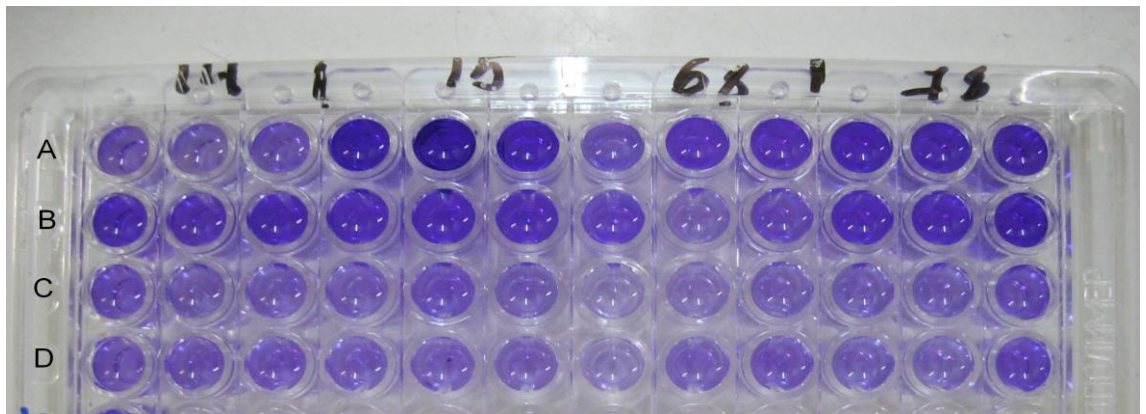


Рисунок 2 – Наявність біоплівки штамів *S. aureus*. Примітка. А - поживний бульйон; В - поживний бульйон з 2 % глюкози, С – з 6 % NaCl; D – з 7 % NaCl

Так, ОЩ біоплівок, утворених через 4 години (на прикладі штаму № 14) складала 0,05 ОД, через 24 години - 0,85 ОД, через 48 годин 0,7 ОД. Така ж сама тенденція зберігалась і по відношенню до інших дослідних штамів.

При подальшому аналізі було визначено, що інкубація до 72 годин є не доцільною, оскільки спостерігається зменшення показників ОЩ до початкових, що може бути пов'язано з руйнуванням утворених біоплівок (рис. 3).

