

© Деркач С.А., Воронкіна І.А., Кхедер С.С., Габишева Л.С.1, Крилова І.А.

УДК: 615.28:579.861.2:579.61:616-078

Деркач С.А., Воронкіна І.А., Кхедер С.С., Габишева Л.С.1, Крилова І.А.

Державна установа "Інститут мікробіології та імунології імені І.І.Мечникова Національної академії медичних наук України" (вул. Пушкінська, 14-16, м.Харків, 61057, Україна), 1Харківський національний медичний університет (майдан Свободи 4, Харків, 61022, Україна)

ВПЛИВ БІОЦИДНИХ ЗАСОБІВ (МІРАМІСТИНУ ТА ХІЛАКУ) НА ПРОЦЕС БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ *S.AUREUS*

Резюме. Проведено експериментальне вивчення впливу різних доз асептика Мірамістину та пребіотика Хілаку на інтенсивність біоплівкоутворення штамми стафілококу (*S. aureus* ATCC 25923, MSSA, MRSA). Визначена здатність даних біоцидів проявляти антибактеріальну активність як відносно планктонних, так і біоплівкових культур *S. aureus*. Показано достовірне збільшення МІК препаратів відносно біоплівкових культур, що слід враховувати при їх практичному застосуванні.

Ключові слова: біоплівки, стафілокок, мірамістин, хілак.

Вступ

Відомо, що близько 90,0% вивчених видів бактерій здатні до біоплівкоутворення [4, 6, 9, 10].

Сучасні дослідження підтверджують значну роль біоплівок у розвитку інфекційних процесів. Зараз достовірно встановлено, що здатність мікроорганізмів створювати співтовариства є одним з найважливіших факторів їх персистенції. Бактерії, які перебувають у формі біоплівки, стають менш доступними до дії різних біоцидів, таких, як антибіотики, метали, асептики, пестициди [1, 3].

Нині активно розробляють засоби, які б дозволили зруйнувати бактеріальну біоплівку. З цією метою рекомендують використовувати протеолітичні ферменти, поліциклічні з'єднання, гіпохлориди, броміди амонію, нові антибактеріальні препарати та бактеріофаги. На думку цілого ряду вчених, ефективність будь-якого протимікробного препарату слід визначати щодо дії на адгезовані мікроорганізми і вважати ефективними концентрації не мінімальні, які пригнічують ріст планктонних культур, а ті, що пригнічують ріст мікроорганізмів у вигляді біоплівок [2, 3, 6, 12].

На формування біоплівок можуть впливати багаточисельні фактори, які на сьогодні залишаються не вивченими. З огляду на те, що у більшості випадків при початкових проявах гнійно-запальних захворювань має місце спроба заблокувати процес місцевим лікуванням (полосканням, змазуванням пошкоджених ділянок шкіри асептиками, застосуванням антибіотиків широкого спектру дії, тощо), важливо дослідити їх вплив на процес біоплівкоутворення.

У останні роки лікарями накопичено значний досвід використання антисептика мірамістину для лікування гнійно-запальних захворювань різної етіології, у т.ч. і викликаних мікроорганізмами роду *Staphylococcus spp.*

Препарат належить до поверхнево-активних речовин (четвертинні амонієві сполуки) і має протимікробну, протизапальну і місцеву імуноадьювантну дію.

Мірамістин проявляє бактерицидну дію відносно різних видів аеробних бактерій, включаючи полірезистентні госпітальні штами, і широко застосовується у різних галузях медицини.

Дія цього асептика на процес біоплівкоутворення та його активність відносно біоплівкових культур викликає обґрунтовану зацікавленість, тому нами було проведено визначення впливу мірамістину на стафілококові біоплівки. Як у будь-якому мікробіоцинозі, у біоплівках співіснують представники індигенної мікрофлори та транзиторні види бактерій. До нутрієнтного складу кишківника входять представники 17 сімейств, 45 родів і більше 400 видів мікроорганізмів, які формують надскладну за організацією біоплівку. Цей факт змушує по-новому поглянути на механізм виникнення дисбактеріозу кишечника і на засоби його лікування, особливо на застосування біоцидів і пребіотиків.

Керуючись цією інформацією, у власні дослідження включено вивчення впливу на біоплівкоутворення культурою *S. aureus* одного із препаратів, який широко застосовують для корекції дисбактеріозу - Хілаку.

Цей пребіотичний препарат містить беззародковий водний екстракт субстрату продуктів обміну речовин *E. coli*, *S. faecalis*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*. Молочна кислота, що входить до складу препарату, забезпечує високу кислотність середовища та створює несприятливі умови для життєдіяльності патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів (УПМ), у т.ч. і стафілококів.

