

УДК 57.083.1:579.86:57.083.182:57.055(045)

ВИВЧЕННЯ БІОПЛІВКОУТВОРЕННЯ ЕНТЕРОКОКІВ ФОТОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ З МОДЕЛЮВАННЯМ БІОПЛІВОК НА АБІОТИЧНИХ ПОВЕРХНЯХ З ПОЛІСТИРОЛУ

Мироненко Л.Г., Перетятко О.Г., Ягнюк Ю.А.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.
Мечникова Національної академії медичних наук
України»

Вступ

Відкриття наприкінці минулого століття біології існування мікроорганізмів у вигляді біоплівки, їх поведінки як колоніально-соціальних організмів якісно змінило погляди на патогенез, терапію і профілактику інфекційних та гнійно-запальних захворювань. Бактерії у біоплівці набувають більшу здатність до росту, стійкість до впливу агресивних факторів середовища, ніж мікроорганізми, що знаходяться у планктонній формі та спричиняють як мінімум 60% випадків всіх хронічних та рецидивуючих інфекцій [1]. На сьогоднішній день біоплівкоутворення шпитальними штамами бактерій, особливо умовно-патогенними, є серйозною загрозою для практичної медицини.

Ентерококи, насамперед *Enterococcus faecium* та *Enterococcus faecalis*, є третьою за розповсюдженістю причиною внутрішньолікарняних інфекцій, більшість з яких пов'язана з використанням постійного медичного обладнання, оскільки ентерококи здатні до колонізації біогенних та абіогенних поверхонь. Особливого значення це набуває у відділеннях інтенсивної терапії, хірургічних стаціонарах, оскільки утворення біоплівок – причина виникнення важких катетер- і вентилятор-асоційованих внутрішньолікарняних інфекцій, сепсису, пневмоній і ендокардитів [2, 3]. Загальновизнаною є роль ентерококів у патогенезі інфекцій сечовивідних шляхів, на їх частку припадає до 10 % усіх бактеріальних інфекцій уринарного тракту. При внутрішньолікарняних інфекціях в урологічних стаціонарах питома вага ентерококів зростає до 15-20 %. Відомо, що здатність збудників до біоплівкоутворення відіграє важливу роль у хронізації запальних процесів при захворюваннях сечовивідної системи. Інфікуванню сприяють інвазивні інструментальні маніпуляції на сечовому міхурі і постійні уретральні катетери [4, 5].

Мікроорганізми у складі біоплівок, сформованих при хронічних процесах, а також на медичних імплантах та обладнанні, суттєво перешкоджають специфічній терапії та призводять до росту летальності. З неефективністю антибіотикотерапії інфекцій, викликаних біоплівкоутворюючими мікроорганізмами, пов'язані також значні економічні втрати. Тому, за рекомендаціями деяких науковців, разом з мікробіологічними дослідженнями з ідентифікації

мікроорганізму – збудника інфекції, доцільно визначати його здатність до біоплівкоутворення та корегувати лікування у залежності від результату досліджень у кожному клінічному випадку [6-8].

Розробка нових підходів для ідентифікації та вивчення біоплівок є нагальною проблемою медичної науки. Дослідники використовують декілька методичних підходів, один з яких пов'язано з моделюванням біоплівок на абіотичних поверхнях в умовах *in vitro*. Достатньо широко для визначення здатності до формування біоплівок використовується статичний фотометричний метод, суть якого полягає у вимірюванні оптичної щільності барвника, елюйованого розчинником з біоплівки. Оптична щільність елюату відображує інтенсивність біоплівкоутворення, оцінка якої кількісно відображує здатність штаму до формування біоплівки [9]. Найчастіше мікробні біоплівки моделюють у 96-лункових мікротитрувальних планшетах, але деякі вчені пропонують використовувати пробірки, флакони, чашки Петрі тощо [10, 11]. Популярність фотометричного методу стала зростати з середини 90-х років минулого століття, що було обумовлено його зручністю, високою продуктивністю, наочністю.

