

**Кривцова Марина Валеріївна,**

доктор біологічних наук, професор,  
професор кафедри генетики, фізіології рослин і мікробіології,  
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»  
ORCID ID: 0000-0001-8454-2509  
м. Ужгород, Україна

**Малигіна Ганна Сергіївна,**

аспірантка кафедри генетики, фізіології рослин і мікробіології,  
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»  
ORCID ID: 0000-0002-0938-2370  
м. Ужгород, Україна

**Саламон Іван,**

професор кафедри екології,  
Пряшівський університет  
ORCID ID: 0000-0001-5379-3989  
м. Пряшів, Словаччина

**Калиняк Марина Миколаївна,**

асистент кафедри ортопедичної стоматології,  
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»  
ORCID ID: 0000-0003-3711-9745  
м. Ужгород, Україна

**Колесник Олег Борисович,**

доцент кафедри ботаніки,  
ДВНЗ «Ужгородський національний університет»  
ORCID ID: 0000-0002-3164-1965  
м. Ужгород, Україна

## **Антибіотикорезистентність у мікробних біоплівках: порівняльний аналіз антибіотикорезистентності біоплівкотвірних та планктонних форм бактерій роду *Staphylococcus***

Одним із факторів, що потенціують формування антибіотикорезистентності, є формування бактеріями біоплівки. У ході нашого дослідження від 185 хворих в умовах хронічного тонзиліту ізольовано 210 клінічних ізолятів мікроорганізмів. Домінуючими представниками, які ізолювали в 52,5% випадків, були бактерії родини Staphylococcaceae та Streptococcaceae (*S. pyogenes*), які виявляли у 37% випадків. Серед стафілококів переважав *S. aureus* (35,7%) рідше виділяли *S. epidermidis* (12%) та *S. haemolyticus* (4,8%). Дослідження ізолятів, виділених у разі хронічного тонзиліту, показало, що до утворення біоплівки були здатні 69 штамів бактерій роду *Staphylococcus*, серед них 50 – *S. aureus*, 3 – *S. haemolyticus* та 16 штамів *S. epidermidis*. Тобто біоплівкотвірними були 69 (62%) із 111 досліджених. Встановлено, що більшість стафілококів, які утворювали біоплівку, проявляли підвищений рівень резистентності до антибіотиків та входили до складу асоціацій. Найвищий рівень резистентності серед біоплівкотвірних ізолятів *S. aureus* виявили до антибіотиків ампіцилін, тетрациклін, доксициклін, кларитроміцин, канаміцин, азитроміцин. Серед біоплівкотвірних ізолятів *S. aureus* встановлено значно вищий рівень резистентності до цефуроксиму, азитроміцину, антибіотиків тетрациклінового ряду, ніж серед планктонних штамів. До фторхінолонів, стійких планктонних ізолятів золотистого стафілококу виявлено не було. Серед епідермальних стафілококів виявлена аналогічна тенденція вищого рівня резистентності серед біоплівкотвірних ізолятів. Таку закономірність встановлено до ампіциліну, цефалексину, макролідів, канаміцину та лінкоміцину. До фторхінолонів усі планктонні ізоляти епідермального стафілококу були чутливими, серед біоплівкотвірних – виявляли стійкі до ломефлоксацину. Аналіз чутливості мікроорганізмів до антибіотиків є важливим складником моніторингових досліджень циркуляції антибіотикорезистентних ізолятів. Водночас важливим є встановлення локальних та регіональних особливостей циркуляції антибіотикостійких штамів.

**Ключові слова:** антибіотикорезистентність, бактеріальна біоплівка, умовно-патогенні бактерії.

---

**Kryvtsova Maryna Valeriivna**, Doctor of Biological Sciences, Professor, Professor of the Department of Genetics, Plant Physiology and Microbiology, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0001-8454-2509, Uzhhorod, Ukraine

**Malygina Anna Serhiivna**, Postgraduate Student of the Department of Genetics, Plant Physiology and Microbiology, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0002-0938-2370, Uzhhorod, Ukraine

**Salamon Ivan**, Professor of the Department of Ecology, University of Presov, ORCID ID: 0000-0001-5379-3989, Prysiv, Slovakia