Результати метаболомного аналізу, проведеного Лимановою О.А., показують, що серед молекул, що входять до складу хілаку, присутні сигнальні молекули АІ 1-го та 2-го типів, які беруть безпосередню участь у біоплівкоутворенні позитивної флори, таким чином пребіотик сприяє виживанню "нативної" генетично сумісної з організмом хазяїна мікробіоти [8].

Мета дослідження - визначення особливостей застосування мірамістину та хілаку при лікуванні захворювань стафілокової етіології.

Основним завданням даної роботи було експериментальне вивчення впливу асептика мірамістину та пребіотика хілаку на процес біоплівкоутворення метициліночутливими (MSSA) та метицилінорезистентними (MRSA) штамми стафілококу та їх ефективності відносно біоплівкових культур стафілококу.

Матеріали та методи

Для експериментів було відібрано три штами стафілококу: *S.aureus* №22 (MRSA), *S.aureus* №12 (MSSA) та *S.aureus* ATCC № 25923. Як біоциди використовували асептик мірамистин (ЗАТ "Фармацевтична фірма "Дарниця", Україна) та пребіотик - Хілак форте (Ratiopharm, Німеччина).

Визначення мінімальної інгібуючої концентрації (МІК) Мірамистину та Хілаку проводили за загальноприйнятною методикою [11].

Вивчення біоплівкоутворюючих властивостей стафілококу проводили методом культуральних планшетів [14].

Бактеріальні ізоляти інкубували у поживному бульйоні з об'ємною часткою глюкози 2% при 35°C протягом 18 годин, після чого готували інокулом (0,5 за Mc Farland) та розводили поживним середовищем до 10⁷ КУО/мл і закапували у лунки планшету по 0,2 мл.

Планшети інкубували 24 години при 35°C. Відмити фосфатним буфером біоплівки фіксували 2% розчином ацетату натрію, забарвлювали 1% сафраніном протягом 30 хвилин. Екстракцію барвника здійснювали оцтовою кислотою з об'ємною часткою 30%.

Оптичну щільність сформованої біоплівки оцінювали за інтенсивністю забарвлення оцтової кислоти на фотометрі (Lisa Scan EM) при довжині хвилі 492 нм.

Оцінку біоплівкоутворення проводили за одиницями оптичної щільності (ОД ОЩ) методом S. Stepanovic [15].

Для вивчення дії біоцидів виготовляли послідовні серійні розведення препаратів (від 1:1 до 1:128), які вносили у лунки планшету, як одночасно з тест-культурами (визначення дії на свіжесформовані "молоді" біоплівки), так і після 24-х годин інкубації ("зрілі" біоплівки).

Після механічного руйнування біоплівок проводили висів із лунок та оцінювали наявність росту (КУО/мл).

Експерименти відтворювали у трьохкратних повтореннях. Результати досліджень обробляли статистичними методами за допомогою програми MS Excel 2003 з використанням критерію χ^2 [5, 7].

Результати. Обговорення

Як показали отримані результати експериментів, високі концентрації мірамистину (при розведенні від 1:1 до 1:8), практично, не впливали на процес біоплівкоутворення референс-штамом, MRSA та MSSA (достовірної різниці у порівнянні з контролем не виявлено, $\chi^2 > 0,05$) (рис. 1, 2).

При визначенні дії Мірамистину у розведенні від 1:8 до 1:16 виявлена його здатність руйнувати добові біоплівки, що підтверджується достовірним зниженням ОД ОЩ у порівнянні з контролем - стафілококовими біоплівками без додавання препарату. Це відноситься до всіх дослідних штамів.

Невеликі концентрації біоциду (від 1:32 до 1:128),

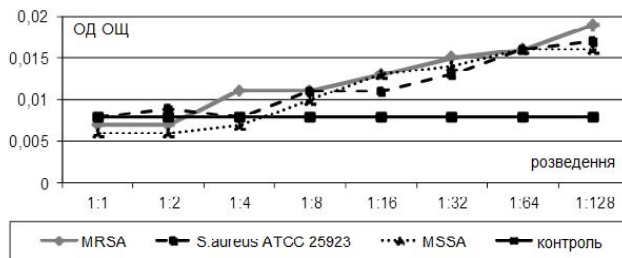


Рис. 1. Результати визначення дії мірамистину на свіжесформовані "молоді" стафілококові біоплівки.