Аналіз наукової літератури щодо способів використання фотометричного методу для вивчення біоплівкоутворення мікроорганізмів показав, що при застосуванні барвника генціанвіолету оптичну щільність елюатів вимірюють при довжині хвилі від 570 нм до 630 нм [12-14].

Метою дослідження було проведення порівняльного аналізу результатів визначення біоплівкоутворення ентерококів фотометричним методом з моделюванням біоплівок у 96-лункових мікротитрувальних планшетах та 4-х секційних чашках Петрі.

Матеріали та методи

Дослідження проведено на 61 штамі мікроорганізмів роду *Enterococcus*, вилучених з клінічного матеріалу від хворих з гнійно-запальними інфекціями.

Для визначення здатності ентерококів до біоплівкоутворення використовували спектрофотометричний метод з дослідженням біоплівок в 96- лункових мікротитрувальних планшетах та 4-х секційних чашках Петрі.

Для виконання методики вивчення біоплівкоутворення за допомогою 96-лункових мікротитрувальних планшетів по 1-2 колонії добової культури ентерококів засівали у триптіказо-соєвий бульйон (TSB) [15]. Після інкубування посівів при температурі 37 °С протягом 24 годин готували мікробну суспензію ентерококів щільністю 0,5 од. за Mc Farland за допомогою приладу Densi-La-Meter II (PLIVA-Lachema Diagnostika, Чехія). У кожен лунку 96-лункового мікропланшету вносили по 100 мкл TSB та по 10 мкл мікробної суспензії ентерококів (крім контрольної лунки – контроль середовища). Планшети інкубували при температурі 37 °С протягом 48 годин. Після закінчення терміну інкубації з лунок видаляли планктонну форму мікроорганізмів, біоплівки тричі

відмивали фосфатно-сольовим буферним розчином (рН 7,2-7,4) в об'ємі 200 мкл в кожен лунку та висушували при 37 °С протягом 15 хв. Фарбували біоплівки 1 % водним розчином кристал-віолету, після чого лунки двічі промивали дистильованою водою (по 200 мкл у кожен лунку). Додавали у лунки по 100 мкл суміші етанолу/ізопропанолу (1:1). Оптичну щільність вмісту лунок вимірювали на рідері АИФ-Ц-01С при довжині хвилі 570 нм та 620 нм.

Нами запропоновано вивчення здатності ентерококів до утворення біоплівок також у стерильних одноразових полістиролових 4-х секційних чашках Петрі [16, 17]. За допомогою приладу Densi-La-Meter II готували мікробну суспензію добової культури ентерококів щільністю 0,5 од. за Mc Farland. У кожний сектор 4-секційної пластикової чашки Петрі вносили по 1,75 мл TSB з 1% глюкозою, додавали по 0,25 мл мікробної суспензії ентерококів, в контрольний сектор – 0,25 мл середовища. Інкубували при температурі 37 °С протягом 48 годин. Після інкубації відмивали триразово фосфатно-сольовим буферним розчином (рН 7,2-7,4), висушували при кімнатній температурі протягом 30 хв. та фарбували біоплівки 1 % водним розчином кристал-віолету. Елюацію барвника з біоплівки проводили дворазово 2-ма мл етанолу/ізопропанолу (1:1) протягом 20 хв. Оптичну щільність елюата вимірювали на спектрофотометрі СФ-56Л при довжині хвилі 590 нм.

Отримані результати визначення інтенсивності біоплівкоутворення ентерококів

аналізували за рекомендаціями Stepanovic S. et al. [18], згідно яких розподіляли ентерококи на штами з високим, середнім та низьким ступенем біоплівкоутворення.

Статистична обробка отриманих даних проводилася за допомогою методів параметричної статистики. Для всіх вибірок оцінювалась відповідність емпіричних розподілів закону нормального розподілення Гауса за критерієм Колмогорова-Смірнова. Обчислювали середню арифметичну (М), середнє квадратичне відхилення (Б), помилку середньої арифметичної (m). Достовірність розбіжностей визначали за критерієм Стьюдента (t), розбіжності вважали достовірними при $p < 0,05$.

