

ВПЛИВ АЗИТРОМІЦИНУ НА БІОПЛІВКИ *S. AUREUS* НА ПРИКЛАДІ ГОСПІТАЛЬНИХ ІЗОЛЯТІВ, ВИДІЛЕНИХ З ВМІСТУ ГНІЙНИХ РАН

¹Київський національний університет технологій та дизайну (м. Київ, Україна)

²Комунальне неприбуткове підприємство «Київська обласна клінічна лікарня» (м. Київ, Україна)
olgaungin@gmail.com

Представники роду *Staphylococcus* на сьогодні є надзвичайно поширеними в умовах стаціонару лікарень. Крім того, що *S. aureus* є представником нормофлори шкіри та слизових людини, він також є патогеном, що викликає серйозні інфекції, які важко піддаються антибіотикотерапії. Здатність стафілококів формувати біоплівки ускладнює лікування інфекції, часто провокує хронізацію процесу та знижує ефективність використання антибіотиків. Одним з успішно застосованих для лікування *S. aureus*-асоційованих інфекцій антибіотиків є макролідний антибіотик азитроміцин (AZM). Метою роботи було оцінити вплив азитроміцину на біоплівки *S. aureus* на прикладі колекційного штаму та госпітальних ізолятів, що були виділені з вмісту гнійних ран українських пацієнтів. В роботі використовували колекційний штам *S. aureus* ATCC 25923 та госпітальні ізоляти *S. aureus* 1536 та 190, які були виділені та ідентифіковані на базі Комунального неприбуткового підприємства «Київська обласна клінічна лікарня» (м. Київ). Чутливість штамів та біоплівкоутворення визначали за допомогою класичних методів (методу мінімальних інгібуєчих концентрацій та Е-стріпів відповідно до міжнародних рекомендацій EUCAST та методу визначення біоплівок з кристалічним фіолетовим). Було визначено MIC для планктонної та біоплівкової форми росту культур. MIC для біоплівкової форми значно перевищувало цей показник для планктонної форми культур. Крім того, було встановлено рівень виживаності клітин та рівень адгезії до поверхні за досліджуваного діапазону концентрацій азитроміцину (0-32 мкг/мл). Показано, що для госпітальних ізолятів рівень адгезії збільшувався на фоні підвищення концентрації антибіотику з одночасним зниженням виживаності клітин. Це можна пояснити явищем «керованої самопожертви» частини клітин для виживання популяції в цілому. Диференційований вплив AZM на колекційний штам та госпітальні ізоляти *S. aureus* є важливим з огляду на необхідність розробки схем лікувань *S. aureus*-асоційованих інфекцій з урахуванням MIC для біоплівкової форми росту збудника.

Ключові слова: *S. aureus*, біоплівки, азитроміцин, госпітальні ізоляти.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Роботу виконано в рамках держбюджетної тематики «Розробка комплексного препарату комбінованої дії на основі похідних колагену для лікування раневих поверхонь», № державної реєстрації 0120U101290.

Вступ. *Staphylococcus aureus* є представником нормальної мікрофлори людини та важливим патогеном, що викликає широкий діапазон захворювань – від

раневих інфекцій до гостих запальних процесів таких, як септицемія, ендокардит та септичний шок [1]. Здатність стафілококів формувати біоплівки ускладнює лікування інфекції та часто провокує хронізацію процесу. Відомо, що представники роду *Staphylococcus* від природи мають досить високий рівень чутливості до антибактеріальних препаратів (наприклад, бета-лактамів, аміноглікозидів, фторхінолонів, макролідів, лінкозамідів, глікопептидів, рифампіцину) [2].

Одним з ефективних антибіотиків, що використовуються наразі для лікування *S. aureus*-асоційованих інфекцій, є азитроміцин (AZM). Це антибіотик групи макролідів, широкого спектру дії проти грам-позитивних та грам-негативних бактерій. Крім антимікробних властивостей, цей антибіотик має ще й протизапальні [3].