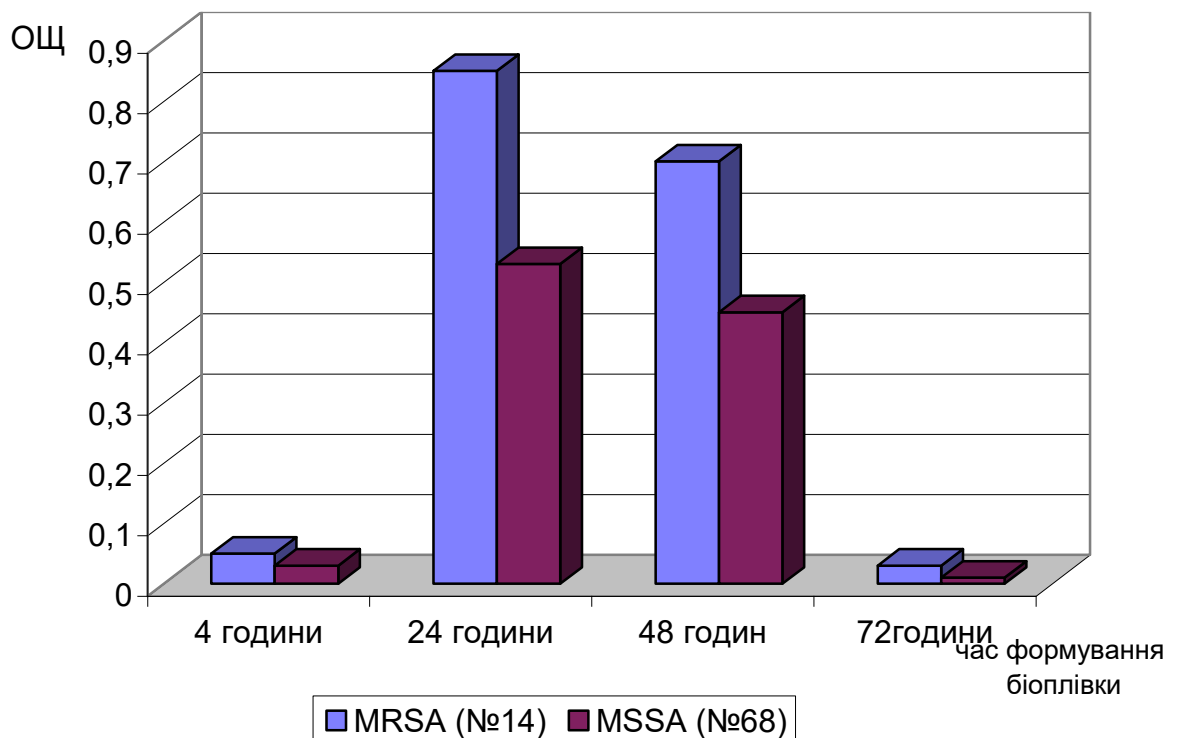


Рисунок 3 – Оптична щільність біоплівок MRSA і MSSA штамів стафілококу при різних часових параметрах дослідження

Отримані в даному дослідженні результати показують, що даний спосіб оцінки

біоплівкоутворюючих властивостей мікроорганізмів є ефективним для оцінки так званих «зрілих» біоплівок, утворених через 24-48 годин.

Визначення оптимального середовища для отримання стафілококових біоплівки показало, що найбільш ефективним є культивування з додаванням до поживного середовища з об'ємною часткою глюкози 2 % (рис. 4).

Так, значення ОЩ біоплівки, утворених на поживному бульйоні, при використанні глюкози були в 1,8-2,6 разів більші ($\chi^2 < 0,05$). Найбільша різниця (в

2,6 рази) спостерігалась при вимірюванні ОЩ біоплівки, утворених штамом № 78 (ОЩ біоплівки складала 0,08 та 0,21 ОД відповідно). Додавання до поживного середовища хлориду натрію мало пригнічуючу дію на біоплівкоутворюючі властивості всіх досліджених штамів стафілококу.

