

В.М. Кондратюк, В.П. Ковальчук, І.М. Коваленко

ЧУТЛИВІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ ПЛІВКОУТВОРЮВАЛЬНОЇ МІКРОФЛОРИ ВОГНЕПАЛЬНИХ РАН

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова,
Військово-медичний клінічний центр Центрального Регіону

Натепер залишається неясним, чи існує прямий зв'язок між формуванням біологічної плівки і резистентністю до антибіотиків мікроорганізмів. У даному дослідженні ми прагнули вивчити взаємозв'язок між цими властивостями у клінічних ізолятів бактерій.

Мікроорганізми були виділені з вогнепальних поранень протягом 2014 р. Здатність до формування біоплівки визначали методом фарбування кристалічним фіолетовим. МБСК, МБЦК, мінімальну концентрацію, що приводить до ерадикації біоплівки (МЕБК), амікацину, цефтріаксону, цефоперазон/сульбактаму, ципрофлоксацину, меропенему, гатифлоксацину, левофлоксацину визначали методом серійних розведень.

Штами, що виявляли чутливість до антибіотиків у планктонній формі, показали високу стійкість при формуванні біоплівки. МЕБК антибіотиків для штамів, що сформували біоплівку, сягала понад 500 мгк/мл, що в сотні разів перевищує клінічно досяжні концентрації. Кореляційний зв'язок між стійкістю до антибіотиків і здатністю до біоплівкоутворення штамів *A. baumannii* був різнобічним: для меронему $r = -0,62$, для цефоперазону з клавулановою кислотою $r = +0,62$, для амікацину $r = +0,84$. Штами *P. aeruginosa* також виявили різноспрямований зв'язок між досліджуваними властивостями. Можна припустити, що формування біоплівки і стійкість до антибіотиків діють як окремі механізми, що забезпечують краще виживання бактерій, особливо ізолятів зі слабким рівнем резистентності до антибіотиків.

Ключові слова: бактерійні біоплівки, резистентність до антибіотиків, концентрація антибіотиків.

Біоплівка є скупченням мікроорганізмів, що огорнуті біополімерною матрицею, в якій мікробні клітини існують у складі функціонально різноманітного консорціуму. Біоплівковий спосіб існування є загальною властивістю для більшості мікроорганізмів у природних та медичних системах і захисним режимом збереження популяції в агресивному середовищі [1].

Стійкість до протимікробних засобів у біоплівкової форми бактерій значно перевищує таку у планктонних форм. Тому утворення біоплівок в інфекційному процесі ускладнює елімінацію збудників, обумовлює тенденцію до хронізації та рецидивного перебігу захворювання [2]. Зв'язок між здатністю до утворення біологічної плівки та стійкістю до антибіотиків становить значний інтерес для біомедичних досліджень. На сьогодні неясно, чи існує пряма залежність між утворенням біоплівки і стійкістю до антибіотиків. За останні два десятиліття численні дослідження не дали однозначних результатів. Наприклад, здатність до утворення біоплівки притаманна резистентним до антибіотиків ізолятам *P. aeruginosa*, однак такої залежності не підтверджено для *S. aureus* [3, 4]. Відрізнялись ці характеристики і для окремих штамів бактерій щодо різних антибіотиків [5].

Значну частину контамінантів сучасних бойових поранень складають полірезистентні до антибіотиків мікроорганізми, більшість з яких здатна існувати у біоплівковій формі. Мікробіологічні спостереження за процесом загоєння ран виявили здатність у мікробів колонізувати рани навіть у проліферативну фазу [6]. На фоні антибактерійної терапії, підбір якої проводиться на основі диско-дифузійного методу (ДДМ), досягти повної деконтамінації ранової поверхні не вдається.

Мета дослідження – встановити наявність взаємозв'язку між стійкістю до антибіотиків і здатністю утворювати біоплівку бактеріями, що виділяються з вогнепальних ран.