Обробка результатів досліджень виконувалась на персональному комп'ютері за допомогою комп'ютерних програм Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6.0.

Результати і обговорення

Встановлено, що при моделюванні біоплівок ентерококів у 96-лункових полістиролових мікропланшетах зафарбованість елюатів з біоплівки дослідних штамів *E. faecalis* розрізнялась за інтенсивністю (кожний штам вносили у три горизонтальні лунки) (рис.1).

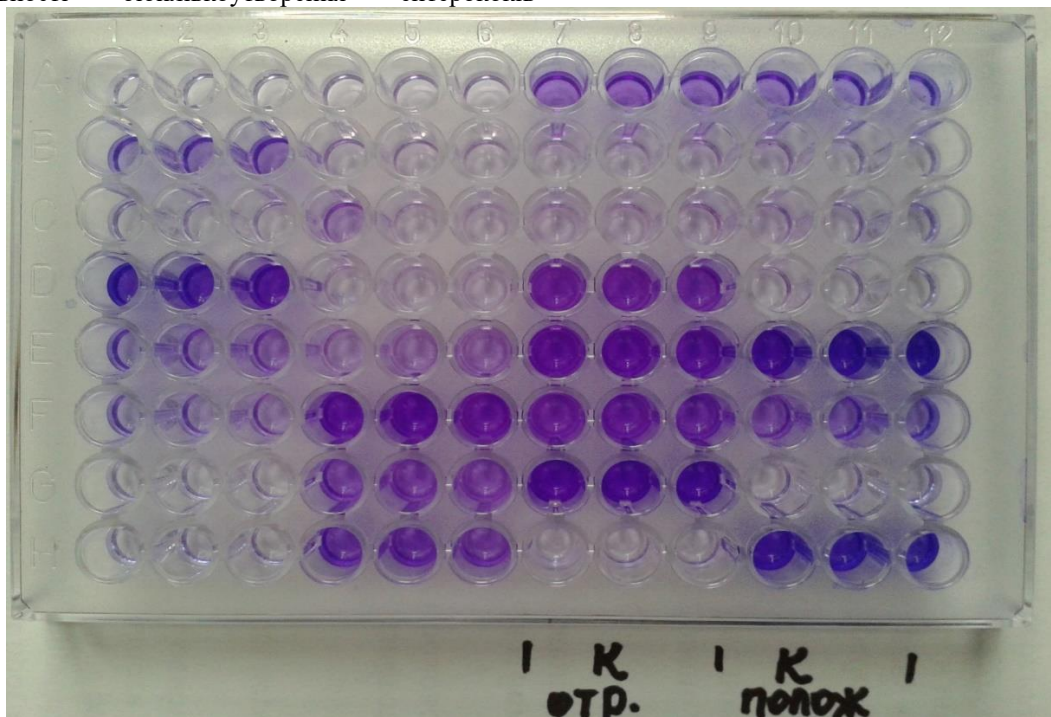


Рисунок 1 – Візуалізація формування біоплівок ентерококами в 96-лункових полістиролових мікропланшетах через 48 год інкубації. Фарбування генціан-віолетом.

Аналіз результатів вимірювання на рідері показав, що діапазон показників оптичної щільності при використанні світлових фільтрів з довжиною хвилі 570 нм коливався від 0,001 до 1,256 OD₅₇₀, з середнім

значенням – (0,264±0,04) OD₅₇₀. При цьому середній показник оптичної щільності у штамів з високим ступенем біоплівкоутворення дорівнював (0,420±0,04) OD₅₇₀, з середнім ступенем – (0,040±0,01) OD₅₇₀, з низьким – (0,020±0,01) OD₅₇₀.

