

О.І. Сідашенко, О.С. Воронкова, О.А. Сірокваша, А.І. Вінніков

*Дніпропетровський національний університет ім. Олеся Гончара
пр-т Гагаріна, 72, м. Дніпропетровськ, Україна*

ПРОЯВ ФАКТОРІВ ПАТОГЕННОСТІ У БІОПЛІВКОУТВОРЮЮЧИХ ТА НЕФОРМУЮЧИХ БІОПЛІВКУ ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

*Проведено визначення ступеня прояву факторів патогенності: гемолітичної, ліпазної, лецитиназної активностей, а також здатності до адгезії у 20 біоплівкоутворюючих і 17 неформуючих біоплівку штамів *Staphylococcus epidermidis*. Встановлено, що повний гемоліз та ліпазну активність виявляли всі біоплівкоутворюючі штами *S. epidermidis*, лецитиназну активність спостерігали у 80 % біоплівкоутворюючих штамів. Серед неформуючих біоплівку штамів повний гемоліз та ліпазну активність спостерігали у 89 %, лецитиназну – у 71 % штамів.*

*Досліджені біоплівкоутворюючі та неформуючі біоплівку штами *S. epidermidis* виявляли здатність до адгезії на клітинах букального епітелію людини. Встановлено, що всі біоплівкоутворюючі штами *S. epidermidis* були високоадгезивними, найвищий ІАМ становив 11,84.*

*З'ясовано, що серед неформуючих біоплівку штамів *S. epidermidis* були низько-, середньо- та високоадгезивні. Середній ІАМ неформуючих біоплівку штамів *S. epidermidis* виявився у 3 рази нижчим, порівняно з середнім ІАМ біоплівкоутворюючих штамів і складав 3,2.*

*Ключові слова: біоплівка, біоплівкоутворюючі та неформуючі біоплівку штами, адгезивні властивості, букальний епітелій; гемолітична, ліпазна та лецитиназна активність, *Staphylococcus epidermidis*.*

Останнім часом показана можливість існування бактерій у формі складноорганізованого співтовариства – біоплівки, що має місце як у навколишньому середовищі, так і у організмі людини, де може ускладнювати протікання інфекційного процесу. Перебіг останнього ускладнюється за рахунок набуття бактеріями у біоплівковій структурі посилення стійкості до факторів довкілля, таких, як температура, показники рН тощо, з одного боку, та до антибіотиків, які використовують у лікуванні інфекцій – з іншого боку. Відкриття бактерій у біоплівковій культурі якісно змінило погляди на особливості перебігу, терапію і профілактику інфекційних захворювань.

У процесі формування біоплівки одним із важливих факторів є здатність мікроорганізмів до адгезії [4]. Адгезія до біологічних об'єктів (клітин, тканин, стінок судин) пов'язана зі специфічною взаємодією білків-адгезинів або лектинів фімбрії екзоплазматичного компартмента бактеріальної клітини з рецепторами або певними доменами поверхні мембран клітин-хазяїв. При цьому колонізаційна резистентність макроорганізму більшою мірою залежить від сукупності факторів, які перешкоджають прикріпленню та розмноженню бактерій на слизових оболонках. Суттєва роль при цьому належить нормальній мікрофлорі слизової оболонки, її конкурентним взаємовідносинам з патогенною мікрофлорою та фізіологічному стану клітин макроорганізму [9]. Тому саме процес адгезії мікроорганізмів є початковою ланкою у розвитку інфекційного процесу та формуванні біоплівки.

Вважається, що здатність до біоплівкоутворення є додатковим фактором патогенності. Серед умовно-патогенних бактерій одними з найпоширеніших збудників інфекцій, що ускладнені утворенням біоплівки, є стафілококи. Відомо, що стафілококи є збудниками значної частини позалікарняних та нозокоміальних інфекцій [11]. Основні ураження викликають *S. aureus* і *S. epidermidis* [3, 7], які можуть колонізувати та вражати органи і тканини організму людини, демонструючи при цьому широкий діапазон адаптаційних можливостей. Для *S. epidermidis* типовими є ураження, пов'язані з колонізацією різних поверхонь, в тому числі протезів, катетерів, дренажів, або гематогенне розповсюдження після хірургічного втручання, а також інфекційні ураження шкіри та м'яких тканин, кісток, суглобів, сечовидільної системи тощо [12].

Патогенні властивості кожного окремого штаму стафілококу визначаються загальною дією факторів патогенності, токсинів та інвазивних властивостей даного штаму. При цьому вірулентність різних штамів значною мірою відрізняються між собою [6].