Патогенез багатьох ортопедичних інфекцій пов'язаний з присутністю мікроорганізмів у формі біоплівок [4]. Біоплівкою за визначенням називають стратегію росту мікроорганізмів, під час якої клітини прикріплюються до поверхні або інтерфазу та синтезують полімерний матрикс, що вкриває інтактні клітини. У біоплівках мікроорганізми функціонують як угруповання зі структурною та функціональною неоднорідністю, подібною до багатоклітинної [5]. Відомо, що MIC антибіотиків для планктонних клітин мікроорганізмів значно менші у порівнянні з такими для біоплівок [6, 7].

Метою дослідження було оцінити вплив азитроміцину на біоплівки *S. aureus* на прикладі колекційного штаму та госпітальних ізолятів, що були виділені з вмісту гнійних ран українських пацієнтів.

Об'єкт і методи дослідження. Госпітальні ізоляти *S. aureus* були виділені на базі Комунального неприбуткового підприємства «Київська обласна клінічна лікарня» (м. Київ) у період квітень 2019 – квітень 2020. Таксономічне визначення ізолятів здійснювали з використанням мікробіологічного аналізатора VITEK 2 compact 15 (Франція). Чутливість штамів визначали за допомогою методу мінімальних інгібуєчих концентрацій та з використанням Е-стріпів Liofilchem MTS Azithromycin [AZM] 0,016-256 мкг/мл відповідно до міжнародних рекомендацій EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). В роботі використовували колекційний штам *S. aureus* ATCC 25923 та госпітальні ізоляти *S. aureus* 1536 та 190. Ізоляти 1536 та 190 були визначені як метицилін-чутливі (MSSA). Формування біоплівок оцінювали за стандартною методикою з кристалічним фіолетовим [8] з використанням плашкового спектрофотометра HiPPO-96 (Biosan, Латвія).

Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням програми та електронних таблиць

MS Excel 2007. Вірогідність відмінностей кількісних результатів визначали за допомогою t-критерію Стьюдента та стандартних відхилень ($M \pm m$).

Результати досліджень та їх обговорення. При застосуванні AZM було показано, що MIC для планктонних клітин колекційного штаму та госпітальних ізолятів відрізняються (табл.).

Таблиця – Приріст біомаси досліджуваних штамів в концентраційному діапазоні AZM

Штам	Показник приросту біомаси (од.опт.густ.) за концентрації AZM, мкг/мл			
	0	2	4	8
ATCC 25923	1,07±0,05	0,11±0,05	0,12±0,02	0,04±0,005
1536	1,29±0,01	1,35±0,03	1,35±0,05	0,03±0,003
190	1,00±0,02	0,90±0,005	0,11±0,005	0,06±0,002

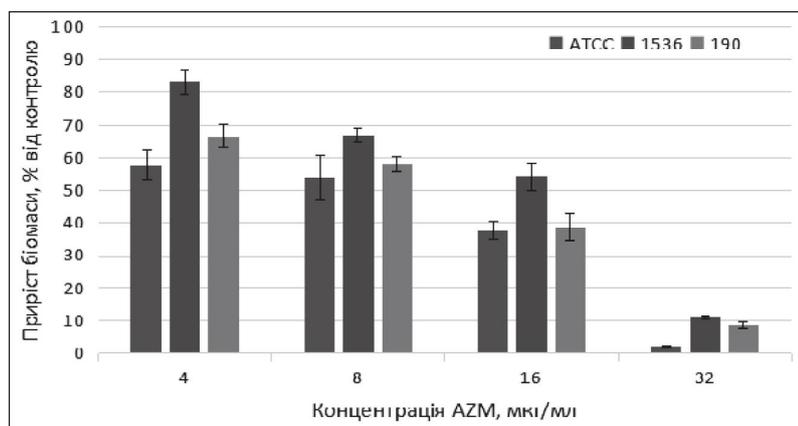


Рисунок 1 – Вживаність клітин *S. aureus* при культивуванні в концентраційному діапазоні AZM (біоплівкова форма).