Встановлено, що кількість штамів, здатних до формування біоплівки серед усіх взятих у дослід, складала $(68,8 \pm 5,9) \%$. За інтенсивністю біоплівкоутворення ентерококи розподілено наступним чином: кількість штамів з високим ступенем складала $(90,4 \pm 4,5) \%$, значно нижчою була частка штамів з середнім та низьким ступенем – по $(4,8 \pm 3,3) \%$ ($p < 0,05$).

При вимірюванні оптичної щільності елюатів на рідері АИФ-Ц-01С зі світловим фільтром з довжиною хвилі 620 нм встановлено, що діапазон показників варіював від 0,001 до 0,436 OD_{620} з середнім значенням $(0,077 \pm 0,01) OD_{620}$. Середній показник оптичної щільності у штамів з високим ступенем біоплівкоутворення дорівнював $(0,139 \pm 0,02) OD_{620}$, з середнім ступенем – $(0,106 \pm 0,01) OD_{620}$, з низьким – $(0,039 \pm 0,01) OD_{620}$.

При аналізі отриманих результатів з урахуванням вищевказаних критеріїв встановлено, що частка біоплівкоутворюючих штамів складала $(60,7 \pm 6,3) \%$. При цьому кількість штамів з високим ступенем біоплівкоутворення дорівнювала $(75,6 \pm 7,1) \%$, з середнім ступенем – $(13,5 \pm 5,6) \%$, з низьким – $(10,9 \pm 5,1) \%$.

Таким чином, абсолютні значення оптичної щільності елюатів, що відповідають інтенсивності біоплівкоутворення ентерококів, при вимірюванні на рідері з використанням світлових фільтрів з довжиною хвилі 570 нм та 620 нм були різними. Але, проведений статистичний аналіз показав відсутність достовірної

різниці між кількістю біоплівкоутворюючих штамів та інтенсивністю біоплівкоутворення ($p > 0,05$).

Проведений нами аналіз досліджень по вивченню здатності ентерококів до біоплівкоутворення у 96-лункових мікропланшетах дозволив зробити висновок про можливість застосування світлових фільтрів з довжиною хвилі як 570 нм, так і 620 нм для вимірювання на рідері оптичної щільності елюатів з барвником генціанвіолетом.

Деякі вчені вважають більш точним та інформативним для визначення здатності мікроорганізмів до біоплівкоутворення фотометричним методом використання для моделювання біоплівки не 96-лункових полістиролових мікропланшетів, а полістиролових чашок Петрі [19]. Нами було запропоновано використання 4-х секційних полістиролових чашок Петрі з подальшим вимірюванням оптичної щільності елюатів на спектрофотометрі СФ-56Л при довжині хвилі 590 нм. Це дозволило економніше використовувати поживне середовище (TSB з глюкозою), барвник (генціанвіолет), розчинник (етанол/ізопропанол) та фосфатно-сольовий буферний розчин у порівнянні з використанням чашок Петрі діаметром 40 мм.

Фотографія біоплівки, що надана на рис.2, дозволяє візуально виявити різницю в інтенсивності біоплівкоутворення різних штамів ентерококів, що підтверджують і об'єктивні дані, отримані при вимірюванні оптичної щільності елюатів.

