



УДК 579:61

## Фаготип і чутливість до антибіотиків плівкотвірних штамів *Staphylococcus aureus*, виділених із дихальних шляхів

О.С. Воронкова, О.А. Сірокваша, Т.М. Шевченко, А.І. Вінніков

*Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна*

Проведено фаготипування штамів стафілококів, здатних до утворення біоплівки. В експерименті встановлено, що здатністю до утворення біоплівки володіли 61,5% виділених штамів золотистого стафілокока. Чутливість до фагів із Міжнародного набору проявляли 53,8% досліджених штамів золотистого стафілокока. Із штамів, що давали позитивну відповідь, 64,3% – чутливі до одного з фагів, до двох і трьох фагів чутливі 21,4% та 14,3% відповідно. Виділені штами чутливі до таких фагів: 81 – 42,9%, 75 – 35,7%, 47 та 53 – по 28,6%. Усі випадки виявлення чутливості до фага 47 збігалися зі здатністю утворювати біоплівку та стійкістю до еритроміцину, амоксициліну та тетрацикліну та у 50% випадків – зі стійкістю до гентаміцину, у 25% – до ципрофлоксацину. Серед неплівкотвірних штамів чутливих до фага 47 не було.

*Ключові слова:* біоплівка; фаготипування; діагностичні препарати бактеріофагів; стафілококи; стійкість до антибіотиків

## Phage type and sensitivity to antibiotics of *Staphylococcus aureus* film-forming strains isolated from airway mucosa

O.S. Voronkova, O.A. Sirokvasha, T.N. Shevchenko, A.I. Vinnikov

*Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine*

Today film-forming strains of bacteria play very important role in clinical pathology. Staphylococci are ones of most dangerous of them. This bacteria can determine different pathological processes, for example, complication of airway mucosa. The ability to form a biofilm is one of the main properties of nosocomial strains. These strains should be monitored and their carriers are to be properly treated. To determine the origin of staphylococci strains we used bacteriophages from the International kit. The aim of research was to determine the phage type of staphylococci film-forming strains, that were isolated from naso-pharyngeal mucosa. Phage typing has been carried out for 16 film-forming strains of *S. aureus*. To solve this problem, we used the International phage kit by Fisher's method. As a result, sensitivity to phages from the International kit showed 53.8% of studied strains of *S. aureus*. 64.3% of sensitivity strains were lysed by one of the phage, 21.4% – were by two of the phages, 14.3% – by three of the phages. Isolates were sensitive to phages: 81 – 42.9%, 75 – 35.7%, 28.6% were sensitive to phages 47 and 53. All cases of detection of sensitivity to phage 47 coincided with the ability to form biofilm. Among non-film-forming strains there was no sensitive strains for this phage. Film-forming strains resist to erythromycin (62.5%), ciprofloxacin (43.8%), gentamicin (56.3%), tetracycline (87.5%), amoxicillin (93.8%), and cefuroxime (37.5%). All cases of sensitivity to phage 47 coincided with resistance to erythromycin, amoxicillin and tetracycline. For two of these strains, we also defined resistance to gentamicin and for one of them – to ciprofloxacin. Results of research allowed to relate the bacterial cultures for determining the type. This may have implications for studying of film-forming ability, because surface structures of bacterial cell take place in this process. Belonging of an isolate to specific phage type may indicate possible differences in the structure of the cell wall, composition of the cytoplasmic membrane, receptors, etc. So, phage typing may be used as one of tests to study film-forming processes. Besides, phage typing can be helpful in finding of the source and modes of transmission of nosocomial strains of bacteria. Given the increased level of antibiotic resistance among film-forming strains of staphylococci, the importance of this monitoring is indisputable, because spreading of these strains may cause the failure of therapy.

*Keywords:* biofilm; phage typing; diagnostic bacteriophages kit; staphylococci; antibiotic resistance

## Вступ

Стафілококи посідають сьогодні одне з провідних місць у структурі захворюваності, зумовленої умовно-патогенними мікроорганізмами. Вони є одними з найчастіше виявлених бактерій як у здорових осіб (носійство), так і серед пацієнтів лікарняних закладів. Носійство стафілококів майже здоровими людьми та особливо медичним персоналом вельми поширене, але воно майже не реєструється та виявляється лише при травмах і зниженні захисних сил макроорганізму (Murchan and Carter, 2000; Savchuk, 2003; Paul-Satyaseela et al., 2011; Kaimal et al., 2012; Falova et al., 2013).