Матеріали і методи

Серед ізолятів, що отримані з бойових поранень кінцівок у 2014 р., були відібрані штами, які за результатами диско-дифузійного методу [7] виявилися чутливими або помірно чутливими до антибіотиків, що отримували поранені в процесі лікування. Цій умові відповідало 9 штамів *A. baumannii*, 2 штами *P. aeruginosa*, по одному штаму *S. epidermidis* та *Enterobacter cloacae ssp cloacae*. В дослідженні використані такі антибіотики: амікацин (АМЦ), цефтріаксон (ЦФТ), ципрофлоксацин (ЦФЦ), меронем

(МРН), гатифлоксацин (ГФЦ), левофлоксацин (ЛФЦ), цефалерзон/сульбактам (ГЦФ/СУЛ).

Здатність досліджуваних штамів до утворення біоплівки визначали у 96-лунковому планшеті з подальшим фарбуванням кристальовіолетом та визначенням оптичної щільності (OD) на апараті Humanreader (Німеччина) при довжині хвилі 620 нм. OD для кожного штаму визначали у трьох повторах, результати усереднювали. Штам вважався позитивним щодо плівкоутворення, якщо його середнє значення OD було більшим, ніж середня оптична щільність негативного контролю, на три стандартних відхилення (SD): (OD негативного контролю + (3×SD негативного контролю)). OD негативного контролю розраховувалось для кожного планшета окремо. Інтенсивність плівкоутворення оцінювали за величиною відносного показника оптичної щільності [8].

Мінімальну бактеріостатичну (МБСК) та мінімальну бактерицидну (МБЦК) концентрації препаратів визначали за допомогою методу послідовних серійних розведень в рідкому поживному середовищі [7]. Мінімальну концентрацію, що призводить до ерадикації біоплівки (МЕБК), визначали по впливу послідовних серійних розведень антибіотика на тест-об'єкти з полівінілхлориду зі сформованою біоплівкою. Для формування зрілої біоплівки кільцеві тест-об'єкти з полівінілхлориду занурювали у м'ясопептонний бульйон (МПБ) з додаванням інокулюму досліджуваної культури у концентрації 10^6 КУО/мл та інкубували при 37 °С протягом 48 год. Формування біоплівки на тест-об'єктах в такий спосіб підтверджено мікроскопічним методом [9]. Після інкубування тест-об'єкт в стерильних умовах тричі відмивали фізіологічним розчином та переносили у пробірки з послідовними розведеннями антибіотика. Через 24 год перебування у розчині антибіотика тест-об'єкти вдруге промивали стерильним ізотонічним розчином хлориду натрію і переносили у пробірки із звичайним МПБ та інкубували при 37 °С. Про повну ерадикацію життєздатних мікроорганізмів з біоплівки на тест-об'єкті робили висновок по відсутності росту в МПБ через 24 год. Значення максимальної концентрації антибіотиків, що створюється в сироватці крові при введенні терапевтичних доз антибіотиків (C_{max}), отримані з джерел літератури [10].

Статистична обробка отриманих результатів проведена з використанням таблиць Excel Microsoft Office. Для визначення взаємозв'язку між резистентністю до антибіотиків і здатністю штамів *A. baumannii* утворювати біоплівку вираховували коефіцієнт кореляції.

