

10. Чугрів А.М. Макрооцінка діяльності регіональних служб крові України / А.М. Чугрів // Україна. Здоров'я нації. – 2017. – № 3. – С. 292–297. – Режим доступу: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Uzn\\_2017\\_3\\_51](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Uzn_2017_3_51).

Надійшла 17.10.2017 року.

УДК 576.8.06+616-08-06

## ВИЗНАЧЕННЯ РОЗМІРУ ТА ПЛОЩІ БІОПЛІВКИ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ У КЛІНІЧНІЙ ПРАКТИЦІ

А.П. Рибальська, Л.М. Немировська, О.І. Газя,  
О.А. Мельник Н.К. Скачкова

ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України», Київ

**Резюме. Мета.** Розробити доступний для виконання у практичних бактеріологічних лабораторіях, у тому числі й регіональних, метод визначення розміру та площі біоплівки клінічних штамів мікроорганізмів.

**Матеріали та методи.** Об'єкт дослідження – клінічні штами мікроорганізмів роду *Staphylococcus* (22) та дріжджоподібних грибів роду *Candida* (13), що ізольовані від хворих на гостру та хронічну лейкемію. Здатність до біоплівкоутворення досліджували за методом O'Toole G.A. et al у власній модифікації.

**Результати.** Представлено дослідження щодо оцінки біоплівкоутворення клінічних штамів мікроорганізмів за розміром біоплівки (%) та/або за площею (см<sup>2</sup>), що дозволяє швидко оцінити інфекційний потенціал чинників. Показано, що 90% досліджених штамів стафілококів мають високий рівень біоплівкоутворення, у тому числі, штами *S. epidermidis* і *S. saprophyticus*, що часто присутні у складі мікробіоценозу біотопів людини. Серед дріжджоподібних грибів роду *Candida* за високим рівнем біоплівкоутворення визначено *C. kefyr*, *C. albicans*; середнім – *C. glabrata*, *C. krusei*.

**Висновки.** Метод дає змогу виміряти розмір (%) та площу біоплівки (см<sup>2</sup>), що її утворюють клінічно значущі мікроорганізми. Використання методу у клінічній практиці дасть змогу поліпшити терапію основного захворювання за рахунок скорочення витрат, що пов'язані з лікуванням хворих з інфекційно-запальними ускладненнями та, в умовах відсутності високоартісного обладнання, оцінити патогенний потенціал збудників інфекційно-запальних процесів.

**Ключові слова:** хворі на лейкемію з інфекційно-запальними ускладненнями, мікроорганізми, біоплівкоутворення.

## DETERMINATION OF SIZE AND PLANTS OF BIOFILMS MYCROORGANISM PATTERNS IN CLINICAL PRACTICE

A. Rybalskaya, L. Nemyrovskaya, O. Gaziya, O. Melnyk, N. Skachkova

SI «Institute of Hematology and Transfusiology of NAMS of Ukraine», Kyiv

**Resume. Aim.** It is affordable to implement in practical bacteriological laboratories, including regional ones, a method for determining the size (%) and area ( $sm^2$ ) of the biofilm of clinical strains of microorganisms.

**Materials and methods.** The object of the study – clinical strains of microorganisms of the genus *Staphylococcus* (22) and yeast-like fungi of the genus *Candida* (13), isolated from patients with acute and chronic leukemia. The ability to biofilm formation was investigated by the O'Toole G.A. et al method in our modification.

**Results.** The method of evaluation of biotechnology formation of clinical strains of microorganisms according to the size of biofilm (%) and / or area ( $sm^2$ ) is presented, which allows to quickly evaluate the infectious potential of factors. It has been shown that 90% of the staphylococcus strains studied have high levels of biofilm formation, including strains *S. epidermidis* and *S. saprophyticus*, which are often present in the microbiocenose of human biotope. Among the yeast-like fungi of the genus *Candida*, with high levels of biofilm formation, *C. kefir*, *C. albicans*; medium – *C. glabrata*, *C. krusei*.

**Conclusions.** The method makes it possible to measure the size (%) and the area ( $sm^2$ ) of the biofilm, which form clinically significant microorganisms. The use of the method in clinical practice will improve the treatment of the underlying disease by reducing the costs associated with the treatment of patients with infectious and inflammatory complications and, in the absence of expensive equipment, to assess the pathogenic potential of pathogens infectious and inflammatory processes.