Серед причин стафілококових захворювань можна відзначити численні епідеміологічні аспекти, пов'язані зі збільшенням контингенту осіб зі зниженою опірністю організму, концентрацією міського населення, внутрішньолікарняною циркуляцією полірезистентних штамів, дефектами у тактиці антибіотикотерапії тощо (Labinskaia and Volina, 2008; Bondarenko, 2011). У зв'язку із цим необхідний моніторинг штамів стафілококів, які циркулюють у лікарняних закладах та поза ними, що має на меті виявлення джерел поширення цих бактерій (Kali et al., 2013). Для моніторингу штамів використовують Міжнародний набір фагів для типування золотистого стафілокока (Blair and Williams, 1961; Akimkin et al., 2010).

Певної значущості питання фаготипування набуває у зв'язку з поширенням серед клінічних ізолятів стафілококів, здатних до утворення біоплівки. Перебування в останньому стані надає штамам переваг виживаності за негативних умов оточення, особливо за умов використання з лікувальною метою антибіотиків. У структурі біоплівки бактерії набувають ознак підвищення резистентності до антимікробних препаратів (Fujisawa and Ishihara, 1968; Olson et al., 2002; Ilyina, 2004; Mehndiratta et al., 2010). Фаготипування може допомогти вирішити проблему встановлення джерела поширення стафілококів, що дозволить розробити ефективні заходи санації (Pantucek et al., 2004).

Відповідно до цього, метою даної роботи було визначити фаготипи штамів золотистого стафілокока, здатних до утворення біоплівки, виділених із верхніх дихальних шляхів.

## Матеріал і методи досліджень

Дослідження зі штамми стафілококів проводили на базі лабораторії мікробіології НДІ гастроентерології НАМН України (м. Дніпропетровськ). Матеріал від здорових осіб відбирали з носоглотки та зіва двома стерильними ватними тампонами промислового виробництва. Ідентифікацію стафілококів проводили за ознаками, наведеними у Визначнику бактерій Берджі (Holt et al., 1994).

Для досліджень відбирали всі зразки, що містили грампозитивні коки (Volkov, 1999; Labinskaia and Volina, 2008). За умов виявлення останніх методом мікроскопії висівали матеріал штрихом на живильні середовища: сольовий агар, 5% кров'яний агар, цукровий бульйон і

середовище для контролю стерильності. Інкубували за +37 °С протягом 18–24 годин. У разі виявлення росту проводили відсівання окремих колоній на жовтково-сольовий агар (About unification..., 1985; Holt et al., 1994). Із колоній відбирали матеріал для подальшої ідентифікації. Належними до роду *Staphylococcus* вважали бактерії, що давали ріст на середовищі Чистовича, ферментували глюкозу в анаеробних умовах з утворенням кислоти. Для встановлення належності до *S. aureus* проводили тест на виявлення плазсмокоагулази та ферментацію маніту в анаеробних умовах з утворенням кислоти. За наявності плазсмокоагулази та утворення кислоти з маніту при анаеробіозі штамп вважали належним до вказаного виду.

Для визначення здатності до формування біоплівки чисту культуру виділеного штаму висівали в лунки імунологічного планшета у кількості не менше  $10^5$  КУО/мл. Планшет інкубували за +37 °С протягом 3 діб. Якщо у цей період формувалася біоплівка (поверхневий чи придонний ріст у лунці, що давав плівку, яка у разі видалення середовища осідала на стінках) штамп вважали плівкотвірним. На один 96-лунковий імунологічний планшет засівали по 3 комірці для кожного штаму. Відповідь про здатність до плівкоутворення вважали позитивною, якщо принаймні у одній лунці з трьох формувалася плівка протягом 72 годин.

Вивчення чутливості до антибіотиків проводили відповідно до наказу МОЗ України «Про затвердження методичних вказівок щодо визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» (Approval ..., 2007). Із добової культури готували суспензію з умістом клітин  $1 \times 10^6$  кл./мл. На стерильну чашку з МПА наносили 0,1 мл отриманої суспензії. Шпателем розтирали краплю по поверхні для рівномірного розподілу матеріалу. Стерильним пінцетом диски з антибіотиками розкладали по поверхні живильного середовища, засіяного культурою стафілокока. На одну чашку уміщували 6 дисків з антибіотиками еритроміцином, ципрофлоксацином, гентаміцином, тетрацикліном, амоксициліном і цефуроксимом. Облік результатів проводили через 24 години після розкладання дисків. Чутливість штаму визначали на основі вимірювання зони затримання росту навколо диска.