**Kalynyak Maryna Mykolayivna**, Assistant of the Department of Orthopedic Dentistry, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0003-3711-9745, Uzhhorod, Ukraine

**Kolesnyk Oleg Borisovich**, Associate Professor of the Department of Botany, Uzhhorod National University, ORCID ID: 0000-0002-3164-1965, Uzhhorod, Ukraine

## **Antibiotic resistance in microbial biofilms: comparative analysis of antibiotic resistance of biofilm-forming and planktonic forms of the *Staphylococcus* genus bacteria**

One of the factors that potentiates the formation of antibiotic resistance is the formation of bacteria biofilm. In our study, 210 clinical isolates of microorganisms were isolated from 185 patients with chronic tonsillitis. The dominant microorganisms isolated in 52.5% of cases were bacteria of the family Staphylococcaceae and Streptococcaceae (*S. pyogenes*), which were detected in 37% of cases. Among staphylococci, *S. aureus* prevailed (35.7%), *S. epidermidis* (12%) and *S. haemolyticus* (4.8%) were isolated less frequently. Studies of isolates isolated from chronic tonsillitis showed that 69 strains of bacteria of the genus *Staphylococcus* were capable of biofilm formation, among them 50 – *S. aureus*, 3 – *S. haemolyticus* and 16 strains of *S. epidermidis*. That is, 69 (62%) of the 111 studied were biofilm-forming. It was established that the majority of staphylococci that formed a biofilm showed an increased level of resistance to antibiotics and were part of associations. The highest level of resistance among biofilm-resistant isolates of *S. aureus* was found to the antibiotics ampicillin, tetracycline, doxycycline, clarithromycin, kanamycin, and azithromycin. Among the biofilm-forming isolates of *S. aureus*, a significantly higher level of resistance to cefuroxime, azithromycin, and tetracycline antibiotics was found. Before fluoroquinolones, no planktonic isolates of *Staphylococcus aureus* were detected. Among epidermal staphylococci, a similar trend of a higher level of resistance among biofilm-forming isolates was found. This pattern was observed for ampicillin, cephalexin, macrolides, kanamycin, and lincomycin. All planktonic isolates of epidermal staphylococcus were sensitive to fluoroquinolones, among biofilm-forming isolates they were resistant to lomefloxacin. Analysis of the sensitivity of microorganisms to antibiotics is an important component of monitoring studies of the circulation of antibiotic-resistant isolates. At the same time, an important link is the observation of local and regional features of the circulation of antibiotic-resistant strains.

**Key words:** antibiotic resistance, bacterial biofilm, opportunistic bacteria.

**Вступ.** Постійно зростаюча тенденція до формування антибіотикорезистентності серед представників умовно-патогенної мікробіоти, в тому числі у складі біоплівки [1; 2], вимагає нових підходів як до місцевого, так і до системного лікування [3; 4; 5]. Бактерії роду *Staphylococcus* є найбільш поширеними серед збудників опортуністичних інфекцій, що мають здатність формувати біоплівки в організмі людини та поверхні медичних пристроїв. Рід *Staphylococcus* об'єднує понад 70 видів, які характеризуються різним ступенем вірулентності. Найбільш патогенним для людини видом є *S. aureus*, що володіє значним арсеналом факторів вірулентності й патогенності. Стафілококи різних видів можуть викликати такі інфекційні процеси, як ураження м'яких тканин, ендокардит, остеомиєліт, сепсис, пневмонія, синдром токсичного шоку та харчові отруєння [6; 7]. Загальний показник смертності від стафілококів становить від 11,0% до 43,0%. Частота післяопераційних ускладнень, викликаних метицилінстійкими *S. aureus*, досягає 33,0% [8–10].