**Key words:** patients with leukemia with infectious and inflammatory complications, microorganisms, biofilm formation.

**Вступ.** Актуальність дослідження обумовлена необхідністю визначення здатності умовно патогенних бактерій до біоплівкоутворення як прогностично несприятливого фактора щодо ускладненого перебігу інфекційно-запальних процесів у пацієнтів з різними захворюваннями. Це є проблемою сучасної клінічної медицини і, зокрема, онкогематології. Не потребує доказів теза, що успіх лікування хворих з інфекційно-запальними ускладненнями різної локалізації залежить від своєчасної та адекватної діагностики чинників. Важливу роль у цьому процесі відіграють мікробіологічні дослідження, що спрямовані на визначення бактеріального спектра збудників, їх властивостей, особливо тих, що сприяють розвитку інфекційних процесів. Однією з таких негативних бактеріальних ознак є утворення біоплівки патогенними штамами мікроорганізмів. Відомо, що переважна кількість бактеріальних культур здатна формувати біоплівки в

умовах відповідних біотопів їх існування. Дослідження патогенезу різних захворювань свідчать про наявність майже 80% інфекційних ускладнень, обумовлених мікроорганізмами, що здатні утворювати біоплівку.

Впровадження сучасних технологій, зокрема, таких методів інтенсивної терапії як штучна вентиляція легень, сприяє виживанню тяжкохворих пацієнтів. Однак, довготривале застосування даних методів підвищує ризики інфікування органів дихальної системи госпітальними штамами умовно патогенних культур. Це є значною проблемою, оскільки екзогенним джерелом інфікування легень може стати контаміноване повітря або виробі медичного призначення, що контактують зі слизовою оболонкою дихальних шляхів (ендотрахеальні трубки, катетери тощо), на внутрішній поверхні яких може утворюватися бактеріальна біоплівка, яка виконує роль постійного джерела інфекції [10].

Біоплівки – це високо впорядковані угруповання мікроорганізмів, що розташовані в матриці синтезованих ними позаклітинних полімерних речовин та формуються на біологічних або штучних поверхнях завдяки адгезії й розмноженню. В біоплівках бактерії об'єднані складними міжклітинними зв'язками, мають високу резистентність до зовнішніх негативних чинників, що надає їм високого рівня виживаності та стійкості до дії дезінфікуючих речовин, антибактеріальних препаратів, бактеріофагів. Біоплівкоутворення вважається одним із факторів патогенності мікроорганізмів [1, 2, 3, 5, 11].

У науковій літературі наведено різні методи вивчення біоплівок (*in vitro*, *in vivo*). Більшість методів культивування біоплівок розроблялися з науковою метою для підтвердження їх існування та виявлення їхнього значення саме у патогенезі інфекційних захворювань. Це й динамічні методи, що максимально наближені до умов існування живих систем, і статичні – з використанням 96-лункових пластикових планшетів. Проте всі ці методи або потребують значних фінансових витрат, або не уніфіковані для застосування у практичних лабораторіях [4, 6, 7, 8].

**Мета.** Розробити метод визначення розміру та площі біоплівки клінічних штамів мікроорганізмів, що є доступним для виконання у практичних бактеріологічних лабораторіях, у тому числі й регіональних.

**Матеріали та методи дослідження.** Об'єктом дослідження були клінічні штами мікроорганізмів роду *Staphylococcus* (n=22): *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* та дріжджоподібних грибів роду *Candida* (n=13): *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. kefyr*, що були ізольовані з біотопів хворих на гостру і хронічну лейкемію. Контролем слугували музейні штами – *S. aureus* 209P, *S. aureus* ATCC 25923, *C. albicans* ATCC 885-653. Здатність до біоплівкоутворення досліджували за методом O'Toole G. A. et al у власній модифікації [12].

Досліджено здатність наведених культур утворювати біоплівку, здійснено підбір фарбників та їх оптимальної концентрації для фарбування біоплівки відповідних груп мікроорганізмів (рис. 1, 2).