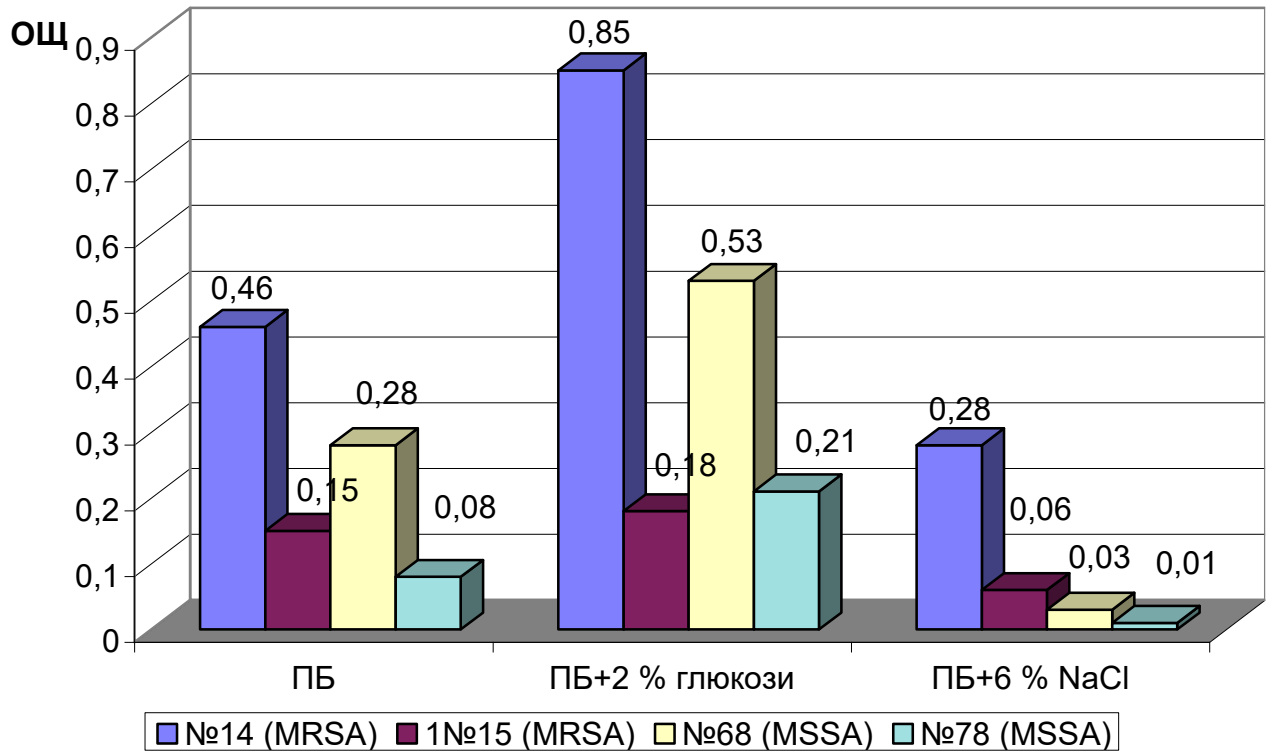


Рисунок 4 – Оптична щільність стафілококових біоплівки, утворених в поживних середовищах з різними добавками

Таким чином, оптимальними умовами для отримання стафілококових біоплівки ми вважаємо: культивування 24-48 годин при +35 °C, використання поживного бульйону з об'ємною часткою глюкози 2 %. Вимірювання ОЩ отриманих біоплівки на рідері слід проводити при довжині хвилі 630 нм.

Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Methicillin-Susceptible Staphylococcus Aureus (MSSA) Даним методом вивчено біоплівкоутворюючі властивості 36 вилучених від позалікарняних хворих метицилінорезистентних (MRSA) (n=16) та метициліночутливих (MSSA) (n=20) штамів стафілококу.

Визначено, що із 16 MRSA (12,5 %) мали високу здатність до біоплівкоутворення (ОЩ 0,25-0,4 ОД), 3 штами (18,75 %) – середню (ОЩ 0,12-0,24 ОД), (43,75 %) – виявили слабку здатність до утворення біоплівки (ОЩ < 0,12 ОД), (25,0 %) – біоплівки не утворювали взагалі (достовірної різниці у порівнянні з контрольною лункою не виявлено) (рис. 5).

MSSA штами також мали різну здатність до біоплівкоутворення. 30,0 % штамів було віднесено до небіоплівкоутворюючих, 40,0 % - до штамів зі слабкою здатністю до біоплівкоутворення, 20,0 % - з середніми показниками ОЩ, 10,0 % володіли високою біоплівкоутворюючою активністю.

Статистична оцінка достовірності різниці між долями штамів з високою, середньою, слабкою

та відсутністю здатності до біоплівкоутворення між MRSA та MSSA штамми з використанням критерію Пірсона не виявила. Критичне значення χ^2 при рівні значущості $p=0.05$ і числі ступенів свободи 3 дорівнює 7,815. Одержане значення критерію χ^2 (0,852) менше за критичне значення, тобто зв'язок поміж факторною (чутливість штамів до метициліну) і результативною (здатність до біоплівкоутворення) ознаками відсутній.

Безумовно, дане твердження не є безальтернативним і потребує подальшого більш глибокого вивчення. Важливим моментом при цьому повинно бути генетичне підтвердження метицилінорезистентності штамів та застосування інших параметрів постановки експериментів. Для підтвердження факту формування біоплівки і оцінки інтенсивності даного процесу застосовують засоби, направлені на виявлення двох обов'язкових атрибутів – бактеріальних клітин і позаклітинного біоплівкового матриксу [17].

