

О.В. Іщенко
А.О. Юхименко
І.П. Кошова
С.І. Ільченко
Д.О. Степанський

Державний заклад
«Дніпропетровська ме-
дична академія
Міністерства охорони
здоров'я України»

Надійшла: 28.07.2019

Прийнята: 24.08.2019

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.40-47>

УДК 615.28:579.861.2:579.61:616-078

БІОПЛІВКОУТВОРЮЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ КЛІНІЧНИХ ІЗОЛЯТІВ PSEUDOMONAS AERUGINOSA, ВИДІЛЕНИХ ВІД ДІТЕЙ ХВОРИХ НА МУКОВІСЦИДОЗ, ТА МОЖЛИВОСТІ ВПЛИВУ BACILLUS SUBTILIS НА НИХ IN VITRO

Ishchenko O.V.  ✉, Yukhymenko A.O., Koshova I.P. , Ilchenko S.I. , Stepanskyi D.O.  **Biofilm-forming properties of clinical isolates *Pseudomonas aeruginosa* collected from children with Cystic Fibrosis and potential *Bacillus subtilis* impact in vitro.**

State Institution «Dnipropetrovsk Medical Academy of Health Ministry of Ukraine», Dnipro, Ukraine


ABSTRACT. Background. *Pseudomonas aeruginosa* infection determines clinical prognosis in patients with Cystic Fibrosis. Mucoid strains of *P. aeruginosa* are capable of forming biofilms and growing in them. Given the multiple resistance of microorganisms forming biofilms, the perspective of using *Bacillus spp.* for the purpose of sanitizing surfaces where pathogens may persist is being discussed. **Objective.** To study the biofilm-forming ability of *P. aeruginosa* clinical isolates from children with Cystic Fibrosis and to determine the impact of *B. subtilis* on them *in vitro*. **Methods.** Sputum and/or mucus samples from a deep smear from the posterior pharyngeal wall were collected from children with Cystic Fibrosis. Bacteriological, microscopic, biochemical and statistical research methods were used. The antagonistic properties of *P. aeruginosa* and *B. subtilis* were studied by the method of delayed antagonism and inco-cultivation experiments in a liquid nutrient medium followed by inoculation serial dilutions. Biofilm forming ability was determined by express-method using 96-well plates. **Results.** Bacteriological survey showed that *P. Aeruginosa* was isolated from 34.21% (95% CI 32.50-35.92) of samples. It was found that *B. subtilis* has direct moderate antagonism against *P. aeruginosa* in the delayed antagonism study as well as after their co-cultivation in a liquid nutrient medium. After co-cultivation the abundant growth of bacilli in all experiments at all repetitions as well as limitation of the *P. aeruginosa* growth was showed. The biofilm formation was determined in 76.92% (95% CI 73.02-80.77) of *P. aeruginosa* clinical isolates, and in 100% of *B. subtilis* samples. The *B. subtilis* was able to form biofilm in the presence of *P. aeruginosa* in most cases during co-cultivation experiments. **Conclusion.** Clinical isolates of *P. aeruginosa* isolated from children with Cystic Fibrosis are moderately susceptible to *B. subtilis in vitro*. Biofilm formation of *P. aeruginosa* can be suppressed by *B. subtilis in vitro*.

Key words: cystic fibrosis, *P. aeruginosa*, mucoid phenotype, biofilm, *B. subtilis*, antagonism.

Citation:


Ishchenko OV, Yukhymenko AO, Koshova IP, Ilchenko SI, Stepanskyi DO. [Biofilm-forming properties of clinical isolates *Pseudomonas aeruginosa* collected from children with Cystic Fibrosis and potential *Bacillus subtilis* impact in vitro]. *Morphologia*. 2019;13(3):40-7. Ukrainian.

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2019.3.40-47>

 Ishchenko O.V. 0000-0001-6350-8176

 Koshova I.P. 0000-0002-5631-8005

 Ilchenko S.I. 0000-0003-2181-1833

 Stepanskyi D.O. 0000-0001-6350-8176

✉ med.oksana2017@gmail.com

© SI «Dnipropetrovsk Medical Academy of the Ministry of Health of Ukraine», «Morphologia»

Вступ
Муковісцидоз (МВ) – генетичне захворювання з аутосомно-рецесивним типом успадкування

вання, поширене в усіх етнічних групах, і є найчастішою спадковою патологією у світі. Природний перебіг МВ тяжкий, і без лікування

більш ніж 80% випадків закінчуються летально у перші роки життя [1].

Причиною захворювання є наявність мутацій в гені трансмембранного регуляторного білка муковісцидозу (ТРБМ). Порушення іонного транспорту через дисфункцію ТРБМ призводять до дегідратації та ацидифікації слизових оболонок, підвищення в'язкості бронхіальної секрету, зниженню мукоциліарного кліренсу, обтурації дихальних шляхів в'язким слизом, що створює умови для хронічної бронхолегеневої інфекції та запалення, які є основною причиною захворюваності та смертності серед пацієнтів з МВ [1-4].

Важкий перебіг захворювання, з ранньою маніфестацією легневих проявів і раннім інфікуванням *P. aeruginosa* характерний для хворих гомозиготних по мутації *F508del* [2,5]. Повідомляють, що до 80% дорослих інфіковані синьогнійною інфекцією. В чисельних дослідженнях доведено, що чим довше пацієнт залишається неінфікованим *P. aeruginosa*, тим більшою залишається очікувана тривалість життя [5].