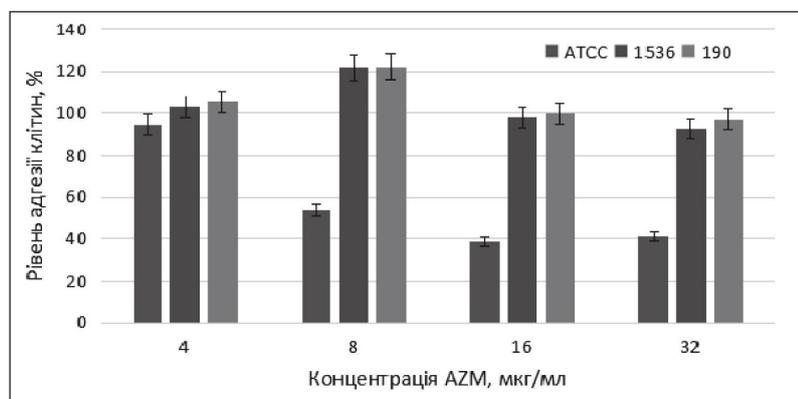


Рисунок 2 – Рівень адгезії клітин *S. aureus* при культивуванні в концентраційному діапазоні AZM (біоплівкова форма).

Так, MIC для *S. aureus* ATCC 25923 складав 2 мкг/мл. Для госпітальних ізолятів 1536 та 190 складає ці значення становили 8 та 4 мкг/мл, відповідно.

При визначенні MIC для планктонних клітин, не береться до уваги метаболічна активність клітин та адгезія клітин до поверхні, що має вкрай важливе значення за біоплівкової форми росту мікроорганізмів. Адже, різні шари біоплівок, зазвичай, значно відрізняються за метаболічною активністю клітин і, відповідно, їх здатністю взаємодіяти з антибіотиком.

При оцінці впливу AZM на біоплівки досліджуваних культур брали до уваги дві складові: вживаність клітин за оптичною густиною та ступінь адгезії клітин до поверхні. Вживаність клітин (% від контролю) при

культивуванні досліджуваних штамів в концентраційному діапазоні AZM представлена на **рис. 1**.

Як видно з **рис. 1** вживаність культур в біоплівковій формі росту значно відрізнялася від планктонної. Так, MIC для біоплівкової форми *S. aureus* становили 32 мкг/мл – це в 16, 4 та 8 разів більше, відповідно, у порівнянні з MIC для планктонної форми росту зазначених культур. Рівень вживаності або продуктивності не завжди корелює з рівнем адгезії клітин до поверхні. Так, рівень адгезії колекційного штаму та госпітальних ізолятів відрізнялися в досліджуваному концентраційному діапазоні AZM (**рис. 2**).

Рівень адгезії колекційного штаму знижувався зі збільшенням концентрації антибіотику в середовищі і зниженням чисельності клітин. Натомість, рівень адгезії госпітальних ізолятів збільшувався на фоні підвищення концентрації антибіотику до 8 мкг/мл. При подальшому підвищенні концентрації антибіотику рівень адгезії госпітальних ізолятів залишався на рівні контролю.

Також треба зазначити, що навіть за мінімальної вживаності клітин за концентрації 32 мкг/мл рівень адгезії до поверхні відповідав контрольним показникам.

Факт підвищення адгезії клітин за концентрації, що відповідає MIC для цих ізолятів, планктону можна пояснити явищем «керованої самопожертви» [9], коли частина популяції гине задля виживання всієї популяції і скорішої адаптації до несприятливих умов. Вірогідно, концентрації 4-8 мкг/мл, що є летальними для планктонних клітин, стимулюють перехід планктонних клітин в осілі і, таким чином, закономірно стимулюють утворення біоплівки. На користь цієї ідеї свідчить також факт одночасного зниження вживаності клітин госпітальних ізолятів за вказаних концентрації (**рис. 1**). Крім того, за мінімальних концентрацій антибіотика клітини, що загинули, під час утворення біоплівки можуть формувати перший шар, який безпосередньо контактує з поверхнею. Цим також можна пояснити ситуації, коли мікроорганізми посилюють формування біоплівок за впливу антибіотиками, у концентраціях, що показані для унеможливлення росту планктону [10].

