

Визначення здатності до утворення біоплівки представників мікробіоценоза бойових ран

Я.Ф. Кутасевич¹, С.К. Джораєва¹, Г.К. Кондакова¹, Е.М. Хорошун^{2,3}, Н.А. Ляпунов⁴, В.В. Гончаренко¹, І.О. Олійник¹, М.С. Бірюков², В.В. Купріяничук², С.А. Шипілов^{2,3}

¹ ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України»

² Військово-медичний клінічний центр Північного регіону Командування Медичних сил Збройних Сил України

³ Харківський національний медичний університет

⁴ ДНУ «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів» НАН України

Резюме. В статті наведені експериментальні дані щодо вивчення здатності до утворення біоплівок клінічних штамів бактерій, виділених з бойових ран. Надано пошукові результати щодо визначення МБК диоксидину по відношенню до клінічних штамів – представників різних таксономічних груп. Проведено визначення динаміки формування стійкості до диоксидину з застосуванням референс штамів *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Мета дослідження оцінка здатності до біоплівкоутворення домінуючих різновидів мікробіоценозу бойових ран та впливу диоксидину на рівень їх експресії

Матеріали та методи: Загалом було проведено визначення здатності до біоплівкоутворення 20 клінічних штамів збудників (*S. haemolyticus* – 8 зразків; *K. pneumoniae* – 4 зразки; *E. coli*, *P. aeruginosa* і *S. epidermidis* – по 2 зразки та *C. amalonaticus* і *S. aureus* – по одному) та 3 еталонних культур: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 та вплив на їх формування розчину диоксидину з визначенням МБК проти планктонних клітин цих штамів.

Результати дослідження: Встановлено, що як референтні, так і клінічні штами мікроорганізмів, характеризувались середньою та високою здатністю до утворення біоплівок. За результатами проведених досліджень показано, що препарат диоксидин проявляв антимікробну активність проти більшості планктонних клітин всіх використаних у роботі грамнегативних бактерій з МБК від 0,04 до 0,63 мг/мл. Найменший рівень активності препарату відзначений проти штамів стафілококів (МБК від 1,25 до >2,5 мг/мл), окрім крім планктонних клітин штаму *S. aureus* № 2093, (МБК 5 мг/мл). У ході дослідження проведено аналіз динаміки формування стійкості до диоксидину у мікроорганізмів різних таксономічних груп. Штам *S. aureus* ATCC25923 сформував стійкий до диоксидину (МБК \geq 10 мг/мл) варіант, у той час, як штами *P. aeruginosa* ATCC 27853 таких варіантів не сформував, що вказує на можливість використання диоксидину при тривалій терапії ранової інфекції.

Висновок. Отримані результати дослідження демонструють мікробіологічну ефективність диоксидину, що може бути застосований у комплексному лікуванні мікробних ускладнень ранових ушкоджень

Ключові слова: мікробіоценоз ран, біоплівки мікроорганізмів, диоксидин, антимікробна активність.

DOI: 10.33743/2308-1066-2023-3-13-17

Вступ

Найактуальніша проблема сучасної медицини – розвиток гнійно-запальних захворювань у пацієнтів, які перебувають на лікуванні у стаціонарах хірургічного профілю. У цій парадигмі гостро постає питання профілактики та лікування гнійних ускладнень, адже поранення, отримані під час бойових дій, апріорі є інфікованими. На жаль, незважаючи на вдосконалення системи профілактичних заходів, хірургічні інфекції посідають одне зі значущих місць у структурі інфекційно-запальної патології [1, 3, 8–10]. Серед грампозитивних бактерій, що домінують у мікробіоценозі ран, є *Staphylococcus spp* та *Enterococcus faecalis*, які належать до представників природних біотопів людини, але за певних умов вони здатні до транслокації та ендогенного інфікування. Інфекції сечовивідних шляхів, сепсис, ендокардит, інфекційно-запальні ураження м'яких тканин, зокрема