У літературі також є відомості про біоплівкотвірні властивості бактерій видів *S. epidermidis*, *S. aureus* [7]. Встановлено, що біоплівкоутворюючі бактерії здатні вижити у разі впливу антибіотиків у таких високих концентраціях, які не можуть бути досягнуті в організмі людини за стандартних терапевтичних доз [8]. Після закінчення антибіотикотерапії через певний час починається синтез і накопичення в клітинах персистерів антиотоксинів, цитотоксини нейтралізуються,

активуються всі біологічні процеси. Після припинення дії цитотоксинів клітини починають проліфувати, поновлюється бактеріальна комунікація і, таким чином, відновлюється материнська популяція. Для макроорганізму цей процес супроводжується хронізацією інфекції, появою маніфестуючих ознак захворювання, пов'язаних з повторною активацією імунної системи і дією факторів вірулентності бактерій. З ростом популяції відбувається створення навколо біоплівки імуносупресуючого мікрооточення за рахунок синтезу специфічних молекул, і вторинного синтезу протективної системи матриксу біоплівки [8]. Матрикс біоплівки здатний перешкоджати швидкості дифузії деяких антибіотиків та інших біоцидних препаратів, це залежить від його біохімічного складу і метаболічної активності популяції. Наприклад, аміноглікозиди досить тривалий час дифундують через матрикс, фторхінолони, навпаки, легше проникають через цей бар'єр [9]. Плівкоутворення можна вважати одним із додаткових факторів патогенності мікроорганізмів.

За таких умов необхідним є постійний моніторинг циркуляції антибіотикорезистентних ізолятів, у тому числі таких, що характеризуються множинною стійкістю до антибіотиків, дослідження ефективності антибактеріальних препаратів щодо умовно-патогенної мікробіоти, розробка нових комплексних підходів та засобів корекції антибіотикорезистентної мікробіоти в умовах запального процесу. Такі дослідження дають змогу прогнозувати шляхи та темпи розвитку стійкості

до антимікробних препаратів і є підґрунтям розробки адекватних схем раціональної антибіотикотерапії.

**Матеріали та методи.** Забір біологічного матеріалу з осередку запального процесу у разі тонзиліту проведено у 185 пацієнтів обох статей віком 35–65 років на базі медичних закладів різної форми власності Закарпатської області (згідно з договорами про співпрацю). Контрольну групу становили люди без ознак запалення тонзиліту ( $n=50$ ). Бактеріологічні дослідження проведені на базі мікробіологічної лабораторії кафедри генетики, фізіології рослин і мікробіології ДВНЗ «Ужгородський національний університет».

Отриманий біоматеріал висівали на поживні середовища методом секторного посіву за Голдом. Використовували такі диференційно-діагностичні поживні середовища: для виділення бактерій роду *Streptococcus* та *Neisseria* – кров'яний агар (м'ясо-пептонний агар + 5% крові); стрептококів – *Mitis salivarius* Agar («HiMedia»); бактерій родини *Enterobacteriaceae* – середовища Ендо та Левіна («Фармактів»); бактерій роду *Staphylococcus* – жовтково-сольовий агар з манітом («HiMedia»), виділення ентерококів проводили на середовищі *Bile Esculin Azide Agar* («HiMedia»), *Pseudomonas aeruginosa* – *Pseudomonas Isolation Agar* («HiMedia»), гриби роду *Candida* виділяли на агарі Сабуро («Фармактів»). Бактерії і мікроскопічні гриби ідентифікували за морфологічними, тинкторіальними та біохімічними ознаками з використанням систем для ідентифікації «ENTERO-test», «STREPTO-test», «STAPHY-test», «CANDIDA-test» виробництва «Erba Lachema» (Чеська республіка) (за Vos et al., 2011) [11].

Хемотаксономічна ідентифікація (MALDI) антибіотикорезистентних ізолятів бактерій роду *Staphylococcus* була виконана на пристрої Microflex LT (Bruker Daltonics GmbH, Lipsko, Nemecko) Flex Control (verzia 3.0). Спектри, отримані з кожного ізоляту, були імпортовані до програмного забезпечення Biotyper verzia 3.0 (Bruker Daltonics GmbH, Lipsko, Nemecko, verzia 3.3.1.0) та проаналізовані за допомогою бази даних референтних спектрів медично-важливих видів бактерій. У діапазоні 2,300 до 3,000 показник вважався високонадійною ідентифікацією видів, значення між 2,000 до 2,999 оцінюється як надійна ідентифікація роду та вірогідна ідентифікація виду; межі від 1,7000 до 1,999 вважаються вірогідною ідентифікацією роду, а менше 1,7 – невірогідною ідентифікацією.