Для визначення чутливості штамів до бактеріофагів застосовували метод Фішера. Готували суспензію клітин чистої добової агарової культури вивчених ізолятів, яка містила  $1 \times 10^5$  кл./мл. Отриману суспензію у об'ємі 0,5 мл наносили на поверхню добре підсушеного МПА та розтирали шпателем. Підсушували за кімнатної температури протягом 20–30 хвилин. На отриманий газон із нанесеною культурою інсуліновим шприцом по одній краплі (близько 0,05 мл) наносили зразки препаратів фагів. Після підсихання крапель фагів чашки інкубували у термостаті за +37 °С протягом 18–24 годин. Наявність зони лізису свідчила про чутливість вивченого штаму до фага (Blair and Williams, 1961; Dzahurov and Rezerov, 1995; Labinskaia and Volina, 2008).

Для фаготипування використовували фаги 42E, 42D, 47, 53, 55, 75 та 81 зі стандартного Міжнародного набору для фаготипування. Позитивну оцінку чутливості до фагів визначали на підставі трьох окремих досліджень.

## Результати та їх обговорення

За наслідками ідентифікації ізолятів бактерій, виділених від осіб із хронічним носійством, визначено, що 26 штамів належали до *Staphylococcus aureus*. Із них 16 (61,5%) штамів здатні до утворення біоплівки. Для цих штамів досліджено фаговий профіль (табл.).

Таблиця

Фаготипи виділених штамів *Staphylococcus aureus*

Штам <i>S. aureus</i>	Фаговий профіль
1	47
2	53, 55
3	47, 75, 81
4	81
5	81
6	–
7	–
8	–
9	53
10	47, 75, 81
11	47
12	–
13	53
14	–
15	–
16	–

До застосованих фагів проявили чутливість 9 (56,3%) штамів золотистого стафілокока, решта – 7 (43,7%) – не чутливі до жодного з використаних фагів. Із штамів, що давали позитивну відповідь, 64,3% чутливі до одного з фагів, до двох та трьох фагів чутливі 21,4% та 14,3% відповідно. Найчастіше виділені штами виявлялися чутливими до фагів: 81 – 42,9%, 75 – 35,7%, 47 та 53 – по 28,6%. До фагів 42E та 42D чутливих штамів не визначено.

За низкою даних (Ekmuzheva and Khadzegova, 2003; Falova et al., 2013) фаговий профіль і взагалі сама можливість фаготипування культур можуть відрізнятися залежно від того, звідки вони виділені. Вказується на відмінності згаданих ознак для штамів стафілококів, виділених із поверхні шкіри здорових осіб і осіб із дерматитами (Falova et al., 2013). Розбіжність у відсотках штамів, що можуть бути фаготиповані, невелика, натомість фаговий профіль для штамів стафілококів, виділених від осіб із дерматитами, значно більший. Крім того, відмічено, що найбільший відсоток штамів типовано фагами третьої групи. Подібні ж тенденції описано і для штамів стафілококів, виділених із піхви здорових жінок (Ekmuzheva and Khadzegova, 2003). У наших дослідженнях також показано, що більшість штамів типувалися фагами третьої групи: 7 з 9 штамів (77,8%) типувалися принаймні одним із фагів групи 3. До змішаної групи належали 2 штами, які одночасно типувалися більше ніж 2 фагами, і один штам взаємодіяв із фагом 55, належним до другої групи. Із фагом четвертої групи – 42D – реакції не було.

Усі випадки виявлення чутливості до фага 47 збігалися зі здатністю утворювати біоплівку, жоден із неплівкотвірних штамів не був чутливим до цього фага. Інші фаги викликали лізис у штамів як здатних, так і не здатних до утворення біоплівки. У складі біоплівки бактерії набувають ознак підвищеної резистентності до

антибіотиків. У нашому дослідженні показано, що виділені плівкотвірні штами були стійкими до еритроміцину (62,5%), ципрофлоксацину (43,8%), гентаміцину (56,3%), тетрацикліну (87,5%), амоксициліну (93,8%) та цефуроксиму (37,5%). Всі випадки визначення чутливості до фага 47 збігалися з резистентністю щонайменше до трьох із застосованих антибіотиків. Усі чотири чутливі до вказаного фага штами стійкі до еритроміцину, амоксициліну та тетрацикліну. Для двох із цих штамів також визначено стійкість до гентаміцину, а для одного – до ципрофлоксацину. Отримані дані частково погоджуються з матеріалами інших дослідників (Agunava et al., 2013): вказується на зв'язок між чутливістю до фага 47 та стійкістю до антибіотиків, що збігається з отриманими нами даними, натомість у нашому дослідженні взагалі не визначено чутливості до фага 42E, яка також відмічена для антибіотикорезистентних штамів стафілококів у вказаній роботі.