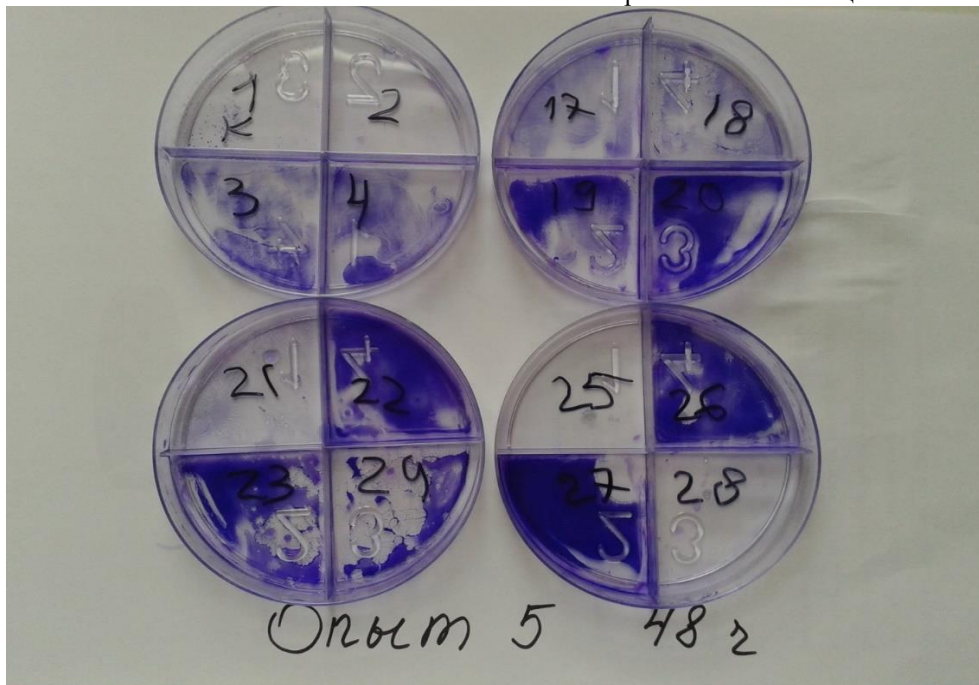


Рисунок 2 – Візуалізація формування біоплівки ентерококами в 4-х секційних чашках через 48 год інкубації. Фарбування генціан-віолетом.

Встановлено, що показники оптичної щільності елюатів варіювали у межах від 0,161 OD_{590} до 3,294 OD_{590} з середнім значенням $(1,387 \pm 0,14) OD_{590}$. Середній показник оптичної щільності у штамів з високим ступенем

біоплівкоутворення складав $(2,529 \pm 0,20) OD_{590}$, з середнім ступенем – $(1,724 \pm 0,17) OD_{590}$, з низьким – $(0,714 \pm 0,40) OD_{590}$.

Аналіз результатів показав, що кількість біоплівкоутворюючих штамів ентерококів, виявлених при використанні 4-х секційних полістиролових чашок

Петрі, складала $(62,3 \pm 6,2)\%$ й достовірно не відрізнялась від аналогічного показника при проведенні досліджень у 96-лункових полістиролових мікропланшетах ($p > 0,05$).

Таким чином, наші дослідження показали можливість використання 4-х секційних полістиролових чашок Петрі при визначенні здатності ентерококів до формування біоплівки на абіотичних поверхнях фотометричним методом.

Висновки

Для визначення здатності ентерококів до формування біоплівки достатньо широко використовується статичний фотометричний метод, що обумовлено його зручністю, високою продуктивністю, наочністю. Найчастіше мікробні біоплівки моделюють у 96-лункових полістиролових мікротитрувальних планшетах. Наші дослідження показали доцільність використання для моделювання біоплівки ентерококів також 4-х секційних полістиролових чашок Петрі. Підтверджено, що при вимірюванні оптичної щільності елюатів ентерококів на рідері необхідно використовувати світлові фільтри з довжиною хвилі у діапазоні від 570 нм до 620 нм за умов використання барвника генціанвіолету.