Адгезія до клітин епітелію у *P. aeruginosa* реалізується мікрворсинками, а її нейрамінідаза полегшує специфічну взаємодію. Бактерії *Pseudomonas spp.* утворюють капсулу полісахаридної природи та синтезують альгінат, що захищає їх від протимікробної дії. Ферменти та токсини мікроорганізму обумовлюють некроз стінок альвеол, дрібних бронхів та судин, що призводить до розвитку тромбозу і крововиливів. Бактеріальний васкуліт на ряду з дефектом ТРБМ відіграє провідну роль у персистенції збудників [6-8].

Ключовим при МВ є саме мукоїдний фенотип *P. aeruginosa*. Мукоїдні штами здатні до формування біоплівки та росту в них. Для хронічної *P. aeruginosa*-інфекції в дихальних шляхах характерно існування біоплівки в анаеробних умовах густого слизу [1,3,8]. Біоплівки – організовані бактеріальні консорціуми клітин, у складі яких існування клітини істотно відрізняється від такої у планктонній формі [6-10]. Біоплівки синьогнійної палички в 8-32 рази більш стійкі до дії усіх класів бета-лактамів в порівнянні з мікроорганізмами, що не утворюють біоплівки [8].

Основним структурним компонентом біоплівки є матрикс, представлений мікробними екзополісахаридами, білками і гліколіпідами. Клітини у плівці упорядковані у вигляді грибоподібних утворень і «стовпів», «цементованих» екзополісахаридами. Матрикс розділений каналами, заповненими водою, мас порошини. По каналах транспортуються поживні речовини та кисень, видаляються продукти життєдіяльності бактерій. У глибоких шарах розташовуються клітини, метаболізм яких переключу-

чений на анаеробний тип дихання. «Зрілі» плівки постійно виділяють у оточуюче середовище планктонні клітини і цілі фрагменти, здатні вкривати біоплівкою нові поверхні.

Взаємостосунки окремих субпопуляцій мікроорганізмів у складі біоплівки регулюються механізмом міжклітинних комунікацій «*quorumsensing*». Він функціонує через продукцію бактеріальними клітинами сигнальних молекул, які забезпечують колективну координацію експресії і репресії генів в мікробній популяції, забезпечуючи регуляцію складу бактеріальної популяції.

Бактеріальні клітини, вкарбовані у матрикс, захищені від зовнішніх впливів і відрізняються високим рівнем толерантності до дії факторів імунітету та протимікробних засобів. Полімери матриксу виконують роль молекулярного фільтру, що запобігає хімічним впливам на клітини [6-10]. Гліцерол-фосфорильовані бета-глюкани *P. Aeruginosa* активно сорбують дрібні молекули протимікробних засобів. У полімікробних плівках антибіотикорезистентні клітини виділяють ензими та антибіотик-зв'язуючі протеїни, а висока щільність мікробної популяції стимулює обмін генетичною інформацією, у т.ч. детермінантами антибіотикорезистентності. Клітини-персистери – метаболічно неактивні субпопуляції в складі біоплівки, в яких відсутні процеси біосинтезу, що робить їх невразливими до дії антибіотиків і хіміопрепаратів. Таким чином, можливості впливу на патогени, що знаходяться у складі біоплівки, істотно обмежені [7, 10]. Саме такі біоплівкоутворюючі ізоляти сприяють розвитку хронічного запалення, при якому патологічний процес може тривати десятиліттями [7, 8].

Джерелом інфекції для дитини з МВ є хворий або бактеріоносії, який виділяє *P. aeruginosa*, забруднені нею поверхні виробів медичного і загального призначення [6]. Загальноприйнятим та ефективним підходом для вирішення зазначеної проблеми є застосування дезінфектантів [11].

З огляду на труднощі лікування інфекції, викликані *P. aeruginosa*, цікаво було дослідити альтернативний метод впливу на її біоплівки. Заслужують уваги повідомлення про високу ефективність обробки поверхонь в закладах охорони здоров'я з використанням пробіотичних бактерій *Bacillus spp.* [12-17]. Зокрема, *Vincenza La Fauci* та ін. (2015) встановили достовірне зниження біонавантаження на тест-поверхні на 92,22–99,99% через 24 години після застосування детергенту; а в польових випробуваннях відзначали, що навіть при поточному використанні поверхніз неї не виділяється *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* [14]. В багатоцентровому

проспективному дослідженні показали, що використання детергенту з *Bacillus spp.* було достовірно пов'язане зі зниженням загальної захворюваності на інфекції, пов'язані з наданням медичної допомоги, відмічали достовірне стабільне зменшення патогенних мікроорганізмів на оброблюваних поверхнях і зниження експресії генів стійкості до лікарських засобів в порівнянні зі звичайним дезінфектантом [15].

Враховуючи парадигму існування мікроорганізмів в умовах біоплівки (перш за все, з огляду на їх множинну резистентність) нас зацікавила можливість дослідити здатність клінічних ізолятів *P. aeruginosa* від дітей з МВ та *B. subtilis* до утворення біоплівки та можливий антагоністичний вплив *B. subtilis* на біоплівкоутворюючі властивості *P. aeruginosa* *in vitro*.

Мета роботи: вивчити біоплівкоутворюючі властивості клінічних ізолятів *P. aeruginosa*, виділених від дітей з МВ, та вплив на них *B. Subtilis in vitro*.

Матеріали та методи

Для дослідження взято 76 зразків мокротиння та/або слизу з глибокого мазку з задньої стінки глотки від 24 пацієнтів, хворих на МВ, віком від 1 до 17 років.