Результати досліджень та їх обговорення

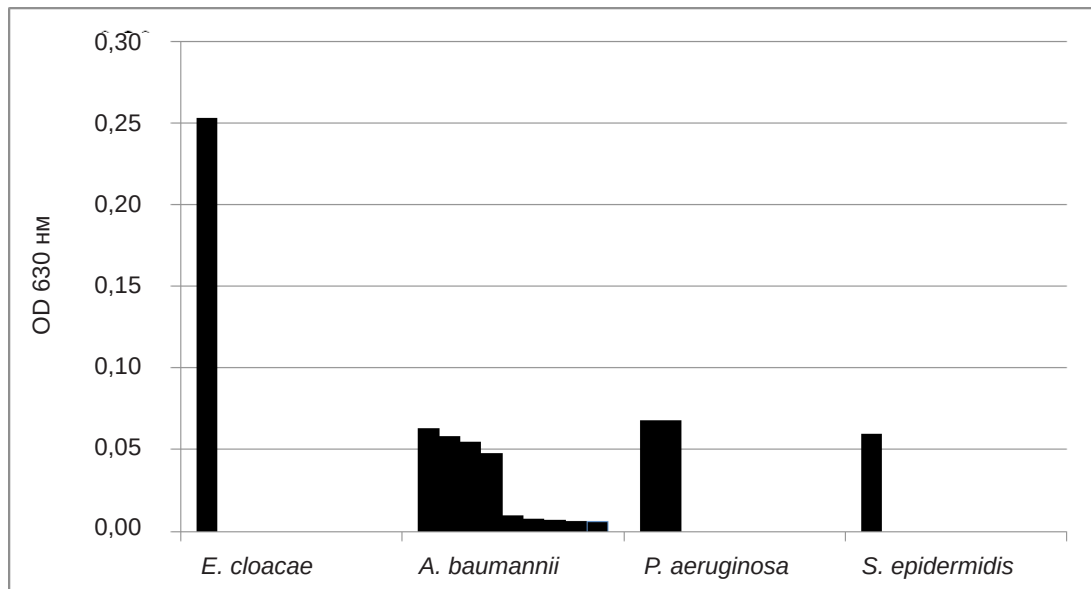
З числа досліджених мікроорганізмів найвищу плівкоутворювальну активність виявив штам *Enterobacter cloacae ssp cloacae* (мал. 1). Виділені штами *P. aeruginosa* та *S. epidermidis* також виявилися сильними біоплівко-

утворювачами. Штами *A. baumannii* за здатністю до плівкоутворення були неоднаковими. Три штами цього виду біоплівок практично не утворювали, у двох штамів здатність до плівкоутворення була виражена незначно. Решту (4 штами) акінетобактерій можна було віднести до сильних біоплівкоутворювачів, оскільки щільність утворених ними біоплівок близька до щільності біоплівок, утворених іншими видами бактерій.

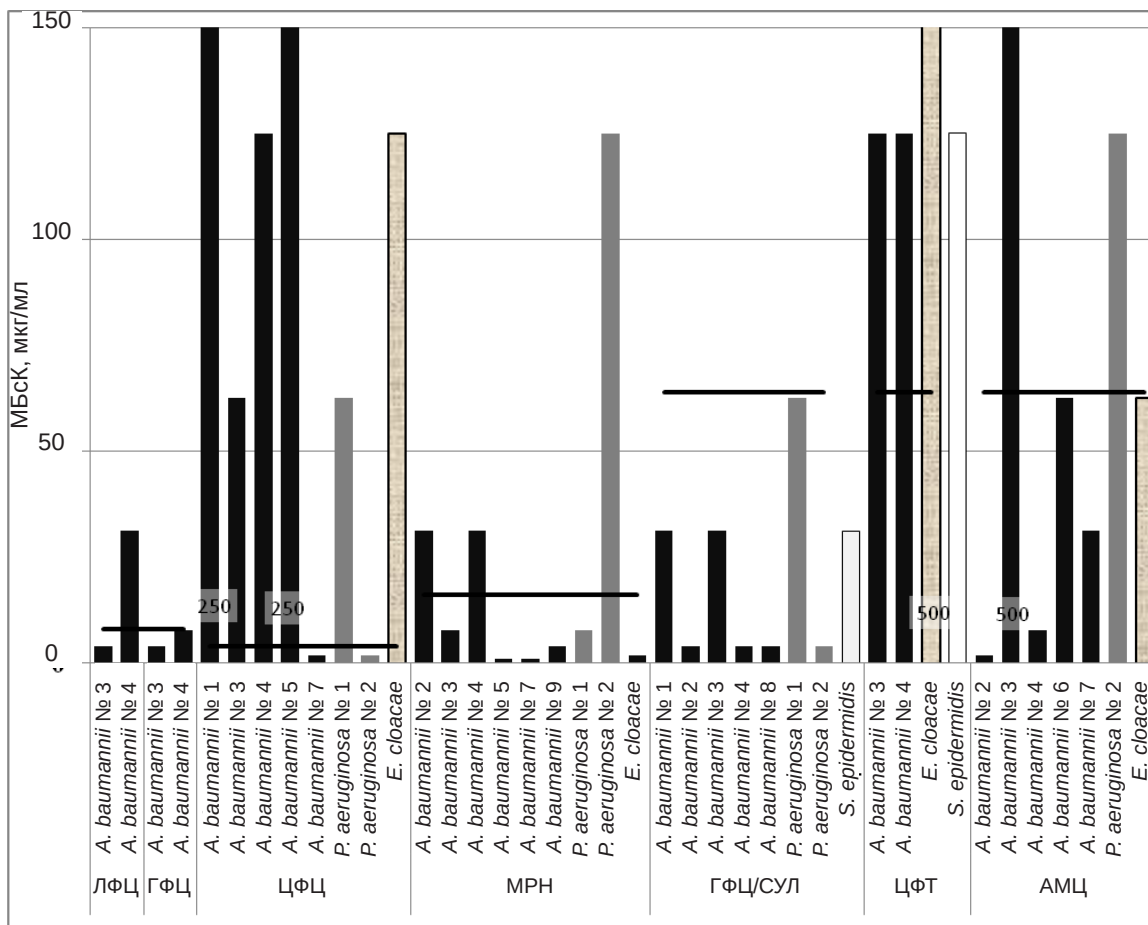
Як зазначалось вище, оскільки одним із завдань дослідження було визначення різниці в чутливості до антибіотиків планктонних і плівкових форм бактерій, то робота проводилась лише з тими штамми бактерій, планктонна форма яких виявляла чутливість до препарату за результатами ДДМ. Однак в процесі кількісної оцінки рівня чутливості виявилось, що МБСК всіх досліджених антибіотиків для планктонних форм досліджених штамів бактерій коливається у дуже широкому діапазоні (мал. 2). У кількох випадках штами, що за даними ДДМ визначались як помірно чутливі або чутливі до певного антибіотика, за результатами визначення МБСК згідно з критеріями 167 Наказу МОЗ України, повинні бути віднесені до категорії стійких. Проте це не заважало зіставленню рівня резистентності та активності біоплівкоутворення для кожного із досліджених штамів.