Висновки. Таким чином, спостерігали диференційований вплив AZM на колекційний штаму та госпітальні ізоляти *S. aureus*, що є важливим з огляду розробки схем лікувань *S. aureus*-асоційованих інфекцій та визначення MIC для планктонної та біоплівкової форми росту збудника.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується пошук комбінацій антимікробних речовин для унеможливлення росту і розвитку біоплівок мікроорганізмів – збудників опортуністичних інфекцій.

Література

1. Gui Z, Wang H, Ding T, Zhu W, Zhuang X, Chu W. Azithromycin reduces the production of α -hemolysin and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Indian journal of microbiology*. 2014;54(1):114-117.
2. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*. 2009;7(9):629-641.
3. Hu H, Ramezani M, Hayes AJ, Liu S, Psaltis AJ, Wormald PJ, et al. Sub-inhibitory clindamycin and azithromycin reduce *S. aureus* exoprotein induced toxicity, inflammation, barrier disruption and invasion. *Journal of clinical medicine*. 2019;8(10):1617.
4. Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. 2005;437:41-47.
5. Muhammad MH, Idris AL, Fan X, Guo Y, Yu Y, Jin X, et al. Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in microbiology*. 2020;11:928.
6. Tré-Hardy M, Vanderbist F, Traore H, Devleeschouwer MJ. In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. *International journal of antimicrobial agents*. 2008;31(4):329-336.
7. Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(3):888-895.
8. Xu Z, Liang Y, Lin S, Chen D, Li B, Li L, et al. Crystal violet and XTT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. *Current microbiology*. 2016;73(4):474-482.
9. Popp PF, Mascher T. Coordinated cell death in isogenic bacterial populations: sacrificing some for the benefit of many? *Journal of molecular biology*. 2019;431(23):4656-4669.
10. Ahmed MN, Porse A, Sommer MOA, Høiby N, Ciofu O. Evolution of antibiotic resistance in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa* populations exposed to subinhibitory levels of ciprofloxacin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018;62(8):e00320-18.

ВПЛИВ АЗИТРОМІЦИНУ НА БІОПЛІВКИ *S. AUREUS* НА ПРИКЛАДІ ГОСПІТАЛЬНИХ ІЗОЛЯТІВ, ВИДІЛЕНИХ З ВМІСТУ ГНІЙНИХ РАН

Ластовецька Л. О., Маслак В. І., Калініченко О. О., Поточилова В. В., Руднева К. Л., Юнгін О. С.

Резюме. Одним з поширених в умовах стаціонарів лікарень патогенів на сьогодні є *S. aureus*. Патогенез багатьох ортопедичних інфекцій пов'язаний з присутністю мікроорганізмів у формі біоплівки. Біоплівки – це форма росту мікроорганізмів, що дозволяє популяції проявляти ознаки багатоклітинного організму. Здатність стафілококів формувати біоплівки ускладнює лікування інфекції та часто провокує хронізацію процесу. Одним з ефективних засобів, що використовується наразі для лікування *S. aureus*-асоційованих інфекцій, є макролідний антибіотик азитроміцин (AZM).

Метою роботи було оцінити вплив азитроміцину на біоплівки *S. aureus* на прикладі колекційного штаму та госпітальних ізолятів, що були виділені з вмісту гнійних ран українських пацієнтів.

Об'єкт і методи дослідження. В роботі використовували колекційний штам *S. aureus* ATCC 25923 та госпітальні ізоляти *S. aureus* 1536 та 190, які були виділені та ідентифіковані на базі Комунального неприбуткового підприємства «Київська обласна клінічна лікарня» (м. Київ). Чутливість штамів та біоплівкоутворення визначали за допомогою класичних методів (методу мінімальних інгібуєчих концентрацій та з використанням Е-стріпів відповідно до міжнародних рекомендацій EUCAST та методу визначення біоплівок з кристалічним фіолетовим).