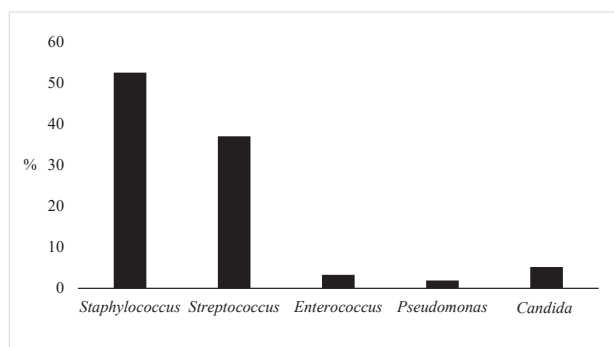
Антибіотикочутливість бактерій та мікроскопічних грибів визначали диско-дифузійним методом згідно з EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Під час дослідження чутливості мікроорганізмів застосовували стандартні диски з антибіотиками виробництва «Фармактів» (Україна).

Із 24-годинної культури мікроорганізмів готували суспензію (інокулюм) у стерильному фізіологічному розчині. Інокулюм у кількості 100 мкл, що відповідає 0,5 стандарту Мак Фарланда ( $1,5 \times 10^8$  КУО/мл), висівали на поверхню Мюллер Хінтон агару. Оптичну густину визначали на денситометрі фірми Biosan. На поверхню середовища з культурою викла-

дали стерильні диски з антибіотиками та інкубували за  $37 \pm 2$  С (24 години) бактерії. Діаметр зон затримки росту вимірювали у мм. За діаметром зон затримки росту мікроорганізмів навколо стандартного диску з антибіотиком клінічні ізоляти поділяли на чутливі, помірно чутливі та стійкі (резистентні) до дії такого антибактеріального засобу. Досліджували чутливість бактеріальних ізолятів до таких антибіотиків: ампіцилін (10 мкг), амоксицилін (20 мкг), амоксицилін/клавулонат (20/10 мкг), цефазолін (30 мкг), цефтріаксон (30 мкг), цефуроксим (50 мкг), цефоперазон/сульбактам (75 мкг), цефалексин (30 мкг), цефотаксим (30 мкг), меропенем (10 мкг), іміпенем (10 мкг), ципрофлоксацин (5 мкг), левофлоксацин (5 мкг), гатифлоксацин (5 мкг), норфлоксацин (10 мкг), офлоксацин (1 мкг), ломефлоксацин (10 мкг), тетрациклін (30 мкг), еритроміцин (15 мкг), азитроміцин (15 мкг), кларитроміцин (15 мкг), лінкоміцин (15 мкг), канаміцин (30 мкг), гентаміцин (10 мкг), доксициклін (30 мкг), лінкоміцин (15 мкг), цефіксим (5 мкг), амікацин (30 мкг), ванкоміцин (30 мкг).

Здатність до утворення біоплівки вивчали у 96-луноківих полістиролових планшетах (Greiner-BioOne, Austria) за методикою O'Toole спектрофотометрично [12], яка ґрунтується на здатності барвника кристалічного фіолетового зв'язуватись з клітинами та матриксом біоплівки.

**Результати.** Із патологічного матеріалу 185 хворих із тонзилітом ізолювано 210 клінічних культур мікроорганізмів. За рівнем частоти виділення мікроорганізмів у розвитку запального процесу переважаючими були бактерії родини *Staphylococcaceae* (їх ізолювали в 52,5% випадків) та *Streptococcaceae* (37% випадків) (табл. 1). Поодинокі траплялися *E. faecalis* та *P. aeruginosa* (рис. 1). Переважно виділяли *S. aureus* (35,7%), рідше *S. epidermidis* (12,0%), *S. haemolyticus* (4,8%). Мікроскопічні гриби роду *Candida* spp. виділяли у 5,2% випадків, з них 9 ізолятів *C. albicans*, один *C. tropicalis* та один *C. crusei*. Слід відзначити, що в окремих випадках спостерігали виділення спільних асоціацій мікроорганізмів родини *Staphylococcaceae* та мікроскопічних грибів роду *Candida* spp. (11% випадків); *S. aureus* і *S. pyogenes* (7% випадків). Такі випадки можуть вимагати застосування декількох антимікробних препаратів.