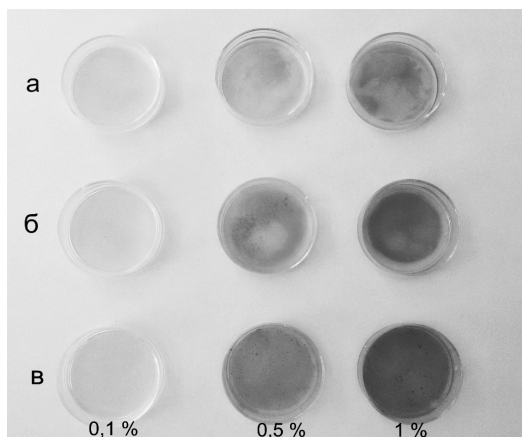


Рис. 1. Забарвлення біоплівок, що утворюють мікроорганізми роду *Staphylococcus* (штами: а – 481/4; б – 495/8; в – 490/1), за різних концентрацій фуксину Циля (0,1%; 0,5%; 1,0%).

Мікроорганізми культивували на відповідних для різних родів рідких поживних середовищах: цукровий бульйон – для стафілококів, бульйон Сабуро – для дріжджоподібних грибів. Носієм біоплівки були стерильні одноразові полістиролові чашки Петрі (d=40 мм).

Для цього 0,1 мл 18–24-годинної суспензії мікробних культур вносили у полістиролову одноразову чашку Петрі, що містила 2,5 мл відповідного поживного субстрату, інкубували 18–24 години: за температури 37°C – бактеріальні культури, за 25°C – дріжджоподібні гриби, після чого видаляли планктонні мікроорганізми, а біоплівки, що сформувалися, фарбували, використовуючи 0,5% розчин фуксину Циля для бактеріальних культур, 0,01% метиленової сині – для дріжджів. Експонували 30 хвилин за відповідної температури, зайвий барвник видаляли, чашки підсушували. Розмір біоплівки (%) визначали за допомогою пластикового шаблону, який підкладали під зворотну поверхню чашки. Діаметр шаблону відповідає діаметру чашки Петрі та має вигляд пластикового кола, що розподілено на чотири однакових (по 25%) сектора (рис. 3). Шаблон для вимірів може бути виготовлений дослідником самостійно із пластику або іншого матеріалу, який підлягає знезараженню.

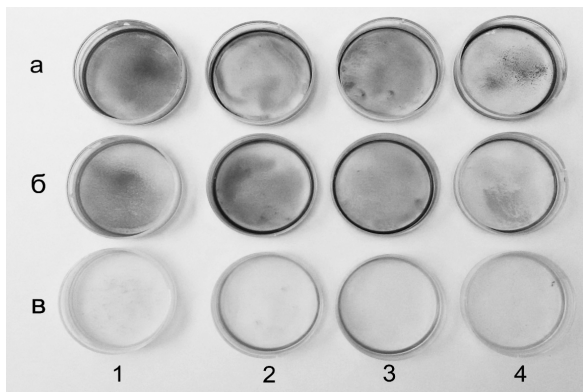


Рис. 2. Забарвлення біоплівки, що утворюють дріжджоподібні гриби роду *Candida* (штами: 1 – 467/1; 2 – 481/10; 3 – 473/4, 4 – *C. albicans* ATCC № 885-653) за різних концентрацій метиленового синього (а – 0,05%; б – 0,01%), в – 0,5% розчині фуксину Ціля.

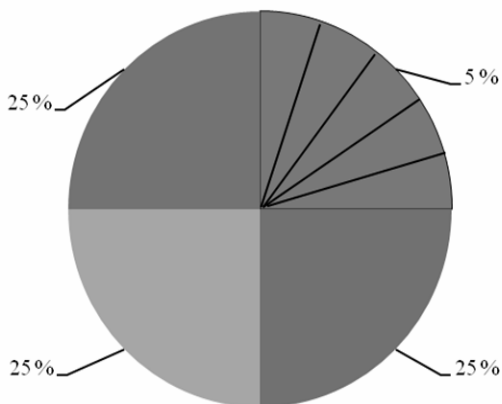


Рис. 3. Шаблон для виміру розміру біоплівки ( $d = 40$  мм).

**Результати та їх обговорення.** Результати оцінювали за розробленою шкалою: здатність до біоплівкоутворення вважали високою, якщо біоплівка мала розмір (100–75%); середньою – (74–50%); низькою – (<50–25%). Здатність до формування біоплівки вважали недостатньою, якщо окремі конгломерати займали менше, ніж 25% агарової поверхні чашки Петрі.