Результати. Було показано MIC для планктонної та біоплівкової форми росту штамів, а також виживаність клітин та рівень адгезії за діапазону концентрацій азитроміцину 0-32 мкг/мл. MIC для біоплівкової форми *S. aureus* становило 32 мкг/мл, що в кілька разів перевищувало цей показник для планктонної форми культури. Показано, що для госпітальних ізолятів рівень адгезії збільшувався на фоні підвищення концентрації антибіотику, що можна пояснити явищем «керованої самопожертви» частини клітин популяції. Одночасно з цим спостерігали зниження виживаності клітин за цих концентрацій антибіотику, що також свідчить на користь зазначеної ідеї.

Висновки. Диференційований вплив AZM на колекційний штам та госпітальні ізоляти *S. aureus* є важливим з огляду на актуальність розробки схем лікувань *S. aureus*-асоційованих інфекцій та визначення MIC для планктонної та біоплівкової форми росту збудника.

Ключові слова: *S. aureus*, біоплівки, азитроміцин, госпітальні ізоляти

THE EFFECT OF AZITHROMYCIN ON *S. AUREUS* BIOFILMS ATCC STRAIN AND CLINICAL ISOLATES FROM CHRONIC WOUNDS

Lastovetska L. O., Maslak V. I., Kalinichenko O. O., Potochilova V. V., Rudnieva K. L., Iungin O. S.

Abstract. Today one of the most common and severe pathogens in hospital environments is *S. aureus*. Pathogenesis of most orthopedic infections is associated with biofilms formation. Biofilms are a mode of bacterial growth helped microbial community to show signs of a multicellular organism. The ability of staphylococci to form biofilms complicated the treatment of infection and often turns the process into chronic stage. One of the effective agents currently used to treat *S. aureus*-associated infections is the macrolide antibiotic azithromycin (AZM).

The aim of the study was to evaluate the effect of azithromycin on *S. aureus* biofilms used the example of a collection strain and clinical isolates from the contents of chronic wounds of Ukrainian patients.

Materials and methods. The ATCC strain *S. aureus* 25923 clinical isolates *S. aureus* 1536 and 190 were used in this study. Clinical cultures were isolated and identified in Kyiv Regional Clinical Hospital (Kyiv). antibiotic resistance and biofilm formation was determined using classical methods (minimal inhibitory concentrations method and MIC Test Strips according to EUCAST and crystal violet assay).

Results. MICs was shown for planktonic and biofilm forms, as well as cell survival rate and adhesion levels concentration range of azithromycin 0-32 μ g/ml. MICs for *S. aureus* biofilms was 32 μ g/ml, which is several times higher than for planktonic cells. It was shown that adhesion level of hospital isolates increased with increasing

of antibiotic concentration. This fact could be explained by the phenomenon of «coordinated cell death» idea. A decrease in cell survival rate was also demonstrated for these concentration of AZM.

Conclusions. The differentiated effect of AZM on ATCC strain and *S. aureus* clinical isolates should be taken into account according to the importance of development adequate treatment strategies for *S. aureus*-associated infections and determining MICs for planktonic and biofilm modes of bacterial growth.

Key words: *S. aureus*, biofilms, azithromycin, clinical isolates.

ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Lastovetska L. O.: –^B

Maslak V. I.: –^B

Kalinichenko O. O.: –^B

Potochilova V. V.: 0000-0002-4927-7946^{BCEF}

Rudnieva K. L.: 0000-0002-7834-233X^{BCEF}

Iungin O. S.: 0000-0001-8876-6075^{ADEF}

Конфлікт інтересів:

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Адреса для кореспонденції

Юнгін Ольга Сергіївна

Київський національний університет технологій та дизайну

Адреса: Україна, 01011, м. Київ, вул. Немировича-Данченка 2

Тел.: 0939822644

E-mail: olgaungin@gmail.com

A – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Рецензент – проф. Небесна З. М.

Стаття надійшла 03.05.2021 року

Стаття прийнята до друку 14.11.2021 року