В ході дослідження використовували методи:

- бактеріологічний з виділенням чистої культури *P. aeruginosa* та *B. subtilis*;
- мікроскопічний – світлова та фазово-контрастна мікроскопія;
- біохімічний – для дослідження біологічних властивостей мікроорганізмів та її ідентифікації;
- вивчення здатності до утворення біоплівки *P. aeruginosa* та *B. Subtilis* експрес-методом з використанням 96-луночних планшетів;
- вивчення антагоністичних властивостей *B. Subtilis* до *P. aeruginosa* методом відстроченого антагонізму, спільного культивування та при культивуванні біоплівки;
- статистично-аналітичні для оцінки достовірності відмінностей між одержаними даними.

Вивчення відстроченого антагонізму за методикою перпендикулярних штрихів. Суспензію бацил (0,5 за стандартом мутності McFarland) наносили петлею у вигляді смужки товщиною 2 мм на дно чашки Петрі з м'ясо-пептонного агару (МПА). Посіви інкубували в термостаті при температурі 37,0°C протягом 24 годин. Для визначення антагоністичної активності до культури, що виросла, підсвали перпендикулярним штрихом суспензії культур *P. aeruginosa* в 0,85 % розчині натрію хлориду товщиною 1 мм (0,5 за стандартом мутності McFarland).

Облік результатів дослідження проводили через 18 годин інкубування в термостаті при температурі 37,0°C за розміром зон пригнічення росту культур *P. aeruginosa*. Провели 12 тестів. Контролем росту був їх паралельний висів на МПА без дослідного ізоляту.

Результати оцінювали за гальмуванням росту *P. aeruginosa*: зони затримки росту 0–5 мм (–) – неактивні, 6–10 мм (+) – помірно активні, 11–15 мм (++) – активні, більше 16 мм (+++) – високоактивні. Відповідно антагоністичну активність *B. subtilis* оцінювали як «відсутню», «слабку», «помірну» та «сильну».

Вивчення антагоністичних властивостей на рідкому поживному середовищі. Готували суспензії культур *P. aeruginosa* та *B. Subtilis* 1,0 за стандартом мутності за McFarland. Далі в 1 мл м'ясо-пептонного бульйону (МПБ) вносили готові суспензії культур *P. aeruginosa* та *B. subtilis* в кількості 100 мкл кожна. Спільну культивування проводили в термостаті протягом 18 годин при температурі 37°C.

Отриману мікробну суспензію в кількості 100 мкл послідовно серійно розводили в МПБ з коефіцієнтом розведення 10. З вихідної кількості клітин отримали серію $10^2 - 10^{12}$ на 1 мл. Суспензію мікроорганізмів з серійних розведень в кількості 100 мкл інокулювали на поверхню МПА одразу після приготування одночасно на 4 чашках Петрі для кожного розведення.

Облік результатів проводили після 24 год. інкубації в термостаті при температурі 35°C шляхом підрахунку кількості колоній *P. aeruginosa* та *B. subtilis* з урахування ступеня розведення.

Паралельно проводили інкубацію чистих культур з подальшим висівом на МПА для контролю їх росту.

Результати оцінювали за пригніченням росту тест-культури в порівнянні з контролем.

Біоплівкоутворююча здатність *P. aeruginosa* та *B. Subtilis* та їх взаємний антагоністичний вплив

Констатацію явища формування біоплівки проводили у стаціонарній системі експрес-методом з використанням 96-луночного планшету. Спершу вивчали здатність чистих культур *P. aeruginosa* та *B. Subtilis* утворювати біоплівку. Далі – здатність *P. aeruginosa* утворювати біоплівку в присутності *Bacillus spp.* Для одного зразка одночасно використовували по 5 лунок. Дослід повторили 5 разів.

Добову культуру суспендували в стерильному ізотонічному розчині *NaCl* за стандартом мутності McFarland 1×10^6 КУО/мл. Отриману суспензію по 50 мкл вносили у лунки планшету, що містили 150–200 мкл поживного бульйону. Інкубацію проводили в термостаті за температурі 37°C протягом 72 годин. Після закінчення інкубації залишки живильного середовища обе-

режно відбирали шприцом, а лунки промивали тричі ізотонічним розчином *NaCl*. Якщо лишалася плівка, мікроорганізм вважали біоплівкоутворюючим.

Утворені біоплівки обережно знімали бактеріологічною петлею, поміщали на знежирене предметне скло, фіксували етиловим спиртом та висушували протягом 30 хв.

Далі препарат фарбували протягом 15 хв. насиченим водним розчином Конго червоного, промивали проточною водою та висушували.

Потім препарат дофарбовували протягом 6 хв. 10% розчином карболового фуксину, повторно промивали під проточною водою та висушували.

Для візуалізації утворених біоплівок використовували імерсійну систему світлового мікроскопу (збільшенням $\times 900$).

Планктонні клітини бактерій у результаті фарбування карболовим фуксином мали пурпурний колір, а пофарбований Конго червоним матрикс (бактеріальний екзополісахарид та білок) – рожевий.

Результати та їх обговорення

При бактеріологічному дослідженні встановили, що *P. Aeruginosa* виділяється з 34,21% (95% ДІ 32,50-35,92) ізолятів. Треба зазначити, окрім ізолятів з типовими культуральними та морфологічними властивостями, зустрічалися й такі, що не утворювали специфічний пігмент; ряд ізолятів мав мукоїдним фенотип, а також змінену хіміотерапевтичною чутливість до бета-лактамних антибіотиків. Саме тому особлива увага була приділена чутливості виділених ізолятів до антагоністичної дії бацил.