В якості таких способів успішно застосовуються лазерна скануюча конфокальна мікроскопія (з попередньою вітальною окраскою біоплівкових стафілококів) і скануюча електронна мікроскопія.

Однак, застосований і удосконалений метод планшетного визначення здатності штамів до біоплівкоутворення є найбільш доступним і достатньо інформативним на початкових етапах відбору штамів

стафілококу для подальшого вивчення впливу на цей процес різних біоцидів.

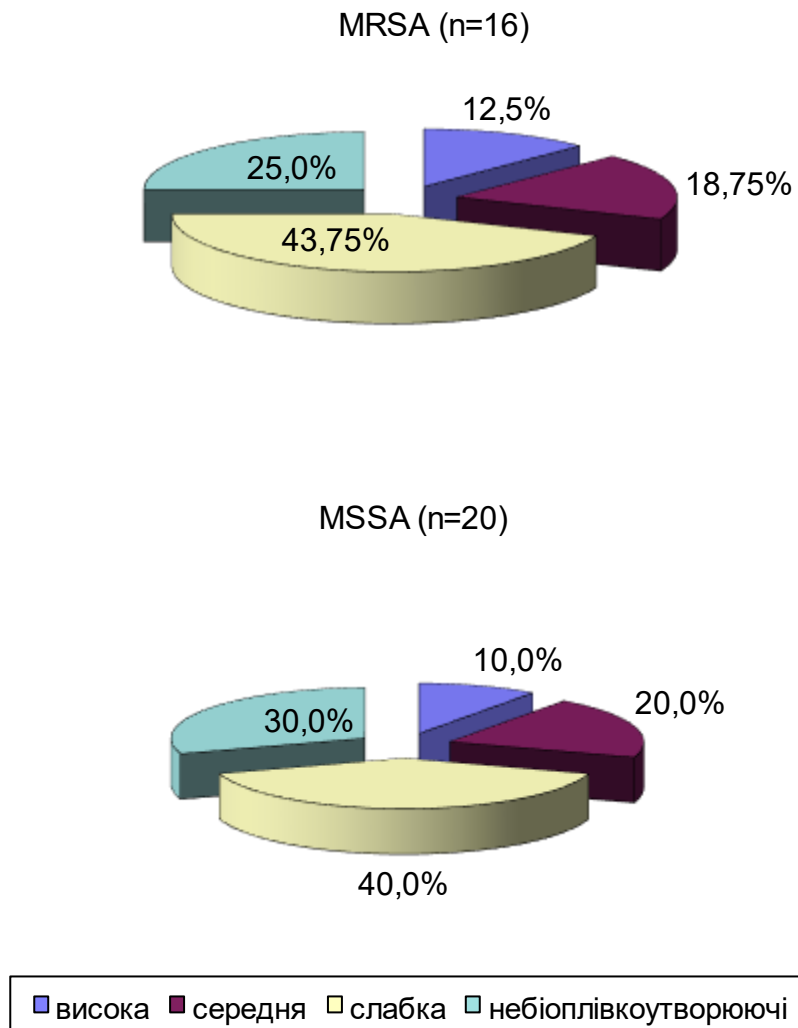


Рисунок 5 – Питома вага MRSA та MSSA штамів стафілококу з різною здатністю до біоплівкоутворення

Висновки

1. Оптимальними параметрами експериментального визначення здатності до біоплівкоутворення штамми стафілококу є: використання поживного бульйону з об'ємною частиною 2 % глюкози, інкубація планшетів протягом 24-48 годин при +35 °C, за умови вимірювання оптичної щільності (ОЩ) отриманих біоплівки при довжині хвилі 630 нм та використанні барвника генціан-фіолетового.
2. Експериментальне підтвердження високої здатності до біоплівкоутворення досліджених штамів стафілококів мало місце у 10 % MSSA та 12,5 % - MRSA штамів стафілококу. 30,0 – 25,0 (%) штамів, відповідно, було віднесено до небіоплівкоутворюючих, решту – до культур зі слабкою або середньою активністю.
3. В результаті порівняльного вивчення здатності до біоплівкоутворення циркулюючих позалікарняних штамів стафілококу достовірної різниці між MRSA з фенотиповою метицилінорезистентністю та MSSA штамми не виявлено ($p=0,05$).