В зв'язку з вище сказаним, метою роботи було визначити ступінь прояву факторів

патогенності та ступінь адгезивних властивостей штамів *S. epidermidis*, що були виділені з носоглотки, піхви та поверхні ран хворих людей, оцінити їх взаємозв'язок із здатністю до біоплівкоутворення.

Матеріали та методи. Об'єктом дослідження були 122 клінічних штами – представники роду *Staphylococcus*. Робота зі штамами була проведена на базі лабораторії мікробіології та імунології ДУ Інститут гастроентерології НАМН України.

Ідентифікацію отриманих штамів проводили відповідно до ознак, наведених у визначнику бактерій Берджі [10]. Для визначення належності ізолятів до роду *Staphylococcus* здійснювали висів штрихом всіх досліджуваних добових культур на сольовий агар з різним вмістом NaCl (5, 7, 10, 15 %), поміщали у термостат при 37°C та через 1 добу перевіряли наявність росту, робили мазки із зрослих колоній, які забарвлювали за Грамом та розглядали за допомогою світлової мікроскопії при збільшенні $\times 900$. Інкубували за різних температур (5, 10, 15, 28, 37, 45°C). Перевіряли наявність оксидазної та каталазної активностей, здатність ферментувати гліцерин та D-глюкозу тощо. На середовищах Гіса спостерігали ферментацію цукрів – утворення газу та кислоти. Чутливість до новобіоцину перевіряли засіваючи 0,1 мл бактеріальної суспензії добової культури на МПА та клали диск з новобіоцином. Через 1 добу враховували зону пригнічення росту. Диференціацію стафілококів на коагулазопозитивні та коагулазонегативні проводили з використанням сухої цитратної плазми кролика (ЗАТ «Біолік», Україна) в реакції плазмокоагуляції.

За допомогою модифікованої методики визначали здатність до біоплівкоутворення: у кожному лунку 96-лункового стерильного імунологічного планшета (Sarstedt, Німеччина) вносили 200 мкл м'ясо-пептонного бульйону (МПБ) та засівали 50 мкл суспензії клітин культури стафілококів, що містила $3,2 \times 10^4$ клітин/мл. За біоплівкоутворенням спостерігали протягом 72 годин. Біоплівка формувалася на дні лунок планшета. Після закінчення інкубації залишки живильного середовища обережно відбирали шприцом. Якщо на стінках лунок планшета залишалася біоплівка, то штам вважали біоплівкоутворюючим [8].

У досліджуваних штамів проводили визначення ступеня прояву і порівняння факторів патогенності, таких, як гемолітична активність на кров'яному агарі, ліпазна та лецитиназна активність на жовтково-сольовому агарі [5]. Добові культури засівали штрихом, чашки Петрі поміщали в термостат при 37°C та через 1 добу враховували результати – наявність просвітління довкола штриха на кров'яному агарі та появу райдужної оболонки та просвітління довкола штриха на жовтково-сольовому агарі.

Здатність досліджуваних штамів *S. epidermidis* до адгезії вивчали на клітинах букального епітелію людини розгорнутим методом [1]. Штами вирощували протягом однієї доби у м'ясо-пептонному середовищі, після чого бактеріальні суспензії центрифугували 5 хв. при 6000 об/хв. Одержану біомасу ресуспендували у фосфатно-сольовому буфері наступного складу (г/100 мл): NaCl – 0,85; Na_2HPO_4 – 1,42 (рН 7,2). Одержували суспензію бактерій, яка містила $1,0 \times 10^9$ клітин/мл. Зразок букального епітелію переносили в буфер та центрифугували при 6000 об/хв., супернатант видаляли, а одержаний осад повторно ресуспендували у вказаному вище буфері та центрифугували у такому ж режимі. Кількість клітин підраховували у камері Горяєва. Готували суспензію епітеліальних клітин у концентрації 1×10^8 клітин/мл. Одержані суспензії бактеріальних та епітеліальних клітин змішували у рівних об'ємах в мікропробірці та інкубували при температурі 37°C протягом 30 хв. Після закінчення експозиції клітини двічі промивали фосфатно-сольовим буфером і осаджували протягом 5 хв. при 6000 об/хв, щоб звільнити епітеліоцити від неприкріплених бактеріальних клітин. З осаду клітин готували мазки, фарбували за Грамом і підраховували кількість бактерій, які знаходилися на поверхні епітеліоцитів. Визначали середній показник адгезії (СПА), а саме – середню кількість бактерій, що прикріпились до однієї епітеліальної клітини. Також встановлювали коефіцієнт участі епітеліальних клітин в адгезивному процесі (К) – процент клітин, які мають на своїй поверхні адгезовані мікроорганізми. Індекс адгезивності мікроорганізму (ІАМ) – середню кількість бактерій на одній епітеліальній клітині, що бере участь у процесі адгезії, – визначали за формулою: $\text{ІАМ} = (\text{СПА} \times 100) / \text{К}$. Мікроорганізми вважалися неадгезивними при $\text{ІАМ} \leq 1,75$; низькоадгезивними – при показниках 1,76-2,50; середньоадгезивними – від 2,51 до 4,0 та високоадгезивними при $\text{ІАМ} \geq 4,00$ [1].