Результати дослідження відстроченого антагонізму методом перпендикулярних штрихів між *P. aeruginosa* та *B. Subtilis* продемонстрували, що *B. subtilis* володіють прямим помірним антагонізмом по відношенню до *P. aeruginosa*, зона затримки росту склала 8,55 мм (95% ДІ 8,12-8,98).

Результати вивчення антагонізму в рідкому поживному середовищі співзвучні з даними, отриманими за попередньою методикою. Культури *P. aeruginosa* виявилися помірно чутливими до дії бацил. При посіві серійних розведень отримано помірний ріст *P. aeruginosa* 1,94 Іг КУО/мл (95% ДІ 1,84 – 2,04), та спостерігали деяке обмеження росту *B. subtilis* до 5,01 Іг КУО/мл (95% ДІ 4,91 – 5,11). Для порівняння в контрольних висівах отримали 8,06 Іг КУО/мл (95% ДІ 7,66-8,46) і 8,18 Іг КУО/мл (95% ДІ 7,77-8,59) відповідно.

Таким чином, при спільній культивуванні в рідкому поживному середовищі показано конкуруючу взаємодію за типом прямого антагонізму між *B. subtilis* та *P. aeruginosa*. Культура пробіотичних бацил давала яasnий ріст в усіх дослідках при всіх повтореннях, обмежуючи ріст *P. aeruginosa*.

Серед виділених ізолятів *P. aeruginosa* експрес-методом встановлено здатність до біоплівкоутворення в 76,92% (95% ДІ 73,02-80,77) випадків.

Особливості утворення біоплівок клінічними ізолятами *P. aeruginosa*, виділених від дітей, хворих на МВ, ілюстровані рис. 1-4. Урахування результатів дослідів проведені на 24, 48, 72 та 96 годинах культивування. В нашому дослідженні на початкових стадіях плівкоутворення *P. Aeruginosa* відмічали утворення розеток і тяжів, які в подальшому зливаються у багатоклітинні конгломерати, з їх наступним перетворенням в острівці більшого розміру.

На кінець першої доби відмічали появу бактеріальних конгломератів, що являли собою утворення неправильної форми (рис 1a і 1b). Процес утворення бактеріальної плівки був багатоцентричним. Щільність укриття бактеріальними конгломератами *P. Aeruginosa* по завершенні першої доби культивування відображає рис. 1b. Дрібними, неправильної форми утвореннями була ясно вкрита майже уся поверхня, охоплена полем зору. При цьому більшість елементів відособлені, в окремих локусах спостерігається злиття елементів з тенденцією до утворення ущільнених островків, яких на цьому етапі плівкоутворення обмаль.

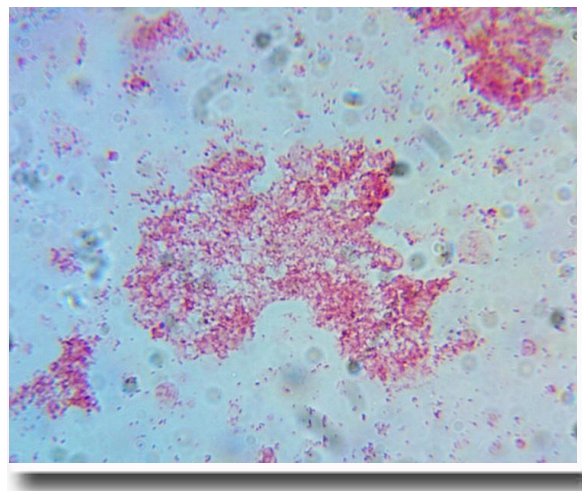


Рис. 1а. Біоплівка *P. aeruginosa* на кінець першої доби культивування. Фарбування фуксином. $\times 900$.

Після 48-ми годинного культивування (рис. 2) значна площа поверхні укрита утвореннями різної неправильної форми з нерівним краєм, згрупованими по кілька елементів, схильними до злиття у ще більші островки. Щільність цих утворень, у порівнянні із конгломератами, спостереженими на першу добу, дозволяє припустити, що збільшення структурних елементів відбувається у трьох вимірах.

По завершенні третьої доби культивування (рис. 3) спостерігали збільшення кількості описаних вище островків, зменшення простору між окремими фрагментами біоплівки. Тяжі між

різними ділянками витягувались та стали щільними, спрямовані на замкнення сітчастої структури біоплівки.

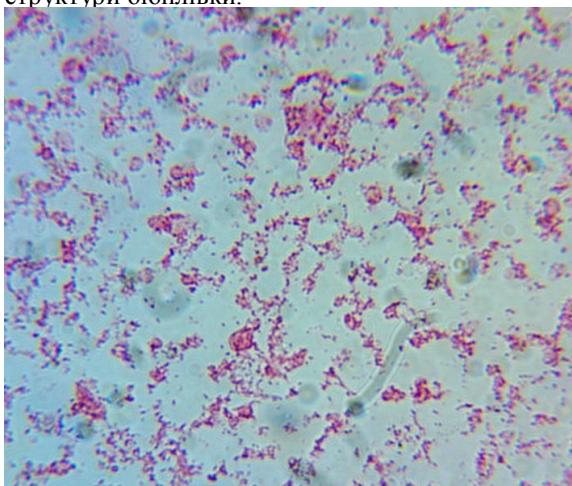


Рис. 1б. Біоплівка *P. aeruginosa* на кінець першої доби культивування. Фарбування фуксином. $\times 900$.