За ознакою специфічності виділяють полівалентні бактеріофаги, які лізують культури з однієї родини або роду бактерій, моновалентні (монофаги) – лізують культури тільки одного виду бактерій, а також типові бактеріофаги, які вирізняються найвищою специфічністю та здатні викликати лізис тільки певних типів (варіантів) бактеріальної культури всередині виду бактерій. Із цього погляду, зроблений нами аналіз штамів, відповідно до їх специфічності, дозволяє чітко віднести культури до певних фаготипів. Це може вказувати на можливу наявність відмінностей у структурі клітинної стінки, складі цитоплазматичної мембрани, рецепторів тощо, що, у свою чергу, може мати ключове значення для вивчення формування біоплівок. В останньому процесі важливу роль відіграють саме поверхневі структури бактеріальної клітини. Отже, тест на фаготип може стати одним із тестів для відстеження динаміки процесу плівкоутворення.

За допомогою методу фаготипування можна встановити джерело та шляхи передачі інфекційного захворювання, тобто провести його епідеміологічний аналіз, оскільки він дозволяє порівнювати фаготип (фаговари) чистих культур бактерій, виділених у ході бактеріологічного дослідження від хворого й осіб що оточують його, можливих бактеріоносіїв (Pantucek et al., 2004; Labinskaia and Volina, 2008). Подібне дослідження може стати в нагоді під час розробки методів виявлення та санації носійства нозокоміальних штамів серед персоналу лікувально-профілактичних закладів. Особливу значущість цей моніторинг має щодо здатних до плівкоутворення штамів стафілококів, поширення яких зумовлює зростання рівня резистентності до антибіотиків і спричинює невдачі терапії (Donlan and Costerton, 2002; Mehndiratta et al., 2010).

## Висновки

Здатність до плівкоутворення виявлена у 16 (61,5%) штамів золотистого стафілокока, виділених із верхніх дихальних шляхів людей. 64,3% досліджених штамів золотистого стафілокока чутливі до одного з фагів із Міжнародного набору для фаготипування стафілококів,

до двох та трьох фагів чутливі 21,4% та 14,3% відповідно. Чутливість досліджених штамів показана до фагів: 81 – 42,9%, 75 – 35,7%, 47 та 53 – по 28,6%. До фагів 42E та 42D чутливих штамів не визначено. Всі випадки виявлення чутливості до фага 47 збігалися зі здатністю утворювати біоплівку.

Виділені плівкотвірні штами стійкі до еритроміцину (62,5%), ципрофлоксацину (43,8%), гентаміцину (56,3%), тетрацикліну (87,5%), амоксициліну (93,8%) та цефуроксиму (37,5%). Усі випадки визначення чутливості до фага 47 збігалися з резистентністю до еритроміцину, амоксициліну та тетрацикліну. Для двох із чутливих до фага 47 штамів також визначено стійкість до гентаміцину, а для одного – до ципрофлоксацину.