References

1. Gladkih PG. Importance of Microbiofilms in Infection Pathology of Human (Review) // Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. 2015. N. 1. URL: <http://www.Medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2015-1/5096.pdf> (request date 16.02.2015).
2. Chander J, Gombar S, Gupta V [et al.] Incidence, risk factors, microbiology of venous catheter associated bloodstream infections - A prospective study from a tertiary care hospital // Ind. Journal of Medical Microb. 2015. Vol. 33. N. 2. P. 248-254.
3. Tan M, Lau J, Guglielmo BJ. Ethanol locks in the prevention and treatment of catheter-related bloodstream infections // Ann Pharmacother. 2014. Vol. 48. P. 654-665.
4. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci // Journal of Medical Microb. 2007. N. 56. P. 1581-1588.
5. Kafil HS, Mobarez AM. Assessment of biofilm formation by enterococci isolates from urinary tract infections with different virulence profiles // Journal of King Saud University – Science. 2015. N. 27. P. 312-317.
6. AL-Mutairi D, Kilty SJ. Bacterial biofilms and the pathophysiology of chronic rhinosinusitis // Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol. 2011. Vol. 11. N. 1. P. 18-23.
7. Wolcott R, Costerton JW, Raoult D [et al.]. The polymicrobial nature of biofilm infection // Clin. Microbiol. Infect. 2013. Vol. 19. N. 2. P. 107-112.
8. Verstraelen H, Swidsinski A. The biofilm in bacterial vaginosis implications for epidemiology, diagnosis and treatment // Curr. Opin. Infect. Dis. 2011. Vol. 26. N. 1. P. 86-89.
9. Lyamin AV, Botkin EA, Zhestcow AV. Methods of Biofilm Evaluation: Opportunities and Perspectives // Clin. Microb. And Antimicrob. Chemoterap. 2012. Vol. 14. N. 1. P. 17-22.

10. Kour M, Soni I, Harma R. Assessment of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* causing nosocomial infections and their statistical analysis // Indian Journal of Applied Research. 2014. Vol. 4. N. 1. P. 77-79.

11. Osipova EV, Shipitsyna IV, Naumenko ZS. A comparative quantitative evaluation of the potential of Biofilm formation by different bacterial clinical strains on polystyrene and glass surface // International Journal of Applied Fundamental Research. 2014. N. 8. P. 55-58.

12. Mohamad A, Shalakany H. Detection of Biofilm Formation in Uropathogenic Bacteria // Egyptian Journal of Medical Microbiology. 2015. Vol. 24. N. 1. P. 49-58.

13. Biswas PP, Dey S, Sen A [et al.]. Molecular characterization of virulence genes in vancomycin-resistant and vancomycin-sensitive enterococci // J Global Infect Dis. 2016. N. 8. P. 16-24.

14. Ng W-J, Lim K-Y, Chong J-Y [et al.] In vitro Screening of Honey against *Enterococcus* spp. Biofilm // Journal of Medical and Bioengineering. 2014. Vol. 3. N. 1. P. 23-28

15. Tang Jun Ni [et al.] The staphylococcal nuclease prevents biofilm formation in *Staphylococcus aureus* and other biofilm-forming bacteria // Science China. 2011. Vol. 54(9). P. 863-869.

16. Myronenko LG, Peretyatko EG, Iagniuik JA., Kutsyk RV. Characteristics of the pathogenicity factors and enterococci ability to form biofilms isolated from patients with urological pathology // Bukovinian Medical Herald. 2015. Issue 19. Vol. 4 (76). P. 111-114.

17. Myronenko LG, Peretyatko EG, Iagniuik JA. The study of Biofilm Formation of Enterococci isolated from Various Ecotopes // Bulletin of Biology and Medicine. 2015. Issue 3. Vol. 2(123). P. 290-293

18. Stepanovic S [et al.] A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation // Journal of Microbiological Methods. 2000. N. 40. P. 175-179.

UDC 57.083.1:579.86:57.083.182:57.055(045)

STUDY OF ENTEROCOCCI BIOFILM FORMATION USING PHOTOMETRIC METHOD WITH BIOFILM MODELING ON ABIOTIC POLYSTYRENE SURFACES

Myronenko L.G., Peretyatko O.G., Iagniuik J.A.