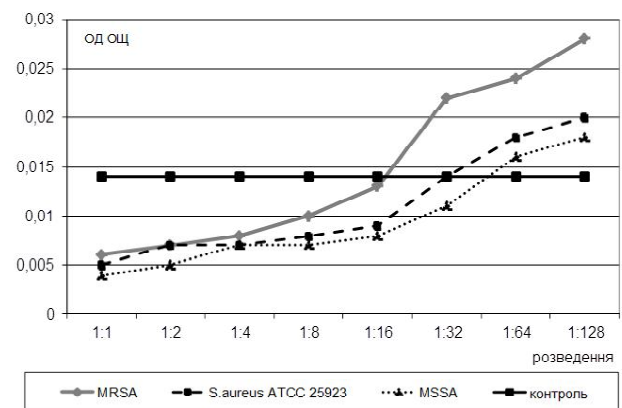


Рис. 2. Результати визначення дії мірамистину на 24-х годинні "зрілі" стафілококові біоплівки.

сприяли біоплівкоутворенню, що підтверджувалось достовірним підвищенням ОД ОЩ, та наявністю росту культур при висівах із дослідних зразків на поживне середовище ($\chi^2 < 0,05$) (табл. 1).

Отже, високі концентрації препарату діють бактерицидно як на MSSA, так і на MRSA штами. Зниження показників ОД ОЩ вже сформованих ("зрілих") біоплівок під дією Мірамистину у високих концентраціях (від 1:1

Таблиця 1. Кількість *S.aureus* (КУО/мл) після дії мірамистину на свіжесформовані ("молоді") та 24-х годинні ("зрілі") біоплівки.

Розведення біоциду	"Молоді" біоплівки			"Зрілі" біоплівки		
	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	MSSA	MRSA	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	MSSA	MRSA
1:1	-	-	-	-	-	-
1:2	-	-	-	-	-	-
1:4	-	-	-	-	10 ²	10 ³
1:8	-	-	-	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
1:16	-	-	-	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
1:32	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
1:64	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶
1:128	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷
контроль бульйон + культура	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷

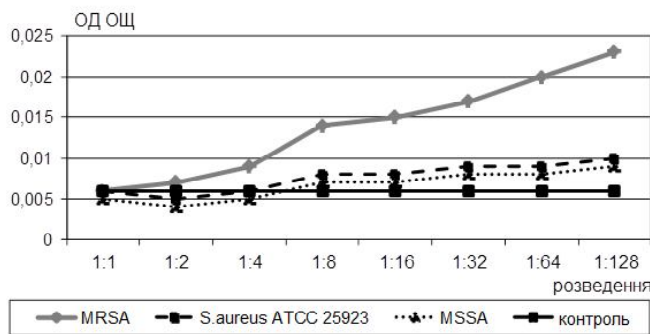


Рис. 3. Результати визначення дії хілаку на свіжесформовані "молоді" стафілококові біоплівки.

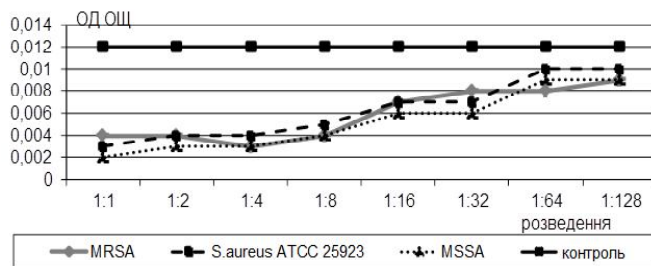


Рис. 4. Результати визначення дії хілаку на 24-годинні "зрілі" стафілококові біоплівки.

до 1:16), вказує на здатність препарату проникати у біоплівки. Це підтверджується і відсутністю росту біоплівкових культур при висівах із цих розведень на живильне середовище.

При зниженні концентрації Мірамістину руйнація біоплівок не відбувалась, навіть спостерігалась стимуляція біоплівкоутворення у MRSA штама ($\chi^2 < 0,05$).

Враховуючи те, що МІК Мірамістину, визначена відносно штамів стафілококу, які були взяті до експерименту в планктонній формі рівнялась 1:16, можна зробити висновок, що МІК препарату відносно біоплівкових форм збільшувалась у 2-4 рази, оскільки при розведенні

Таблиця 2. Кількість *S.aureus* (КУО/мл) після дії хілаку на свіжесформовані ("молоді") та 24-годинні ("зрілі") біоплівки.

Розведення біоциду	"Молоді" біоплівки			"Зрілі" біоплівки		
	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	MSSA	MRSA	<i>S.aureus</i> ATCC 25923	MSSA	MRSA
1:1	-	-	-	-	-	-
1:2	-	-	-	-	-	-
1:4	-	-	-	-	до 10 ²	до 10 ²
1:8	-	-	-	10 ³	10 ³	10 ³
1:16	-	-	-	10 ³	10 ³	10 ⁴
1:32	-	-	10 ¹	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
1:64	10 ²	10 ²	10 ³	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶
1:128	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶
контроль бульйон + культура	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁶

1:8 і 1:4 спостерігався ріст культур (табл. 1).