На малюнку 3 проілюстровано зв'язок між двома властивостями *A. baumannii*, а саме: здатності до утворення щільної біоплівки та властивості протистояти згубному впливу антибіотиків. При цьому слід враховувати, що на діаграму винесені показники тільки тих штамів акінетобактерій, які у планктонній формі виявляли чутливість до обраних для аналізу антибіотиків. Діаграма ілюструє тенденцію вищої чутливості до антибіотиків у варіантів акінетобактерій, що не здатні до плівкоутворення. Штами, що не утворювали біоплівку, мали високу чутливість до амікацину (МБСК = 1,8–3,9 мкг/мл), активні плівкоутворювачі – дещо нижчу (МБСК = 32,3–62,5 мкг/мл). Однак для інших антибіотиків подібної закономірності не спостерігалось. Так, високочутливий до ципрофлоксацину штам акінетобактерій (МБСК = 1,8 мкг/мл) виявився сильним біоплівкоутворювачем (OD = 0,06). Інший резистентний до ципрофлоксацину штам, МБСК для якого була більшою 60 мкг/мл, здатності до плівкоутворення не виявляв (OD < 0,01).

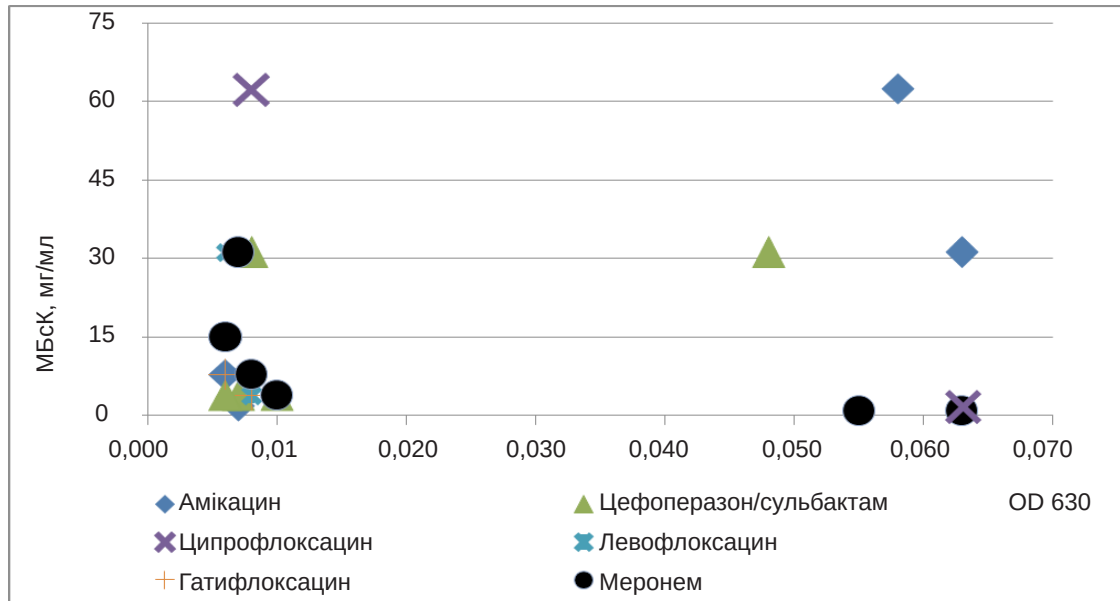
Не вдалося виявити чіткої залежності між біоплівкоутворенням та стійкістю до меропенему. Високочутливі до меропенему акінетобактерії виявлялись як серед штамів, що інтенсивно утворювали біоплівку, так і серед тих варіантів, які не здатні до плівкоутворення. До цефалерзону/сульбактаму високий рівень чутливості (МБСК = 3,9 мкг/мл) виявили два штами, що не утворювали біоплівок. Однак з числа двох інших штамів з однаковою чутливістю до цього антибіотика



Мал. 1. Характеристика здатності до біоплівкоутворення досліджених штамів бактерій.



Мал. 2. Результати визначення чутливості до антибіотиків планктонних форм мікроорганізмів. Чорні горизонтальні лінії вказують МБСК антибіотиків, за межами якої мікроорганізми визнаються резистентними [7].



Мал. 3. Характеристика взаємозв'язку між чутливістю до антибіотиків і здатністю штамів *A. baumannii* утворювати біоплівку.

(МБСК = 32,3 мкг/мл) один не виявив здатності до плівкоутворення, інший – був сильним плівкоутворювачем (OD = 0,048).

Кореляційний зв'язок між здатністю до утворення біоплівки акінетобактеріями та стійкістю до певного антибіотика виявляв іноді пряму, а іноді й зворотну залежність. До меропенему він виявився середнім негативним ($r = -0,62$), до цефоперазону із сульбактамом – середнім позитивним ($r = +0,62$), до амікацину – сильним позитивним ($r = +0,84$). До решти антибактерійних препаратів кореляційний зв'язок не визначали через невелику кількість штамів, що виявляли чутливість навіть у планктонній формі.

Аналогічно неоднорідним був взаємозв'язок між стійкістю до антибіотиків і здатністю до плівкоутворення в інших видів бактерій. З двох сильних біоплівкоутворювальних штамів *P. aeruginosa* один був стійким до цефоперазону із сульбактамом і ципрофлоксацину та чутливим до меропенему, інший штам мав протилежний профіль чутливості до тих самих антибіотиків.

Стандартом вивчення чутливості до антибактерійного препарату є визначення МБСК. Можливість існування бактерій у вигляді біоплівок у біотопах макроорганізму частково пояснює невдачі при проведенні антибактерійної терапії.

Більшість штамів, що колонізували рани, виявили чутливість до антибіотиків у планктонній формі. Але після утворення ними біоплівок, навіть кількасоткратне збільшення концентрації антибіотика не стерилізувало тест-об'єкти, МБСК сягала за межі стандартного ряду серійних розведень (табл. 1). Після 24 год перебування

у розчині антибіотика з концентрацією 500 мкг/мл спостерігалось проростання культур з тест-об'єкта.

З аналізу зв'язку між резистентністю та біоплівкоутворенням виходить, що ці властивості найімовірніше компенсують, а не доповнюють одна одну, забезпечуючи колонізаційну здатність і виживання бактерій в несприятливому середовищі. На користь цього припущення вказує факт посиленого біоплівкоутворення у чутливих штамів та відсутність або слабе вираження плівкоутворення серед резистентних штамів. Вочевидь, що ці дві фенотипові ознаки мають різні генетичні детермінанти. Негативний кореляційний зв'язок між цими ознаками виявлено і в інших географічних регіонах [11]. Безсумнівним лишається тільки факт колосального зростання стійкості бактерій до антибіотиків під захистом зрілої біоплівки.