**Рис. 1.** Спектр умовно-патогенних мікроорганізмів (роди), ізолюваних із осередку запального процесу у хворих на тонзиліт

Таблиця 1

**Мікроорганізми, ізольовані з осередку патологічного процесу у хворих на тонзиліт, n=185**

Вид мікроорганізму	абс. знач.	%
<i>S. aureus</i>	75	35,7
<i>S. haemolyticus</i>	11	4,8
<i>S. epidermidis</i>	25	12
<i>S. pyogenes</i>	78	37
<i>Candida spp.</i>	11	5,2
<i>E. faecalis</i>	6	3,3
<i>P. aeruginosa</i>	4	1,9

Серед ізолятів, виділених у разі тонзиліту, до утворення біоплівки були здатні 69 штамів бактерій роду *Staphylococcus*, серед них 50 – *S. aureus*, 3 – *S. haemolyticus* та 16 штамів *S. epidermidis* (табл. 2–3). Тобто біоплівкотвірними були 69 (62%) із 111 досліджених.

Більшість ізолятів *S. aureus* формували біоплівку високої та помірної щільності (n=56). Серед *S. haemolyticus* шість ізолятів із восьми були біоплівкотвірними. Отже, серед коагулазонегативних ізолятів до утворення біоплівки були здатні 6 штамів *S. haemolyticus* та 16 – *S. epidermidis*.

Таблиця 2

**Формування біоплівок бактеріями роду *Staphylococcus*, які ізольовані від хворих на тонзиліт, n=111**

Мікроорганізми	Небіоплівкотвірні	Кількість мікроорганізмів, які формували біоплівку зі щільністю		
		низька	помірна	висока
<i>S. aureus</i>	25	2	12	36
<i>S. haemolyticus</i>	5	0	3	3
<i>S. epidermidis</i>	9	0	5	11

Таблиця 3

**Щільність формування біоплівок бактеріями роду *Staphylococcus*, які ізольовані від хворих на тонзиліт, n=111**

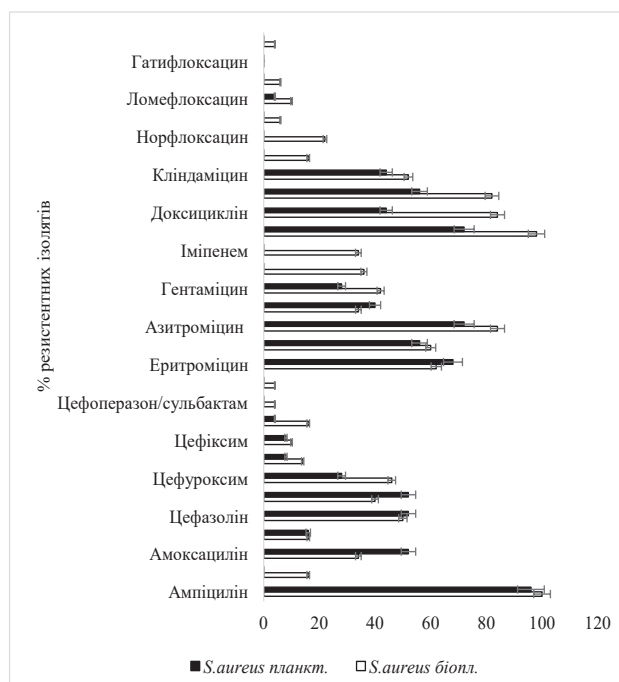
Мікроорганізми	Щільність утворення біоплівки, в од. опт. густ.		
	низька	помірна	висока
<i>S. aureus</i>	1,50±0,02	2,80±0,05	3,90±0,20
<i>S. haemolyticus</i>	0	2,85±0,15	3,75±0,25
<i>S. epidermidis</i>	0	2,75±0,10	3,80±0,20

Дослідження ізолятів, виділених у разі хронічного тонзиліту, показали, що до утворення біоплівки були здатні 69 штамів бактерій роду *Staphylococcus*, серед них 50 – *S. aureus*, 3 – *S. haemolyticus* та 16 штамів *S. epidermidis* (табл. 2–3). Тобто біоплівкотвірними були 69 (62%) із 111 досліджених.