Проведені нами дослідження впливу Хілаку на формування біоплівки MSSA показали, що незалежно від його концентрації (розведення від 1:1 до 1:128) стимуляція біоплівкоутворення стафілококом не виявлена ($\chi^2 > 0,05$).

Щодо дії хілаку на MRSA виявлено достовірне збільшення показників ОД ОЩ, тобто мала місце стимуляція біоплівкоутворення при розведенні препарату 1:8 і більше ($\chi^2 < 0,05$) (рис. 3).

При дії Хілаку на 24-годинну біоплівку при розведенні 1:1 - 1:8 фіксували зменшення ОЩ у порівнянні з контролем, що свідчить про здатність пребіотика зменшувати (або руйнувати) "зрілі" біоплівки ($\chi^2 < 0,05$) (рис. 4).

При невисоких концентраціях препарату (розведення 1:16 - 1:128) достовірного зменшення ОД ОЩ не виявлено ($\chi^2 > 0,05$).

Аналізуючи результати висівів культур слід зазначити, що МІК хілаку на планктонні культури дослідних штамів стафілококу була 1:32, а на біоплівкові - від 1:4 до 1:2, тобто зросла у 8-16 разів (табл. 2).

Це підтверджує загальний висновок більшості дослідників про значну стійкість біоплівкових культур до біоцидів [10, 11, 16].

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Мірамістин володіє високою бактерицидною активністю і сприяє руйнуванню 24-годинних ("зрілих") біоплівок, утворених як MSSA, так і MRSA штамми, якщо його концентрація підтримується на достатньо високому рівні. При зниженні концентрації препарату виявлена стимуляція біоплівкоутворення, що важливо враховувати при його практичному застосуванні. Одноразове використання препарату, несвоєчасна зміна пов'язок, тощо, особливо при гнійно-запальних захворюваннях, зумовлених MRSA штамми, може, навпаки, сприяти переходу збудника у стан біоплівки.

МІК мірамістину відносно біоплівкових культур *S.aureus* була у 2-4 рази більшою, ніж для бактерій у планктонній формі.

2. Хілак у високих концентраціях здатен руйнувати вже сформовані біоплівки утворені як MSSA, так і MRSA штамми. При зниженні концентрації хілаку у 8 разів, зафіксовано достовірне збільшення показників ОД ОЩ метицилінорезистентним штамом *S.aureus*.

Визначено, що Хілак зберігає свою антибактеріальну активність відносно біоплівкових культур штамів стафілококу, хоча МІК, при цьому, зростає у 8-16 разів.

Враховуючи те, що досліджені препарати призначають одночасно з антибіотиками і пробіотиками, перспективним вважаємо вивчення їх комплексного впливу на процес біоплівкоутворення та вибору комбінацій, здатних проявляти високу антибактеріальну активність як щодо планктонних, так і до біоплівкових культур патогенних та умовно патогенних бактерій.