Результати. Нами було встановлено, що серед виділених 122 клінічних штамів

стафілококів, до коагулазопозитивних належали 67 штамів, а до коагулазонегативних – 55. За результатами вивчення фізіолого-біохімічних властивостей, а саме анаеробного утворення кислоти з сахарози та мальтози, відновлення нітратів, ферментації глюкози та лактози, відсутності утворення кислоти з маніту у анаеробних умовах, чутливості до новобіоцину (МПК < 1,6 мг/мл) встановлено, що 37 культур (30,3 %) із 122 досліджених належали до виду *Staphylococcus epidermidis*.

Було визначено, що 54 % досліджених штамів *S. epidermidis* утворювали біоплівку. Біоплівка формувалася протягом трьох діб, осідала на дно лунок планшета, за характером росту була тоненькою, гладкою, мала сіро-білий колір.

У всіх ідентифікованих штамів вивчали наявність факторів патогенності, а саме: гемолітичної, ліпазної та лецитиназної активностей. При вивченні факторів патогенності виявилось, що гемоліз, який характеризувався повним освітленням (усереднений показник ширини зони $18 \pm 0,3$ мм) на кров'яному агарі, та ліпазну (усереднений показник ширини зони $5 \pm 0,3$ мм) активність на жовтково-сольовому агарі виявляли всі біоплівкоутворюючі штами *S. epidermidis*, лецитиназну активність спостерігали у 80 % (усереднений показник ширини зони $6 \pm 0,3$ мм) біоплівкоутворюючих штамів. Серед неформуючих біоплівку штамів повний гемоліз та ліпазну активність спостерігали у 89 % культур (усереднений показник ширини зони $11 \pm 0,3$ мм в обох випадках) та лецитиназну – у 71 % штамів (усереднений показник ширини зони $5 \pm 0,3$ мм).

Внаслідок проведених досліджень виявилось, що всі біоплівкоутворюючі та неформуючі біоплівку штами *S. epidermidis* здатні адгезуватися до клітин букального епітелію людини (табл. 1).

Таблиця 1

Адгезивні властивості біоплівкоутворюючих та неформуючих біоплівку штамів *Staphylococcus epidermidis* до клітин букального епітелію людини

Здатність до біоплівкоутворення	Кількість досліджуваних штамів	Середній показник адгезії (СПА)	Середній коефіцієнт участі епітеліоцитів К, %	Середній індекс адгезивності мікроорганізмів (ІАМ)
Біоплівкоутворюючі	20	8,61	88,21	9,75
Небіоплівкоутворюючі	17	2,84	87,39	3,2

Встановлено, що всі 20 біоплівкоутворюючих штамів *S. epidermidis* виявилися високоадгезивними, оскільки серед даних штамів найвищий ІАМ становив 11,84, а найнижчий складав 4,68. Встановлено, що 1 штам мав ІАМ, що дорівнював 4,68, ІАМ від 7,64 до 7,93 мали 2 штами, ІАМ від 8,1 до 9,45 – 5 штамів, ІАМ, що становив від 9,8 до 10,03 – 3 штами, ІАМ від 10,32 до 11,09 – 3 штами, ІАМ вище за 11,09 – 5 штамів.

Під час проведених досліджень було встановлено, що серед представників неформуючих біоплівку штамів *S. epidermidis* були низько-, середньо- та високоадгезивні штами. Серед 17 неформуючих біоплівку штамів низькоадгезивними виявилися 29,4 %, середньоадгезивними – 52,9 % та лише 17,6 % – високоадгезивними. Це свідчить про домінування серед неформуючих біоплівку штамів середньоадгезивних культур.

Найвищий індекс адгезивності серед небіоплівкоутворюючих штамів становив 4,48, а найнижчий ІАМ – 1,54. Виявлено, що 3 штами мали ІАМ від 1,54 до 1,94, ІАМ від 2,3 до 2,7 – 6 штамів, ІАМ, що становив від 3,56 до 3,87 – 3 штами, ІАМ вище за 4,07 – 5 штамів.