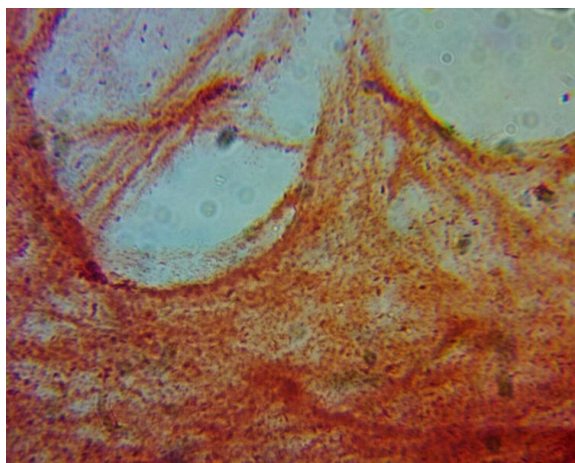


Рис. 2. Біоплівка *P. aeruginosa* після 48 годин культивування. Забарвлення фуксином. $\times 900$.

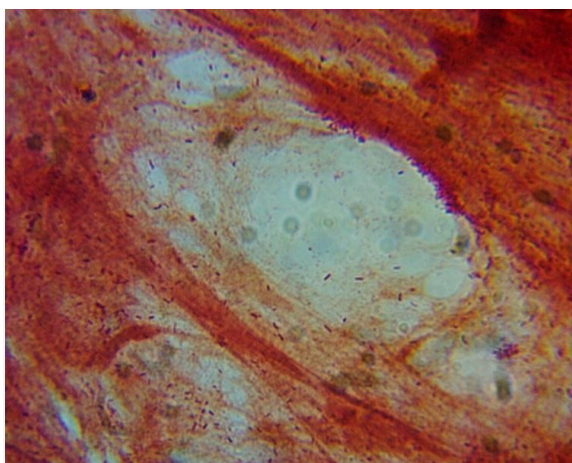


Рис. 3. Біоплівка *P. Aeruginosa* після 72-х годин культивування. Забарвлення фуксином. $\times 900$.

На четверту добу культивування (рис.4) за-

вершення формування біоплівки візуально характеризувалось утворенням суцільно пов'язаної сітчастої системи без окремо розташованих елементів, що являла собою практично однорідну структуру. Біоплівку не можна було назвати моношаром, оскільки у її структурі залишались вільні зони. Неоднорідність забарвлення спостережених структур дозволяє припустити наявність у структурі плівки площин, заповнених бактеріальним екзополісахаридним матриксом.

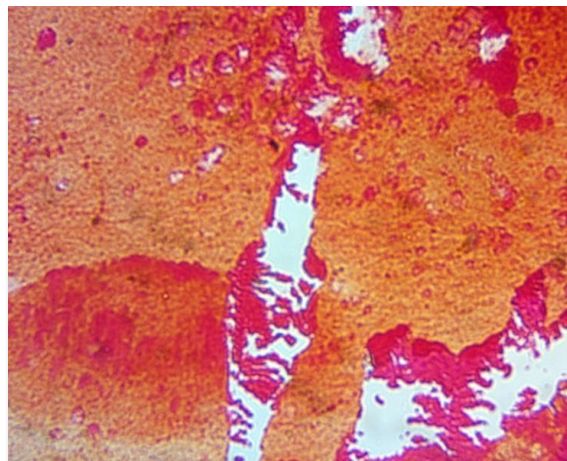


Рис. 4. Біоплівка *P. aeruginosa* на кінець 4-ї доби культивування. Забарвлення фуксином. $\times 900$.

Чиста культура *B. subtilis* формувала макроскопічно білу плівку з дрібним рельєфом в усіх лунках при повторних експериментах, тобто у 100% випадків. Мікроскопічно вони складаються з ланцюгів, утворених клітинами, які переплітались з утворенням трьохвимірної сітки (рис. 5, 6, 7).

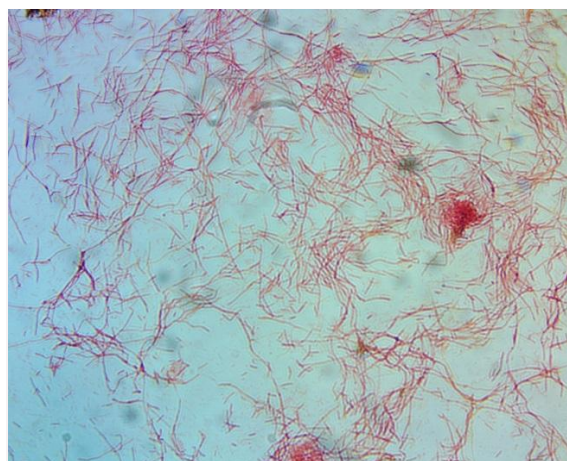


Рис. 5. Початок агрегації *B. subtilis* в біоплівку, 6 годин культивування. Фарбування водний розчин Конго червоний та карболовий фуксин. $\times 900$.