Для прогнозування згубного впливу антибіотиків на бактерії, що існують у формі біоплівок, запропоновано визначати мінімальну концентрацію, що приводить до ерадикації біоплівки (МБСК). З'являються рекомендації використовувати саме цей показник для вибору антибіотика у лікуванні біоплівкових інфекцій [12]. Доцільність кількісного визначення цього показника для клінічної практики сумнівна. Встановлені результатами наших досліджень значення ефективних МБСК у межах кількох сотень мкг/мл перевищують C_{max} , а отже є клінічно недосяжними.

Наше дослідження має кілька обмежень. Включені для дослідження штами виділені від поранених, які тривалий час отримували антибактерійну терапію. За профілем антибактерійної чутливості всі штами віднесені винятково до полірезистентних. Тому неможливо

Результати визначення чутливості до антибіотиків у мікроорганізмів, що існують у формі біоплівки

Антибактерійний препарат (МЕБК та C_{max} у мкг/мл)		Штами досліджених мікроорганізмів			
		<i>A. baumannii</i> , n=9	<i>P. aeruginosa</i> , n=2	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>ssp. cloacae</i>	<i>S. epidermidis</i>
Амікацин	C_{max}	65			
	МЕБК	>1000	>500	>500	–
Цефтриаксон	C_{max}	76			
	МЕБК	>500	–	>1000	>500
Ципрофлоксацин	C_{max}	4,6			
	МЕБК	>500	–	>1000	–
Меронем	C_{max}	49			
	МЕБК	>500	>500	>500	–
Гатифлоксацин	C_{max}	4,2			
	МЕБК	>500	–	–	–
Левовфлоксацин	C_{max}	4,6			
	МЕБК	>500	–	–	–
Цефоперазон/сульбактам	C_{max}	430/83			
	МЕБК	>500	>500	–	>500

оцінити наявність кореляційного зв'язку між резистентністю до антибіотиків і здатністю до біоплівкоутворення серед штамів з іншим фенотипом. По-друге, біотопи, з яких отримані штами, з тих же причин колонізовані переважно стійкими мікроорганізмами з індукованою резистентністю. Тільки 13 штамів відповідали умовам дослідження. Вони виявляли чутливість до антибіотиків у планктонній формі, тому можливо було прослідкувати зміну бактерицидної концентрації антибіотиків при зміні форми існування. По-третє, ми не визначали остаточне кількісне значення МЕБК, оскільки воно виходить далеко за межі клінічно досяжних концентрацій. Встановлено лише його багатократне збільшення порівняно з МБСК для планктонної форми бактерій.

Висновки

1. Біоплівкоутворення та резистентність до антибіотиків виявляються у бактерій як окремі, не пов'язані між собою біологічні властивості, які забезпечують колонізаційну здатність бактерій.

2. Концентрації антибіотиків, що згубно діють на біоплівкові форми бактерій, у сотні разів перевищують бактериостатичні концентрації, встановлені для планктонних форм. Домінування плівкоутворювальних штамів бактерій у загальному спектрі ранових ізолятів пояснює невдачі антибактерійної терапії, оскільки клінічно досяжні концентрації антибіотиків у сотні разів

менші, ніж ті, що здатні згубно впливати на плівкові форми бактерій.

3. Для знищення бактерій, які у формі біоплівки колонізують медичні біотопи, перспективним виглядає пошук комбінації препаратів, які можуть чинити згубний вплив у клінічно досяжних концентраціях.