Площу біоплівки обчислювали за формулою:  $S=\pi r^2$  (см<sup>2</sup>), виходячи з того, що максимальна площа біоплівки усієї поверхні чашки Петрі (d=40 мм) складає, відповідно:  $S=\pi r^2 =3,14 \cdot 2^2=12,56$  см<sup>2</sup>.

Оцінювати здатність мікроорганізмів до біоплівкоутворення можливо як за одним, так і за двома параметрами: або розмір (%), або площа (см<sup>2</sup>), що однаково дає уяву про патогенні властивості клінічних штамів. Результати дослідження наведено у таблицях 1, 2.

Таблиця 1 – Біоплівкоутворення клінічних штамів роду *Staphylococcus*

№ з/п	Під <i>Staphylococcus</i>	Біоплівка		Рівень біоплівкоутворення
		розмір, %	площа, см <sup>2</sup>	
1.	<i>S. aureus</i> 514/1	70	8,79	Середній
2.	<i>S. epidermidis</i> 495/8	95	11,93	Високий
3.	<i>S. epidermidis</i> 481/4	90	11,30	Високий
4.	<i>S. epidermidis</i> 512/1	80	10,05	Високий
5.	<i>S. epidermidis</i> 489/3	80	10,05	Високий
6.	<i>S. saprophyticus</i> 490/1	95	11,93	Високий
7.	<i>Staphylococcus</i> sp. 509/4	80	10,05	Високий
8.	<i>Staphylococcus</i> sp. 509/3	80	10,05	Високий
9.	<i>S. aureus</i> 209 P	80	10,05	Високий
10.	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	80	10,05	Високий

Показано, що 90% досліджених штамів стафілококів, у тому числі як ті, що ізолювані від хворих на лейкемію, так і музейні культури, мають високий рівень біоплівкоутворення (розмір плівки 80–95%; площа 10,05–11,93 см<sup>2</sup>). Слід звернути на увагу, що на фоні патогенного виду *S. aureus* 514/1 з середнім рівнем формування біоплівки (розмір 70%; площа 8,79 см<sup>2</sup>), чільне місце посіли штами *S. epidermidis* і *S. saprophyticus* – види, що вважаються сапрофітами та присутні у складі нормоценозу на шкірі, у біотопах верхніх дихальних шляхів людини. Цілоком можливо, що високий рівень біоплівкоутворення таких штамів може сприяти розвитку інфекційно-запальних ускладнень у хворих на лейкемію, особливо на тлі хіміотерапії та вторинного імунодефіциту.

Цікавим є той факт, що серед дріжджоподібних грибів роду *Candida* на першому місці за високим рівнем біоплівкоутворення (розмір 100%; площа 12,56 см<sup>2</sup>) опинився вид кефірного грибка *C. kefyr* 481/10. Цей вид дріжджів зазвичай використовують для виробництва кисломолочних продуктів і, можливо, саме ця ознака є необхідною, щоб надати продукту якості функціонального харчування. Переважна кількість штамів дріжджоподібних грибів *C. albicans* (5) показали високий рівень біоплів-

коутворення (розмір 80,0–87,5%; площа 10,05–10,99 см<sup>2</sup>), тільки один штамп цього виду – середній (відповідно, 68%; 8,54 см<sup>2</sup>), так само як види *C. glabrata*, і *C. krusei* (відповідно, 70%; 8,79 см<sup>2</sup> і 60%; 7,56 см<sup>2</sup>).

Таблиця 2 – Біоплівкоутворення клінічних штамів дріжджів роду *Candida*

№ п/п	Рід <i>Candida</i>	Біоплівка		Рівень біоплівкоутворення
		розмір, %	площа, см <sup>2</sup>	
1.	<i>C. kefyr</i> 481/10	100	12,56	Високий
2.	<i>C. albicans</i> 477/9	87,5	10,99	Високий
3.	<i>C. albicans</i> 480/9	87,5	10,99	Високий
4.	<i>C. albicans</i> 467/1	85	10,68	Високий
5.	<i>C. albicans</i> 473/4	80	10,05	Високий
6.	<i>C. albicans</i> 492/6	80	10,05	Високий
7.	<i>C. krusei</i> 464/5	89	11,18	Високий
9.	<i>Candida</i> sp. 503/4	95	11,93	Високий
8.	<i>C. glabrata</i> 498/5	70	8,79	Середній
10.	<i>C. albicans</i> 478/11	68	8,54	Середній
11.	<i>C. krusei</i> 498/7	60	7,56	Середній
12.	<i>Candida</i> sp. 503/6	95	11,93	Середній
13.	<i>C. albicans</i> ATCC885-653	61	7,66	Середній

Таким чином, дані, що представлено, характеризують патогенні властивості клінічних штамів мікроорганізмів, які ізолюються з осередків інфекції у хворих на лейкемію і, вірогідно, сприяють розвитку інфекційно-запальних процесів та ускладненню терапії основного захворювання. Тому швидка оцінка патогенних властивостей клінічних культур має важливе значення.