Результати дослід з вивчення здатності *B. subtilis*, утворювати біоплівку при спільному культивуванні з клінічними ізолятами *P.*

aeruginosa корелюють з даними по вивченню відстроченого антагонізму. Нами встановлено, що *B. subtilis* утворюють біоплівку в тому числі в присутності *P. Aeruginosa* в 56,87% (95% ДІ 54,03-59,71) випадків. В таких лунках біоплівка була сформована *B. subtilis*, планктонні клітини *P. aeruginosa* поодинокі (рис. 8, 9). В 27,41% (95%ДІ 26,04-28,78) випадків за своєю архітектонікою біоплівка належала саме *P. aeruginosa*, проте виявляли чисельні планктонні клітини *B. subtilis*.

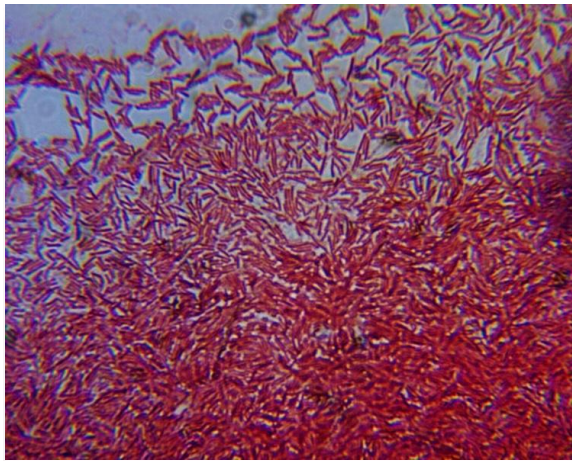


Рис. 6. Біоплівка *B. Subtilis* після 48 годин культивування. Забарвлення водний розчин Конго червоний та карболовий фуксин. ×900.

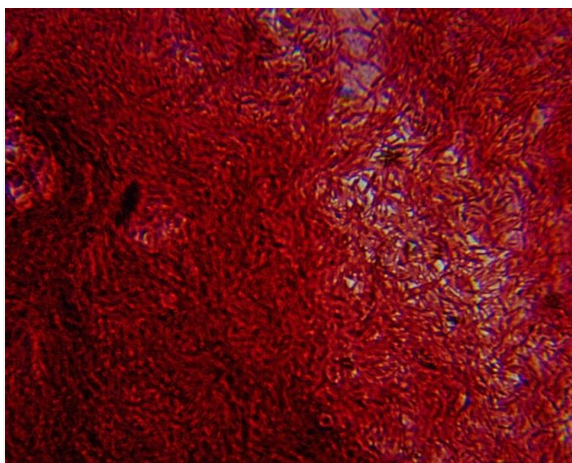


Рис.7. Біоплівка *B. subtilis*. після 72 годин культивування. Забарвлення водний розчин Конго червоний та карболовий фуксин. ×900.

Можна виказати припущення, що в середині біоплівки, яку формують пробіотичні мікроорганізми, існує міжродова взаємодія по типу конкурентного антагонізму, в якій домінує саме *B. subtilis*.

Висновки

- 1) Клінічні ізоляти *P. aeruginosa*, виділені від дітей з МВ чутливі до дії *B. subtilis* в експериментах з вивчення антагонізму;
- 2) Клінічні ізоляти *P. aeruginosa*, виділені

від дітей з МВ, здатні до утворення біоплівок, що створює умови для тривалої персистенції; такі ізоляти володіють високою резистентністю до механічного кліренсу та дії протимікробних засобів;

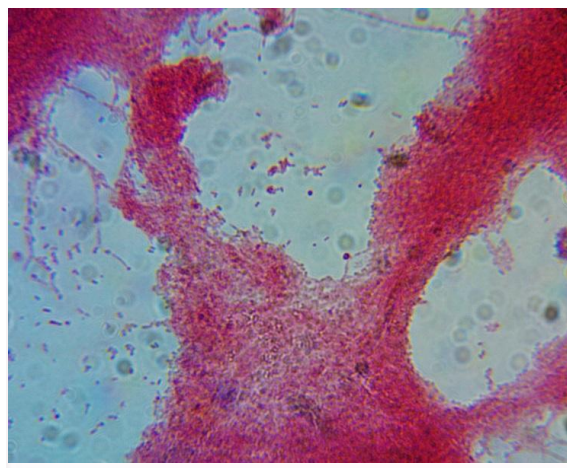


Рис. 8. Біоплівка при спільному культивуванні *B. Subtilis* та *P. aeruginosa*, 48 год. Забарвлення Конго червоний та карболовий фуксин. ×900.

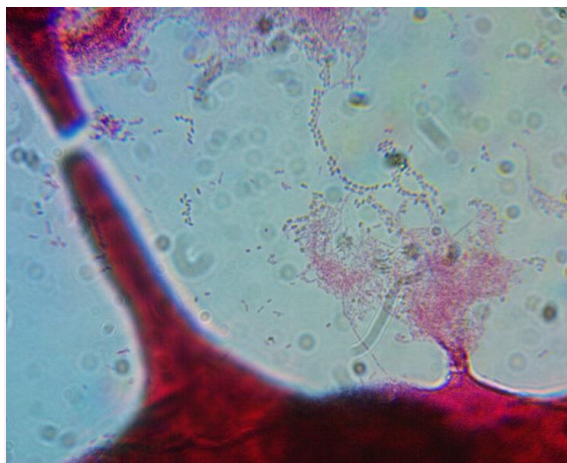


Рис. 9. Біоплівка при спільному культивуванні *B. Subtilis* та *P. aeruginosa*, 72 год. Забарвлення Конго червоний та карболовий фуксин. ×900.