### Бібліографічні посилання

- Akimkin, V.H., Darbeeva, O.S., Kolkov, V.F., 2010. Bakteriophagy: Istoricheskie i sovremennye aspekty ih primeneniia: Opit i perspektivi [Bacteriophages: Historical and contemporary aspects of their application: Experience and prospects]. *Clinical Practice* 4, 48–54 (in Russian).
- Arunava, K., Selvaraj, S., Umadevi, S., Shailesh, K., Noyal, M., Sreenivasan, S., Joshy, M.E., 2013. Bacteriophage types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital. *Australas. Med. J.* 6(10), 496–503.
- Blair, J.E., Williams, R.E.O., 1961. Phage typing of staphylococci. *Bull WHO* 24, 771–778.
- Bondarenko, V.M., 2011. Rol uslovno-patogennih bakterii pri chronicheskikh vospalitelnykh processakh razlichnoi lokalizatsii [The role of opportunistic bacteria in chronic inflammatory processes of different localization]. *Triada, Tver* (in Russian).
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2), 167–193.
- Dzahurov, S.H., Rezepov, F.F. (Eds.), 1995. Spravochnik po primneniiu bakteriinih i virusnih preparatov [Handbook of bacterial and viral preparations application]. *Medicine, Moscow* (in Russian).
- Ekmuzheva, D.Z., Khadzegova, S.B., 2003. Kharakteristika normalnoy mikroflory vlagalisha u zdorovykh zhenshin reproduktivnogo vozrasta [Characteristic of the normal vaginal microflora in healthy women of reproductive age]. *Uspekhi Sovremennogo Estestvoznaniya* 6, 50–51.
- Falova, O.E., Potaturkina-Nesterova, N.I., Ilina, E.N., 2013. Vzaimosviaz vnutrividovogo raznobraziia i geneticheskikh determinant patogenosti stafilokokkov kozhi [Interrelation of intraspecific variety and genetic determinants of skin's staphylococcus pathogenicity]. *Fundamental Research* 12, 131–134 (in Russian).
- Fujisawa, H., Ishihara, K., 1968. Penicillin resistance correlated with phage types in *Staphylococcus aureus*. *Japan. J. Microbiol.* 12(1), 1–6.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (Eds.), 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Ilyina, T.S., Romanova, Y.M., Hinzburh, A.L., 2004. Bioplenki kak sposob sushestvovaniia bakterii v okruzhaiushei srede i orhanisme hoziaina: Fenomen, heticheskii kontrol i sistemi rehuliacii ih razvitiia [Biofilms as a way of existence of bacteria in the environment and the host organism: The phenomenon, the genetic control system and the regulation of their development]. *Genetic.* 40, 1–12 (in Russian).
- Kaimal, S., D'Souza, M., Sistla, S., Parija, S.C., 2012. Phage typing in dermatitis cruris pustulosa et atrophicans: Does staphylococcal carrier status have a role? *Int. J. Dermatol.* 51(11), 1335–1339.
- Kali, A., Stephen, S., Sivaraman, U., Kumar, S., Joseph, N.M., Srirangaraj, S., Easow, J.M., 2013. Bacteriophage types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a tertiary care hospital. *Australas. Med. J.* 6(10), 496–503.
- Labinskaia, A.S., Volina, Y.H. (Eds.), 2008. *Rukovodstvo po medicinskoj mikrobiologii. Obshaia i sanitarnaia mikrobiologia* [Manual of medical microbiology. General and sanitary microbiology]. *Binom, Moscow* (in Russian).
- Mehndiratta, P.L., Gur, R., Saini, S., Bhalla, P., 2010. *Staphylococcus aureus* phage types and their correlation to antibiotic resistance. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 53(4), 738–741.
- Murchan, S., Carter, M., 2000. Strain identities of phage nontypable MRSA in the UK. *J. Hosp. Infect.* 46, 157–158.
- Ob unifikatsii mikrobiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovaniia, primeniaemih v kliniko-diahnosticheskikh laboratoriiah lechbeno-profilacticheskikh ucherezhdenni, 1985 [About the unification of microbiological (bacteriological) research methods used in clinical diagnostic laboratories of medical institutions: the order № 535 (1985)]. *MOZ USSR, Moscow* (in Russian).
- Olson, M.E., Ceri, H., Morck, D.W., Buret, A.G., Read, R.R., 2002. Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility of antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 66(2), 86–92.
- Pantucek, R., Doskar, J., Ruzickova, V., Kasperek, P., Oracova, E., Kvardova, V., Rosypal, S., 2004. Identification of bacteriophage types and their carriage in *Staphylococcus aureus*. *Arch. Virol.* 149, 1689–1703.
- Paul-Satyaseela, M., Belkum, A., Shivannavar, C.T., Gaddad, S.M., 2011. Comparison of capsular typing of *Staphylococcus aureus* with bacteriophage typing: A study in Gulbarga, India. *Indian J. Med. Microbiol.* 51(3), 359–362.
- Pro zatverdzhennia metodichnih vkazivok schodo viznachennia chutlivosti mikroorganizmiv do antibakterialnih preparativ, 2007 [Approval of guidelines for determining the sensitivity of microorganisms to antibiotics. The order № 167 (2007)]. *Ministry of Health of Ukraine, Kyiv* (in Ukrainian).
- Savchuk, T.D., 2003. Stafilokokkovaia infektsiia [Staphylococcal infections]. *Medicine, Moscow* (in Russian).
- Volkov, I.I., 1999. Sovershenstvovanie mikrobiologicheskoi diahnostiki stafilokokkovih infektsii i ekolohicheskie aspekty ih vzbuditelei [Improving the microbiological diagnosis of staphylococcal infections and environmental aspects of their pathogens] *Autoref. of candidate dissertation*. Available from <http://nature.web.ru/db/msg.html?mid=1163020>.

Надійшла до редакції 22.10.2014