Список літератури

- Алексеева Н.В. Разработка средств борьбы с биоплёнками: влияние препарата "Лапрот" (на основе человеческого лактоферрина) и антибиотика ципрофлоксацина на рост и процесс образования биоплёнок бактериями *Pseudomonas aeruginosa* in vitro /Н.В.Алексеева, Т.В.Степанова, Э.Р.Толордава // Медицинский алфавит. Лаборатория. - 2010. - №3. - С.4-9.
- Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий /И.В.Чеботарь, Н.А.Маянский, Е.Д.Кончакова [и др.] //Клин. микробиол. и антимикробная химиотерапия. - 2012. - №14(1). - С.51-58.
- Бухарин О.В. Влияние антистафилококкового антибиотика батумина на биоплёнообразование микроорганизмов /О.В.Бухарин, Л.Н.Чуркина, Н.Б.Перунова //Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиологии. - 2012. - №2. - С.8-12.
- Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организмах хозяина /А.Л.Гинцбург, Ю.М.Романова //Журнал микробиол. эпидемиол. и иммунобиологии. - 2011. - №3. - С.99-109.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика /С.Гланц; [пер. сангл.]. - М.: Практика, 1998. - 459с.
- Голуб А.В. Бактериальные биопленки - новая цель терапии? /А.В.Голуб //Клин. микробиол. и антимикробная химиотерапия. - 2012. - №14(1). - С.23-30.
- Лапач С.М. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel /С.М.Лапач, А.В.Чубенко, П.Н.Бабич. - К.: "МОРИОН", 2001. - 408с.
- Лиманова О.А. Избирательная модуляция роста позитивной флоры кишечника - новая концепция воздействия метаболитического пребиотика Хилак форте [Электрон. ресурс] /О.А.Лиманова, Е.И.Гарасько, И.Ю.Торшин, О.А.Громова. - Режим доступа: <http://www.pharmateca.ru/ru/archive/article/8684>
- Лямин А.В. Проблемы в медицине, связанные с бактериальными плёнками /Е.А.Боткин, А.В.Жестков //Клин. микробиол. и антимикробная химиотерапия. - 2012. - №14(4). - С.268-275.
- Микробные биопленки [Электрон. ресурс] /Н.В.Белобородова, И.Т.Байрамов. - Режим доступа : <http://dental/hygiene.ru>
- Наказ МОЗ України № 167. Про затвердження методичних вказівок "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів" [Електрон. ресурс] /МОЗ України. - Режим доступу: <http://mozdocs.kiev.ua>
- Хренов П.А. Обзор методов борьбы с микробными биопленками при воспалительных заболеваниях [Электр.ресурс] /П.А.Хренов, Т.В.Честнова. - Режим доступа : <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2013-1/4102.pdf>
- Чернявский В.И. Бактериальные биопленки и инфекции (лекция) /В.И.Чернявский //Annals of Mechnikov Institute. - 2013. - №1. - С.86-90.
- Adherence of Coagulase-Negative Staphylococci to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of Staphylococci to Medical Devices /G.D.Christensen, W.A.Simpson, J.J.Younger [et al.] //J. of clin. microbiology. - 1985. - Vol.22. - №6. - P.996-1006.
- Biofilm formation by *Salmonella* ssp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface /S.Stepanovic, L.Cirkovic, M.Ranin [et al.] //Letters Applied Microbiology. - 2004. - Vol.38(5). - P.428-32.
- Lazar V. Medical significance and new therapeutic strategies for biofilm associated infections /V.Lazar., M.C.Chifiruc //RoumArch. Microbiol. Immunol. - 2010. - Vol.69 (3). - P.125-138.

Деркач С.А., Воронкина И.А., Кхедер С.С., Габышева Л.С., Крылова И.А.

ВЛИЯНИЕ БИОЦИДНЫХ СРЕДСТВ (МИРАМИСТИНА И ХИЛАК) НА ПРОЦЕСС БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ S.AUREUS

Резюме. Проведено экспериментальное изучение влияния разных доз асептика мирамистина и пребиотика хилака на интенсивность биопленкообразования штаммами стафилококка (*S.aureus* ATCC 25923, MSSA, MRSA). Определена способность данных биоцидов проявлять антибактериальную активность, как в отношении планктонных форм, так и в отношении биопленочных культур *S.aureus*. Показано достоверное увеличение МИК препаратов относительно биопленочных культур, что следует учитывать при их практическом применении.

Ключевые слова: биопленки, стафилококк, Мирамистин, Хилак.

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

THE EFFECT OF BIOCIDAL PRODUCTS (MIRAMISTIN AND HYLAK) ON THE BIOFILMFORMATION PROCESS OF S.AUREUS

Summary. The experimental study of the effect of aseptics Miramistin and prebiotics Hilak in different doses on intensity biofilms formation by *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923, MSSA, MRSA). The ability of these biocides to show antibacterial activity both in terms of plankton and biofilm cultivations of *S.aureus* was defined. A significant increase in MIC of drug on the cultivation immobilized in biofilms was defined, that fact should be considered in their practical application.

Key words: Biofilm, *Staphylococcus*, Miramistin, Hylak.

Рецензент - д.мед.н., профессор Бабич Е.М.

Стаття надійшла до редакції: 13.10.2015 р.

Деркач Світлана Андріївна - к.мед.н., ст. наук. співроб., зав. лабораторії анаеробних інфекцій ДУ "ІМІ НАМН"; doctorderkach@ukr.net

Воронкіна Ірина Анатоліївна - к.мед.н., ст. наук. співроб., учений секретар ДУ "ІМІ НАМН"; voronkina2008@ukr.net

Кхедер Саїд Салех - аспірант ДУ "ІМІ НАМН"; seevos@gmail.com

Габышева Людмила Степанівна - к.мед.н., доцент кафедри мікробіології, вірусології та імунології ХНМУ; gabich@ukr.net

Крылова Ірина Анатоліївна - наук. співроб. лабораторії анаеробних інфекцій ДУ "ІМІ НАМН"; voronkina2008@ukr.net