Біоплівкоутворення клінічними ізолятами *P. Aeruginosa in vitro* може бути пригнічено дією *B. subtilis*, що, напевно, обумовлено антагоністичною взаємодією.

Перспективи подальших досліджень

Враховуючи доведений профіль безпеки *B. Subtilis* та широке застосування їх в якості пробіотиків, видається можливим використання бацил в якості засобу для санітарної обробки поверхонь з метою профілактики поширення *P. aeruginosa*-інфекції серед пацієнтів з МВ, що, безумовно, потребує подальших досліджень.

Інформація про конфлікт інтересів

Потенційних або явних конфліктів інтересів, що пов'язані з цим рукописом, на момент публікації не існує та не передбачається.

Літературні джерела References

1. Gilligan PH. Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update. *Clin Lab Med.* 2014;34(2):197-217. DOI: 10.1016/j.cll.2014.02.001.
2. Ilchenko SI. [Clinical and microbiological peculiarities of mucoviscidosis course in children of big industrial city]. *Pathologia.* 2014;3(32):73-77. Ukrainian. DOI: 10.14739/2310-1237.2014.3.36980
3. Huang YJ, LiPuma JJ. The Microbiome in Cystic Fibrosis. *Clin Chest Med.* 2016;37(1):59-67. DOI: 10.1016/j.ccm.2015.10.003.
4. Lezhenko GO, AbaturOVYe, PashkovaOYe, Pantyushenko LI. [Pathogenetic significance of antimicrobial peptides in the implementation of antibacterial protection in children with Cystic Fibrosis]. *Zdoroverebenka.* 2013;3(46):44-49. Ukrainian.
5. Pressler T, Bohmova C, Conway S, Dumcius S, Hjelte L, Hoiby N, Kollberg H, Tümmler B, Vavrova V. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection definition: EuroCareCF Working Group report. *J Cyst Fibros.* 2011;(2):75-78. DOI: 10.1016/S1569-1993(11)60011-8. 6. Lazareva AV, Tchebotar IV, Kryzhanovskaya OA., Tchebotar VI, Mayanskiy NA. [Pseudomonas aeruginosa: Pathogenicity, Pathogenesis and Diseases]. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2015;3(17):170-186. Russian.
7. Trofimenko Yu Yu. [Biological features of microflora colonizing endotracheal intubation tubes in intensive care units]. Thesis for the PhD degree in Medical Sciences. Vinnytsia National Medical University named after MI Pirogov. Vinnytsia, 2015 - 127 p. Ukrainian. URL: https://www.vnmu.edu.ua/downloads/other/dis_trofimenko.pdf
8. Hoppe JE, Harris JK, Zemanick ET. Assessing the Airway Microbiota in Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Newsletter.* 2016;38(22):179-184.
9. Galkin MB, Ivanytsia VO, Galkin BM, Filipova TO. [Biofilm matrix – chemical composition, structure, functions]. *Microbiology & Biotechnology.* 2016;4:6-27. Ukrainian. DOI [http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.4\(36\).86349](http://dx.doi.org/10.18524/2307-4663.2016.4(36).86349).
10. Rakhmatullina MR, Nechayeva IA. [Biofilms of microorganisms and their role for the formation of resistance to antibacterial drugs]. *Vestnik dermatologii i venerologii.* 2015;(2):58—62. Russian.
11. Al-Marzooq F, AlBayat S, Sayyar F, Ishaq H, Nasralla H, Koutaich R, AlKawas S. Can probiotic cleaning solutions replace chemical disinfectants in dental clinics? *Eur J Dent.* 2018;12(4):532–539. DOI: 10.4103/ejd.ejd_124_18. PMID: PMC6178676. PMID: 30369799.
12. Carling PC, Parry MF, Bruno-Murtha LA, Dick B. Improving environmental hygiene in 27 intensive care units to decrease multidrug-resistant bacterial transmission. *Crit Care Med.* 2010;38(4):1054–1059. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181cdf705>. PMID: 20081531
13. Rutala WA, Weber DJ. Selection of the ideal disinfectant. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014;35(7):855–865. <https://doi.org/10.1086/676877>. PMID: 24915214.
14. La Fauci V, Costa GB, Anastasi F, Facciola A, Grillo OC, Squeri R. An Innovative Approach to Hospital Sanitization Using Probiotics: In Vitro and Field Trials. *J Microb Biochem Technol.* 2015;7(3):160-164. DOI <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000198>.
15. Caselli E, Brusaferrero S, Coccagna M, Arnoldo L, Berloco F, Antonioli P. Reducing healthcare-associated infections incidence by a probiotic-based sanitation system: A multicentre, prospective, intervention study. *PLoS ONE.* 2014;13(7):1-17: e0199616. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199616>. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6042698/pdf/pone.0199616.pdf>
16. Maria DA, Irene S, Piffanelli M, Bisi M, Mazzacane S, Caselli E. Efficient removal of hospital pathogens from hard surfaces by a combined use of bacteriophages and probiotics: potential sanitizing agents. *Infection and Drug Resistance.* 2018;11:1015–1026. DOI: 10.2147/IDR.S170071. PMID: PMC6071622. PMID: 30104889.
17. Afinogenova AG, Kraeva LA, Ainogenov GE, Veretennikov VV. [Probiotic-based sanitation as alternatives to chemical disinfectants]. *Russian Journal of Infection and Immunity.* 2017;4(7):419–424. Russian. doi: 10.15789/2220-7619-2017-4-419-424.