### Висновок

Запропонований метод не враховує густину біоплівки, проте дає змогу виміряти її розмір (%) та обчислити площу (см<sup>2</sup>), швидко оцінити здатність до біоплівкоутворення клінічно значущих мікроорганізмів. Метод простий, доступний для виконання у регіональних лабораторіях, які не мають спеціального обладнання, дозволяє лікарям-гематологам адекватно оцінити патогенний потенціал клінічних штамів мікроорганізмів за здатністю формування біоплівки та скоригувати антиінфекційне лікування за рахунок дозування й тривалості терапії.

Результати дослідження, що представлено у статті, захищено патентом України [9].

## Література

1. Адгезивні властивості асоціації *Staphylococcus aureus* і *Candida albicans* / В.В. Мінухін, О.В. Кочнева, С.М. Граматюк, М.П. Сухомлин // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – Вип. 2 (100). – С. 89–91.

2. Гостев В.В. Бактериальные биопленки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2. – № 3. – С. 4–15.

3. Дезорганизация биопленок клинических штаммов стафилококков метаболитами лактобацилл / О.В. Рыбальченко, В.М. Бондаренко, О.Г. Орлова и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 6. – С. 66–70.

4. Лямин А.В. Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективы / А.В. Лямин, Е.А. Боткин, А.В. Жестков // Журнал клин. микробиол. антимикроб. терапия. – 2012. – Том 14. – № 1. – С. 17–22.

5. Особенности формирования микробных биопленок на различных субстратах. Возможность изучения биопленок на желчных конкрементах / Ю.С. Винник, Е.В. Серова, Р.И. Андреев и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 5. – С. 8.

6. Патент на корисну модель № 47944, Україна, МПК G 09B 23/00. Спосіб відтворення біоплівки мікроорганізмів / А.Я. Циганенко, М.М. Мішина, Р.А. Курбанов; заявник Харківський національний медичний університет; № заявки u200910353; заявл. 12.10.2009; опубл. 25.02.2010, Бюл. № 4.

7. Патент на корисну модель № 89508, Україна, МПК C12Q 1/24. Спосіб визначення кількості життєздатних мікроорганізмів у складі біоплівки / О.І. Балко, О.Б. Балко, Л.В. Авдеева; заявник Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України; № заявки u201312899; заявл. 06.11.2013; опубл. 25.04.2014, Бюл. № 8.

8. Патент на корисну модель № 89509, Україна, МПК C 12G1/24. Спосіб визначення інтенсивності біоплівкоутворення мікроорганізмів / О.І. Балко, О.Б. Балко, Л.В. Авдеева; заявник Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України; № заявки 201312900; заявл. 06.11.2013; опубл. 25.04.2014, Бюл. № 8.

9. Патент № 115970. Спосіб визначення розміру та площі біоплівки клінічних штамів мікроорганізмів / А.П. Рибальська, Л.М. Немировська, О.І. Газя, О.А. Мельник, Н.К. Скачкова; заявник та власник ДУ «Інститут гематології та трансфузіології НАМН України»; заявка № u 201606500; заявл. 14.06.2016; опубл. 10.05.2017, Бюл. № 9.

10. Трофіменко Ю.Ю. Біологічні властивості мікрофлори, що колонізує ендотрахеальні інкубаційні трубки у відділеннях інтенсивної терапії: Дис. ... канд. мед. наук. – 2015. – 127 с.

11. Lisa H Amir. The role of microorganisms (*Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*) in the pathogenesis of breast pain and infection in lactating women / Lisa H. Amir, Cullinane Meabh // *Pregnancy and Childbirth*. – 2011. – Vol. 10. – P. 1186.

12. O'Toole G. A. Biofilm formation microbial development / G.A. O'Toole, A.N. Kaplan, R. Kolter // *An. Rev. Microbiol.* – 2000. – № 4. – P. 49–76.

*Надійшла 10.10.2017 року.*