Аналіз чутливості біоплівкотвірних та планктонних ізолятів бактерій роду *Staphylococcus* виявив, що штами, які здатні до біоплівкоутворення, проявляють більш високий рівень резистентності, ніж ті, що не

здатні до утворення біоплівки (рис. 2). До прикладу встановлено, що серед біоплівкотвірних ізолятів *S. aureus* до амоксициліну/сульбактаму були резистентними 17,6%, а серед планктонних стійких до такого антибіотику не виявлено. Не виділяли резистентних штамів серед планктонних ізолятів золотистого стафілококу до таких антибіотиків, як: оксацилін, амоксицилін, цефотаксим, цефоперазон/сульбактам, цефтазидим, гентаміцин, меропенем, іміпенем, усі антибіотики фторхінолонового ряду та ванкоміцин. Найвищий рівень резистентності серед біоплівкотвірних ізолятів виявили до антибіотиків ампіцилін, тетрациклін, доксициклін, кларитроміцин, канаміцин, азитроміцин. Серед клінічних ізолятів *S. epidermidis* вищий відсоток антибіотикостійких штамів показано для біоплівкотвірних штамів. Слід відзначити вищий рівень чутливості епідермального стафілококу до антибіотиків, ніж *S. haemolyticus* та *S. aureus*. Найвищий рівень стійкості біоплівкотвірних ізолятів *S. epidermidis* виявляли до макролідів, до цефалоспоринів III покоління стійких серед бактерій такого виду виявлено не було.

Аналіз резистентності до антибіотиків біоплівкотвірних та планктонних штамів, ізольованих у разі тонзиліту, показав вищий відсоток резистентних ізолятів серед біоплівкотвірних стафілококів (рис. 2–3). Зокрема, серед біоплівкотвірних ізолятів *S. aureus* виявляли значно вищий рівень резистентності до цефуроксиму, азитроміцину, антибіотиків тетрациклінового ряду. До фторхінолонів стійких планктонних ізолятів золотистого стафілококу виявлено не було.



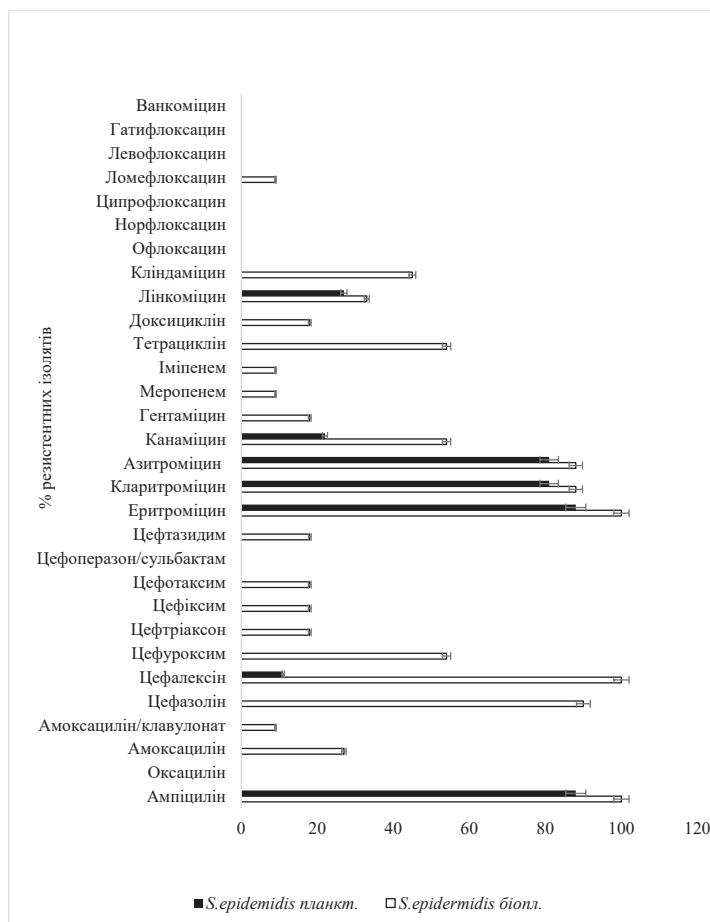
**Рис. 2. Порівняльна характеристика антибіотикорезистентності біоплівкотвірних та планктонних штамів *S. aureus*, ізольованих у разі тонзиліту**