Іщенко О.В., Юхименко А.О., Кошова І.П., Ільченко С.І., Степанський Д.О. Біоплівкоутворюючі властивості клінічних ізолятів *pseudomonas aeruginosa*, виділених від дітей хворих на муковісцидоз, та можливості впливу *bacillus subtilis* на них *in vitro*.

РЕФЕРАТ. Актуальність. Інфікування *Pseudomonas aeruginosa* визначає клінічний прогноз у пацієнтів з муковісцидозом. Мукоїдні морфотипи *P. Aeruginosa* здатні до формування біоплівок та росту

в них. З огляду на множинну резистентність біоплівок обговорюється можливість використання *Bacillus spp.* з метою санітарної обробки поверхонь, на яких можуть зберігатися патогени. **Мета**– вивчити біоплівкоутворюючі властивості клінічних ізолятів *P. aeruginosa*, виділених від дітей з муковісцидозом, та вплив на них *Bacillus subtilis in vitro*. **Методи.** Зразки мокротиння та/або слизу з глибокого мазку з задньої стінки глотки взяті від дітей хворих на муковісцидоз. Використано бактеріологічний, мікроскопічний, біохімічний та статистичний методи дослідження. Антагоністичні властивості *P. Aeruginosa* та *B. Subtilis* вивчали методом відстроченого антагонізму з використанням методики перпендикулярних штрихів та при спільному культивуванні в рідкому поживному середовищі з наступним висівом серійних розведень суспензій. Здатність до утворення біоплівковизначали експрес-методом з використанням 96-луночних планшетів. **Результати.** При бактеріологічному дослідженні встановили, що *P. aeruginosa* виділяється з 34,21% (95% ДІ 32,50-35,92) зразків. При вивченні відстроченого антагонізму між *P. Aeruginosa* і *B. subtilis*, а також при їх спільному культивуванні в рідкому поживному середовищі виявили, що *B. Subtilis* володіють прямим помірним антагонізмом по відношенню до *P. aeruginosa*. Після спільної культивації культура бацил давала рясний ріст в усіх дослідах при всіх повтореннях, обмежуючи ріст *P. aeruginosa*. Серед виділених ізолятів *P. aeruginosa* встановлено здатність до біоплівкоутворення в 76,92% (95% ДІ 73,02-80,77) випадків, серед зразків *B. subtilis* – в 100%. При спільному культивуванні *B. subtilis* утворювали біоплівку в присутності *P. aeruginosa* в більшості випадків. **Висновки.** Клінічні ізоляти *P. aeruginosa*, виділені від дітей з муковісцидозом помірно чутливі до дії *B. subtilis in vitro*. Біоплівкоутворення *P. Aeruginosa in vitro* може бути пригнічене дією *B. subtilis*.

Ключові слова: муковісцидоз, *P. aeruginosa*, мукоїдний фенотип, біоплівка, *B. subtilis*, антагонізм.

Ищенко О.В., Ефименко А.О., Кошечая И.П., Ильченко С.И., Степанский Д.А. Биопленкообразующие свойства клинических изолятов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных от детей больных муковисцидозом, и возможности влияния *Bacillus subtilis* на них *in vitro*.

РЕФЕРАТ. Актуальность. Инфицирование *Pseudomonas aeruginosa* определяет клинический прогноз у пациентов с муковисцидозом. Мукоидный фенотип *P. Aeruginosa* способен к формированию биопленок и роста в них. Учитывая множественную резистентность микроорганизмов, образующих биопленки, обсуждается возможность использования *Bacillus spp.* с целью санитарной обработки поверхностей, на которых могут сохраняться патогены. **Цель**– изучить биопленкообразующую способность клинических изолятов *P. aeruginosa*, выделенных от детей больных муковисцидозом, и влияние на них *B. Subtilis in vitro*. **Методы.** Образцы мокроты и/или слизи из глубокого мазка с задней стенки глотки были отобраны у детей больных муковисцидозом. Использованы бактериологический, микроскопический, биохимический и статистический методы исследования. Антагонистические свойства *P. aeruginosa* и *B. subtilis* изучали методом отсроченного антагонизма с использованием методики перпендикулярных штрихов и при совместном культивировании в жидкой питательной среде с последующим высевом серийных разведений. Способность к образованию биопленок определяли экспрес-методом с использованием 96-луночных планшетов. **Результаты.** При бактериологическом исследовании установили, что *P. aeruginosa* выделяется из 34,21% (95% ДИ 32,50-35,92) образцов. При изучении отсроченного антагонизма между *P. aeruginosa* и *B. subtilis* и их совместного культивирования в жидкой питательной среде обнаружили, что *B. subtilis* обладают прямым умеренным антагонизмом по отношению к *P. aeruginosa*. После совместного культивирования культура бацилл давала обильный рост во всех опытах при всех повторениях, ограничивая рост *P. aeruginosa*. Среди выделенных изолятов *P. aeruginosa* установлена способность к биопленкообразованию в 76,92% (95% ДИ 73,02-80,77) случаев, среди образцов *B. subtilis* – в 100%. При совместном культивировании *B. subtilis* образовывали биопленку в присутствии *P. aeruginosa* в большинстве случаев. **Выводы.** Клинические изоляты *P. aeruginosa* умеренно чувствительны к действию *B. Subtilis in vitro*. Биопленкообразование клинических изолятов *P. Aeruginosa in vitro* может быть подавлено действием *B. subtilis*.

Ключевые слова: муковисцидоз, *P. aeruginosa*, мукоидный фенотип, биопленка, *B. subtilis*, антагонизм.