References

1. Bukharin, O. V. The effect on biofilm formation of microorganisms [Text] / O.V. Bukharin, L.N. Churkin [et al.] // Journal of Microbiology Epidemiology and immunobiology. - 2012. - № 2 - pp 8-12
2. Seregina, N. V. Overview of the biophysical characteristics of microbial adhesion [Text] / NV Seregina [et al.] // Bulletin of new medical technologies. - 2008. - № XV (3). - P. 175-177.
3. Zubareva, I. V. About adhesin gram-positive cocci [Text] / IV Zubareva, TF Bernstein, SD Fedyanin // Bulletin of VSMU. - 2010. - Volume 9 №1. - P. 1-15.
4. Mayansky, AN Staphylococcal biofilms: structure, regulation, rejection [Text] / AN Mayansky, IV Chebotar // Journal of Microbiology Epidemiology and immunobiology. - 2011. - № 1 - P. 101-108
5. Cherniavsky, VI Bacterial biofilms and infections (lecture) [electronic resource] / V. Cherniavsky // Annals of Mechnikov Institute.-2013.-№ 1.- P. 86-90.
6. Guidelines for the use of standardized microbiological (bacteriological) methods in clinical diagnostic laboratories [Text] / Appendix № 1 to the Order of the Ministry of Health of the USSR № 535 of April 22, 1985 - 45 с.

7. Order of the Ministry of Health of Ukraine № 167 On approval of guidelines "Determination of sensitivity of microorganisms to antibiotics"[electronic resource] / Ministry of Health. - Access mode: <http://mozdocs.kiev.ua/view.php?id=3850>
8. Christensen, G. D. Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices [Text] / G. D. Christensen, W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M. Melton, E. H. Beachey // Journal of clinical microbiology. - 1985. - Vol. 22. - № 6. - P. 996-1006
9. Beloborodov, N. V. Microbial biofilm [electronic resource] / Beloborodov NV, Bayramov T. I. Access mode: <http://dental-hygiene.ru/index.php>
10. Ljamin, A. V. Methods for detection of biofilms in medicine: opportunities and prospects [Text] / AV Ljamin, EA Botkin, AV Zhestkov // Clinical Microbiology Antimicrobial Chemotherapy. - 2012. - № 14 (1). - P. 17-22.
11. Lapach, S. N. Statistical methods in biomedical research using Excel [Text] / SM Lapach, AV Chubenko, PN Babich. - K., "MORION", 2001 - 408 p.
12. Glantz, S. Biomedical Statistics [Text] / translated from English. - M: Practice, 1998.- 459 p.
13. Walid F Elkhatib. Evaluation of Different Microtiter Plate-Based Methods for the Quantitative Assessment of Staphylococcus aureus Biofilms [Электронный ресурс] / Walid F Elkhatib, Ahmed S Khairalla, Hossam M Ashour // Future Microbiol. - 2014. - № 9 (6). - C. 725-735. Режим доступа : www.futuremedicine.com
14. O'Gara, J. P. Ica and beyond: biofilm mechanisms and regulation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus [Text] / JP. O'Gara // FEMS Microbiol Lett. - 2007. - № 270 (2). - P. 179-188.
15. Polishchuk, A. I. Methodological approaches to in vitro ability to form biofilm microorganisms species Pseudomonas aeruginosa [Text] / AI Polishchuk, OV Pokas // Laboratory diagnostics. - 2009. - № 3 (49). - P. 30-34
16. Khmel, I. A. "Biofilms of bacteria and related problems of medical practice" (review) 7,8,9 [electronic resource] / Access mode: www.img.ras.ru/files/PUBLIC/Add_mat/Biofilms.doc
17. Chebotar, I. V. Staphylococcus aureus biofilms: structural and functional characteristics and relationships with neutrophils [Text] dissertation of the MD, Nizhny Novgorod, 2014.