Introduction. Static photometric method is widely used to determine the ability of biofilm formation. The essence of this method is to measure the optical density of the dye, eluted with a solvent from the biofilm. The aim of the study was to conduct a comparative analysis of the results of determining the enterococci biofilm formation using photometric method with biofilm modeling in 96-well microtiter plates and 4-section Petri dishes. **Material and methods.** The study was conducted using 61 strains of microorganisms genus *Enterococcus*, taken from the clinical material of patients with purulent-inflammatory infections. To perform the study of biofilm formation using 96-well microtiter plates technique, 100 μ l of TSB with 1% glucose and 10 μ l of enterococci daily culture suspension with density of 0.5 units by Mc Farland, prepared using the Densi-La-Meter II device, were placed in each well. The plates were incubated at 37 °C for 48

hours, washed three times in phosphate-buffered saline (pH 7.2-7.4) of 200 µl volume, dried at 37 °C for 15 minutes. The biofilms were stained with crystal violet 1% aqueous solution, washed with distilled water. 100 µl of ethanol/isopropanol mixture (1:1) were added to the wells. The optical density of wells content was measured with the AIF-C-01S reader at a wavelength of 570 nm and 620 nm. The results were analyzed using Stepanovic S. et al. recommendations, according to which enterococci were divided into strains with high, medium and low degree of biofilm formation. To study the enterococci ability of biofilm formation in 4-section Petri dishes, 1.75 ml of TSB with 1% glucose and 0.25 ml of enterococci microbial suspension with density of 0.5 units by McFarland were added in each sector, 0.25 ml of medium were added to the control sector. The dishes were incubated at 37 °C for 48 hours, washed three times in phosphate-buffered saline (pH 7.2-7.4), dried at room temperature for 30 minutes. The biofilms were stained with crystal violet 1% aqueous solution. The dye elution from the biofilm was performed twice with 2 ml of ethanol/isopropanol mixture (1:1) for 20 minutes. The optical density of eluates was measured with the SF-56L spectrophotometer at a wavelength of 590 nm. **Results and discussion.** Analysis of the results of the study on enterococci ability to form biofilms with biofilm modeling in 96-well polystyrene microplates revealed that, when using light filters with a wavelength of 570 nm, optical density rate ranged from 0.001 to 1.256 OD₅₇₀ with an average value of (0.264±0.04) OD₅₇₀. It was found that the number of strains capable of biofilm formation amounted to (68.8 ± 5.9)% of all strains used in the study. Enterococci distribution by intensity of biofilm formation was as follows: number of strains with high degree equaled (90.4±4.5)%, share of strains with medium and low degree was significantly lower – each amounted to (4.8±3.3)% (p<0.05). When measuring the optical density of eluates using the AIF-C-01S reader with light filter at a wavelength of 620 nm, it was found that the indicators ranged from 0.001 to 0.436 OD₆₂₀ with an average value of (0.077±0.01) OD₆₂₀. While analyzing the results with consideration of the above criteria, it was found that the share of strains capable of biofilm formation equaled (60.7±6.3)%. The number of strains with high degree of biofilm formation amounted to (75.6±7.1)%, with average and low degree – (13.5±5.6)% and (10.9±5.1)% respectively. The performed statistical analysis showed no significant difference between the number of strains capable of biofilm formation and intensity of biofilm formation when applying light filters with a wavelength of 570 nm and 620 nm (p>0.05). When modeling the enterococci biofilms in 4-section Petri dishes, it was found that the eluates optical density rates ranged from 0.161 OD₅₉₀ to 3.294 OD₅₉₀ with an average value of (1.387±0.14) OD₅₉₀. Analysis of the results showed that the number of enterococci strains capable of biofilm formation equaled (62.3±6.2)% and did not differ significantly from the corresponding indicator in the study with 96-well polystyrene microplates (p>0.05). **Conclusion.** Static photometric method is widely used to determine the enterococci ability of biofilm formation due to its convenience, high performance, and clearness.

Microbial biofilms are mostly modeled in 96-well polystyrene microtiter plates. Our study showed the feasibility of also using 4-section polystyrene Petri dishes for enterococci biofilm modeling. It was confirmed that it is necessary to use light filters with a wavelength range from 570 nm to 620 nm when measuring the optical density of the enterococci eluates with a reader, if using the crystal violet dye.

Key words: enterococci, biofilm modeling, 96-well microplates, polystyrene Petri dishes.