Таким чином, під час проведених досліджень було встановлено, що штами, які виявляли здатність до біоплівкоутворення, характеризуються приблизно у 3 рази вищим середнім показником адгезивності до клітин букального епітелію людини, порівняно з неформуючими біоплівку штамами *S. epidermidis*. У зв'язку з цим можна припустити, що за здатністю адгезуватися на клітинах епітелію можна судити про властивість високоадгезивних штамів формувати біоплівку. Останнє вірогідно може сприяти хронізації інфекційного процесу.

Обговорення. Під час проведення експериментальних досліджень нами було встановлено, що всі біоплівкоутворюючі штами *S. epidermidis* виявляли гемолітичну та ліпазну активності, а лецитиназну активність спостерігали у 80 % штамів. Серед неформуючих біоплівку

штамів повний гемоліз та ліпазну активність спостерігали у 89 % та лецитиназну – у 71 % культур. За даними літератури, серед неформуючих біоплівку штамів частка негемолітичних стафілококів становила близько 21,5 %, а лецитиназну активність спостерігали у всіх досліджуваних штамів [6]. За даними інших авторів, 73 % виділених штамів *Staphylococcus epidermidis* були здатні до гемолізу еритроцитів, 29 % виявляли лецитиназну, а 57 % – ліпазну активності [2]. У оглянутих нами джерелах даних стосовно прояву факторів патогенності серед біоплівкоутворюючих штамів не знайдено.

Нами встановлено, що всі біоплівкоутворюючі штами *Staphylococcus epidermidis* характеризуються високими адгезивними властивостями, так як найвищий ІАМ становив 11,84, а найнижчий ІАМ дорівнював 4,68. Серед штамів *Staphylococcus epidermidis*, що неформують біоплівку, було виявлено низько-, середньо- та високоадгезивні штами, серед них найвищий ІАМ становив 4,48, а найнижчий ІАМ – 1,54. За даними літератури, серед досліджуваних штамів стафілококів, що виділені з різних біотопів організму людини, були високо- та середньоадгезивні культури [6], за іншими даними – серед досліджуваних штамів стафілококів, які були виділені зі шкіри людей, що страждають хронічними дерматитами, також спостерігали наявність високоадгезивних штамів, при цьому найвищий СПА становив $4,1 \pm 0,08$, серед середньоадгезивних штамів – СПА дорівнював $2,73 \pm 0,03$, а також були наявні низькоадгезивні штами, так як були культури з нульовим рівнем СПА – $0,46 \pm 0,25$ та $0,88 \pm 0,12$ [9]. Можна заключити, що отримані нами результатами збігаються з даними досліджень інших авторів.

Таким чином, можна припустити, що високий рівень гемолітичної, ліпазної та лецитиназної активності виділених, як біоплівкоутворюючих, так і неформуючих біоплівку штамів *S. epidermidis* дозволяє протидіяти та пригнічувати захисні механізми організму-хазяїна, з одного боку, а також інтенсивна адгезія, обумовлена високим адгезивним потенціалом – з іншого, що призводить до активної колонізації уражених та інтактних органів, наряду з іншими факторами патогенності створює цим мікроорганізмам умови для тривалого персистування в організмі та призводить до хронізації інфекційних процесів.

Сидашенко О.И., Воронкова О.С., Сирокваши Е.А., Винников А.И.

Днепропетровский национальный университет им. Олеся Гончара

ПРОЯВЛЕНИЕ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ В БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩИХ И НЕПЛЕНКООБРАЗУЮЩИХ ШТАММОВ *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

Резюме

Проведено определение наличия ряда факторов патогенности: гемолитической, липазной, лецитиназной активностей и способности к адгезии в 20 биопленкообразующих и 17 неформирующих биопленку штаммов *S. epidermidis*. Определено, что полный гемолиз и липазную активность проявляли все биопленкообразующие штаммы *S. epidermidis*, лецитиназную активность наблюдали в 80 % биопленкообразующих штаммов. Среди неформирующих биопленку штаммов полный гемолиз и липазную активность наблюдали в 89 % и лецитиназную – в 71 %.

Исследованные биопленкообразующие и неформирующие биопленку штаммы *S. epidermidis* проявляли способность к адгезии на клетках буккального эпителия человека. Определено, что все биопленкообразующие штаммы *S. epidermidis* были высокоадгезивными, самый высокий ИАМ составлял 11,84.