UDC 615.28:579.861.2:579.61:616-078

EXPERIMENTAL STUDY OF BIOFILM-FORMING ABILITY TO METHICILLIN-RESISTANT AND METHICILLIN-SUSCEPTIBLE STAPHYLOCOCCUS STRAINS.

Voronkina I.A., Derkach S.A., Krilova I.A., Gabysheva L.S.,

In medicine there are many methods for studying of formation of biofilms. Cultivation in dynamic systems allows to create the conditions as much as possible close to that exist in the macroorganism. The majority of experimental methods are based on building of static

culture conditions of microorganisms, most often for this purpose use 96-well plastic microplates in various modifications. Using microplates even one manufacturer leads to different results of the study, which is due to physical and chemical characteristics. In addition, the formation of biofilms using this method affects the composition of culture media (micronutrient and electrolyte) and aeration degree. To quantify biofilm formation in microplates researchers use the various wavelengths of the photometer: 450 nm, 540 nm, 562 nm, 630 nm, 650 nm, etc. Thus, this method is quite common, but its basic lack is that there are no standards that would allow it to unify all laboratories. The aim of this study was to optimize the test parameters to detect the ability of film formation MRSA and MSSA strains. **Materials and methods.** We used staphylococcus strains: *S.aureus* ATCC 25923, strains from the laboratory of the museum with a certain in previous studies of methicillin-sensitive and recently received *S.aureus* strains from patients with purulent-inflammatory diseases of different localization. Defining the properties of a biofilm forming staphylococcus culture plates was performed by D. Christensen. **Results and discussion.** In this experiment nutrient broth (HiMedia, India) was used with different volume fractions ingredients: 2 % glucose, 6 and 7 % NaCl. Microplates were incubated 4, 24, 48 and 72 hours at 35 °C. Optical density of formed biofilm evaluated by the color intensity of spirit on a photometer (StatFax 303 Plus). This method was studied biofilm-forming properties of staphylococcus obtained from all 36 patients with community-acquired methicillin-resistant (MRSA) (n = 16) and methicillin-susceptible (MSSA) (n = 20) strains. It is defined that from 16 strains MRSA of 12,5 % had high ability to biofilms formation of (OD 0,25-0,4 units), 3 strains of 18,75 % - an average (OD 0,12-0, 24 units), - have found 43,75 % weak ability to formation of biofilms (OD <0,12 units), 25,0 % - a biofilm did not create in general (an authentic difference in comparison with the control well it is not revealed). It was defined that among 16 strains of MRSA 12.5 % had a high ability to form biofilms (OD 0,25-0,4 units.), 18.75 % - average (OD 0,12-0, 24 units), 43.75 % - found weak ability to form biofilms (OD <0.12 units.) and 25.0% - do not create biofilm (significant difference compared with control wells not detected). MSSA strains also differ in their ability to form biofilms. 30.0 % of the isolates were referred to the fact that not form a biofilm, 40.0 % - to strains with weak ability to form a biofilm, 20.0 % - with the average, 10.0 % are highly active biofilm formation. **Conclusions. 1.** The optimal parameters for the experimental determination of the ability of biofilm formation of staphylococcus strains are: use of nutrient broth with the bulk part of the 2 % glucose, incubating the plates for 24-48 hours at 35 °C. The measurement of the optical density (OD) of the resulting biofilms should be performed at wavelength of 630nm. 2. Experimental confirmation of a high ability to form biofilm in the studied strains of staphylococci occurred in 10.0 % MSSA and 12.5 % - MRSA. 25.0 - 30.0 % of the strains were classified as not forming a biofilm, and the rest - to the cultures with weak or medium activity. 3. As a result of a comparative study of the ability to form biofilms of

circulating strains of community-acquired staphylococcus significant difference between MRSA with methicillin-resistant phenotype and MSSA strains not detected ($\chi^2 > 0.05$).

Key words: staphylococcus, biofilm, the method of biofilm formation.