Література

- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences of biofilm dispersal. *Nat. Rev. Microbiol.*, 10, 39-50. doi:10.1038/nrmicro2695.
- Cerqueira, G. M., Peleg, A. Y. (2011). Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB Life*, 63, 1055-1060. doi:10.1002/iub.533.
- Abidi, S. H., Sherwani, S. K., Siddiqui, T. R., Bashir, A., Kazmi, S. U. (2013). Drug resistance profile and biofilm forming potential of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from contact lenses in Karachi–Pakistan. *BMC Ophthalmol*, 13, 57. doi:10.1186/1471-2415-13-57.
- Eyoh, A. B., Toukam, M., Atashil, J., Fokunang, C., Gonsu, H., Lyonga, E. E. ..., Assoumou, M. C. (2014). Relationship between multiple drug resistance and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolated from medical and nonmedical personnel in Yaounde, Cameroon. *Pan. Afr. Med. J.*, 17, 186. doi:10.11604/pamj.2014.17.186.2363.
- Perez, L. R. (2015). *Acinetobacter baumannii* displays inverse relationship between meropenem resistance and biofilm production. *J. Chemother.*, 27, 13-16. doi: 10.1179/1973947813Y.0000000159.

6. Sanchez, C. J., Mende, K., Beckius, M. L., Akers, K. S., Romano, D. R., Wenke J. C. ..., Murray, C K. (2015). Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infectious Diseases*, 13, 47. doi:10.1186/1471-2334-13-47.

7. Про затвердження методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів. *Наказ, 167 МОЗ України* (2007), (с.63). Київ: МОЗ України

8. Stepanovic, S., Bonaventura, G.D., Vukovic, D., Cirkovic, I., Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 9, 891-899. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x.

9. Трофіменко, Ю. В. (2015). Біологічні властивості мікрофлори, що колонізує ендотрахеальні інтубаційні трубки у відділеннях інтенсивної терапії. (Автореф. дис.). *Вінницький Національний Медичний Університет ім. М. І. Пирогова, Україна, Вінниця.*

10. Amsden, G.W., Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (2009) Tables of antimicrobial agent pharmacology. In Amsden, G.W., Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R. (eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases* (7th ed.), (pp. 705-764). Philadelphia, Ph: Elsevier.

11. Qi, L., Li, H., Zhang, C., Liang, B., Li, J., Wang, L., Song H. (2016). Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in acinetobacter baumannii. *Front. Microbiol*, 7, 483. doi:10.3389/fmicb.2016.00483.

12. Mulla, S., Kumar, A., Rajdev, S. (2016). Comparison of MIC with MBEC Assay for in Vitro Antimicrobial Susceptibility Testing In Biofilm Forming Clinical Bacterial Isolates. *Advances in Microbiology*, 6, 73-78. doi:10.4236/aim.2016.62007.

ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF BIOFILM PRODUCING MICROORGANISMS ISOLATED FROM GUNSHOT WOUNDS

V.M. Kondratiuk, V.P. Kovalchuk, I.M. Kovalenko

M.I. Pyrohov Vinnytsia National Medical University, Military Medical Clinical Centre Central Region

SUMMARY. Currently it is unclear whether direct correlation between biofilm formation and antibiotic resistance exist. In this study, we examined the relationship between antibiotic resistance and biofilm formation in clinical isolates.

Thirteen isolates were collected from gunshot wounds during 2014. Biofilm-forming capacities were evaluated using the crystal violet staining method. The minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and minimum biofilm eradication concentration (MBEC) to amikacin, ceftriaxone, cefaperazon/clavulanic acid, ciprofloxacin, meronem, gatifloxacin, and levofloxacin were evaluated using micro dilution assays.

Susceptible in planktonic strains showed high resistance in form of biofilm. The MBEC of tested antibiotics for biofilmforming strains exceeded 500mcg/ml and was more than a hundred times higher than clinically attainable concentration. However, the correlation between the studied properties of A. baumannii strains was diverse: for meronem ($r = -0,62$), for cefoperazone with clavulanic acid ($r = +0,62$), for amikacin ($r = +0,84$). P. aeruginosa strains showed contradictory relation between biofilm forming and resistance. Results from this study imply that biofilm formation and antibiotic resistance acts as a separate mechanism for bacteria to get better survival, especially in isolates with weak resistance level.

Biofilm formation and antibiotic resistance acts as a separate mechanism for bacteria to get better survival, especially in isolates with weak resistance level.

Key words: bacterial biofilm, antibiotic resistance, antibiotic concentration.

Отримано 10.09.2016 р.