Показано, что среди неформирующих биопленку штаммов *S. epidermidis* были низко-, средне- и высокоадгезивные. ИАМ неформирующих биопленку штаммов *S. epidermidis* в 3 раза ниже по сравнению с ИАМ к эпителиоцитам человека биопленкообразующих штаммов и составлял 3,2.

Ключевые слова: биопленка, биопленкообразующие и неформирующие биопленку штаммы, адгезивные свойства, буккальный эпителий, гемолитическая, липазная, лецитиназная активность, *S. epidermidis*.

EXHIBITION PATHOGENICITY FACTORS IN BIOFILM-FORMING AND NO-BIOFILM FORMING STRAINS OF *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS*

S u m m a r y

A comparative study of the manifestation of pathogenicity factors : hemolytic, lipase, letsytinase activity and ability to adhere in 20 film-forming and 17 non-film-forming strains of *S. epidermidis*. Studying pathogenicity factors of the film-forming strains it was found that complete hemolysis and lipase activity shown was by all the film-forming strains of *S. epidermidis*, letsytinase activity was observed in 80%. Among the non-film-forming strains complete hemolysis and lipase activity were observed in 89% and letsytinase – 71%.

Researched non-film-forming and film-forming strains of *S. epidermidis* showed the ability to adhere to buccal epithelial cells of humans. Found that all the film-forming strains of *S. epidermidis* were high level adhesion, the highest IAM was equal to 11,84. It was found that among non-film-forming strains of *S. epidermidis* were low-, medium- and high level adhesion. IAM of non-film-forming strains of *S. epidermidis* is 3 times lower compared to the IAM of the film-forming strains of human epithelial cells and was 3,2.

Key words: biofilm, film-forming and non-film-formation strains, ability to adhere, buccal epithelial cells, hemolytic, lipase, letsytinase activity, *S. epidermidis*.

1. Коваленко Н.К., Лівінська О.П., Полтавська О.А., Гармашева І.Л., Шинкаренко Л.М., Олещенко Л.Т. Пробиотичні властивості промислових штамів лактобацил і біфідобактерій // Мікробіологічний журнал. – 2010. – 72, № 1. – С. 9-17.
2. Колечукова О.А., Акебаши С.В., Капустина Т.А., Парилова О.В., Кин Т.И. Сравнительная характеристика стафилококкового пейзажа слизистой оболочки носа при синусите и рините // Вестник оториноларингологии. – 2009. – 2. – С. 7-9.
3. Митрохин С.Д., Сергеев С.А., Махсон А.Н. Обоснованность применения мупироцина в формулярах антибактериальной терапии и профилактики нозокомиальной инфекции в онкологической клинике // Инфекция и антимикробная терапия. – 2000. – 2, № 6. – С. 181.
4. Науменко З.С., Шипицына И.В. Сравнительная оценка адгезивной активности бактерий, выделенных у больных из остиемиелитического очага и из ран открытых переломов // Гений ортопеди. – 2011. – № 4. – С. 31-34.
5. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: приказ № 535. – [чинний від 22.04.1985р.]. – М.: МОЗ СССР, 1985. – С. 65.
6. Павлова И.Ж., Хомич Ю.С. Биологические свойства *Staphylococcus aureus*, выделенных из различных локусов бактерионосителей / Вестник Челябинского государственного университета – 2013. – 298, № 7. – С. 66-67.
7. Сидоренко С.В., Яковлев С.В. Инфекции в интенсивной терапии – М. – 2000. – С. 144.
8. Тец В.В., Кнорринг Т.Ю., Артеменко Н.К., Заславская Н.В., Артеменко К.Л. Влияние экзогенных протеолитических ферментов на бактерии // Антибиотики и химиотерапия. – 2004. – №12 – С. 9-13.
9. Фалова О.Е. Взаимосвязь и степень выраженности адгезивной способности и антилизосимной активности стафилококков, выделенных с кожи людей, страдающих хроническими дерматозами // Вестник Томского государственного университета. – 2011. – № 349. – С. 188-189.
10. *Bergey's manual of systematic bacteriology* / Ed. by De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.-H., Whitman W.B.-Second., Vol.3, The Firmicutes – Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer, 2009. – 1422 p.
11. Carbon C. MRSA and MRSE: is there an answer? // Clin Microbiol Infect. – 2000. – 6, N 2. –P. 17–22.
12. Marshall S.A., W.W. Werner, M.A. Pfaller, R.N. Jones *Staphylococcus aureus* and coagulase negative Staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility and molecular (mecA) characterisation of oxacillin resistance in the SCOPE Program // Diagn Microbiol Infect Dis – 1998 – N. 30. – P. 205–14.

Отримано 20.02.2013