Серед епідермальних стафілококів виявлена аналогічна тенденція вищого рівня резистентності серед біоплівкотвірних ізолятів (рис. 3). Таку закономірність виявляли до ампіциліну, цефалексіну, макролідів, канаміцину та лінкоміцину. До фторхінолонів усі планктонні ізоляти епідермального стафілококу були чутливими, серед біоплівкотвірних – виявляли стійкі до ломефлоксацину.

Встановлено, що більшість стафілококів, які утворювали біоплівку, проявляли підвищений рівень резистентності до антибіотиків та входили до складу асоціацій.

Біоплівкотвірні властивості можуть визначати перебіг та хронізацію інфекційного процесу [13; 14], оскільки особливістю мікроорганізмів, персистуючих у біоплівках, є множинна резистентність до широко застосованих антибіотиків, ефекторів імунної системи, мікробів-антагоністів.

Отримані дані вказують на доцільність визначення не тільки чутливості до антибіотиків, а й концентрації, що здатна викликати деструкцію біоплівки та антимікробну активність на біоплівкотвірні ізоляти, які є представниками сапрофітної мікробіоти макроорганізму.



**Рис. 3. Порівняльна характеристика антибіотикорезистентності біоплівкотвірних та планктонних штамів *S. epidermidis*, ізольованих у разі тонзиліту**

#### ЛІТЕРАТУРА

- Urban-Chmiel R., Marek A., Stępień-Pyśniak D., Wiczorek K., Dec M., Nowaczek A., Osek J. Antibiotic Resistance in Bacteria – A Review. *Antibiotics*. 2022. 11(8). 1079.
- Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. *Microbe Magazine*. 2015. 10 (9). 354–355.
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004. 2. 95–108.
- Appelbaum PC. Bacterial Resistance in the New Millennium: Its impact on antibiotic selection for respiratory tract infections. *Postgraduate medicine*. 2000. 108 (7 Suppl Contemporaty). 5–16.
- Assaf A.M., Amro B.I., Mashallah S., Haddadin R.N. Antimicrobial and anti-inflammatory potential therapy for opportunistic microorganisms. *The Journal of infection in developing countries*. 2016. 10(05). 494.
- Jenkinson H.F., Lamont R.J. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol.* 2005. 13. 589–595.
- Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Whitman W. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer Science & Business Media. 2011. (3).
- O'Toole G. Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm Formation as Microbial Development. *Annual Review of Microbiology*. *Annual Reviews*. 2000. 54(1). 49–79.
- Otto M. *Staphylococcal biofilms*. Bacterial biofilms. 2008. 207–228.
- Vuong C., Saenz H.L., Gotz F., Otto M. Impact of agr quorum sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.* 2000. 182. 1688–1693.
- Yazdani R., Oshaghi M., Havayi A. Detection of icaAD gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. *Iran J Public Health*. 2006. 35(2). 25–28.
- Zhang Yu-Zhi, Singh S. Antibiotic stewardship programmes in intensive care units: Why, how, and where are they leading us. *World J. Crit. Care Med.* 2015. 4(1). 13–28.
- Kryvtsova M.V., Király J., Koščová J., Kostenko Y.Y., Bubnov R.V., Spivak M.Ya. Determination of biofilm formation and associated gene detection in *Staphylococcus* genus isolated from the oral cavity under inflammatory periodontal disease. *Biol. Stud.* 2020. 14(3). 49–64.
- Kryvtsova M.V., Kostenko Y.Y. Dominant microbial associations of oral cavity periodontitis and features of their sensitivity to antibacterial drugs. *Studia Biologica*. Ivan Franko National University of Lviv. 2020. 14(1). 51–62.