післяопераційних та опікових ран, інтраабдомінальні інфекції – далеко не весь перелік патологічних станів, які можуть бути зумовлені цими видами мікроорганізмів [3, 10]. За даними різних авторів, частота гнійно-запальних інфекцій, зумовлених золотистим стафілококом, варіює від 35,9% до 50,3% і 67,2%. Фекальний ентерокок – причина розвитку гнійної нозокоміальної інфекції в 14,8–19,0% у стаціонарах хірургічного профілю для дорослих [1, 8]. Особливе занепокоєння викликає стійкість нозокоміальних штамів стафілококів, ентерококів до більшості груп антибіотиків. Наприкінці 1990-х років важливого значення у розвитку складних форм госпітальної інфекції набувають метицилінрезистентні *S. aureus* (MRSA) та ванкоміцинорезистентні *E. faecalis* (VRE). Часто MRSA – збудники ангіогенного сепсису, ендокардиту після протезування клапанів, генералізованої ранової інфекції, а VRE – причина

розвитку уросепсису, ангіогенного сепсису, ендокардиту [3, 9, 15].

Не менше значення в розвитку гнійно-запальних інфекцій мають також грамнегативні мікроорганізми, такі як ентеробактерії, а також бактерії, що не ферментують глюкозу (НФГНБ). Серед представників першої групи необхідно відзначити *Escherichia coli* та *Klebsiella pneumoniae*, частота виділення яких в окремих стаціонарах коливається від 3,8% до 9,6% та від 0,5% до 16,4% відповідно. НФГНБ, як правило, представлені двома видами: *Pseudomonas aeruginosa* та *Acinetobacter baumannii*. Питома вага псевдомонад у більшості стаціонарів становить 1,65–7,60%, але цей показник суттєво збільшується при дослідженні бойових (15,00%) та опікових ран (12,82%) [3, 6, 9, 15]. *A. baumannii* (аналогічно до попередніх даних) виділяють з ран у 0,1–5,7% клінічних випадків, але ці бактерії частіше виявляють у хворих із бойовими пораненнями (53%) та у пацієнтів з опіковою хворобою (до 25%) [6, 9]. Більшість гнійно-запальних інфекцій, що викликані цими бактеріями, – результат активації ендогенної флори, а саме здатності *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* та *A. baumannii* залишати звичний для них біотоп кишківника й транслюкуватися в інші екологічні ніші [3, 15]. Здатність цих бактерій мігрувати, виживати в несприятливих умовах, обмінюватися генетичними локусами набуті антибіотикорезистентності призводить до поширення «агресивних» штамів, що спричиняє розвиток важких інфекцій. Такі штами, як правило, резистентні до кількох груп антибактеріальних препаратів, що істотно ускладнює терапію й вибір антибіотиків для емпіричної терапії [2, 6, 9]. За даними фахової літератури, найвищий рівень резистентності має *A. baumannii*, 75% ізолятів *P. aeruginosa* характеризуються резистентністю до основних класів антибактеріальних препаратів, а ентеробактерії набувають майже 100% резистентності до цефалоспоринів, фторхінолонів [3, 12].

Бактерії здатні адаптуватись до змін в живленні, наявності стресів, обумовлених зовнішніми умовами, присутності інгібуючих сполук, а також до імунного захисту. Одним з особливо важливих прикладів бактеріальної адаптації, опосередкованої систематизованою дією генів, є здатність розмножуватись в складі нерухомих полімікробних угруповань, відомих як біоплівки. Існування у вигляді біоплавок супроводжується значними змінами експресії генів та синтезу додаткових протеїнів, що проявляється резистентністю до антимікробних засобів та факторів імунного захисту. Таким чином, дослідження різних аспектів формування (або руйнування) бактерійних біоплівок є актуальним і перспективним напрямком, який дозволить оптимізувати підходи до діагностики і лікування цілого ряду інфекцій, в тому числі і гнійно-запальних ускладнень бойових ран мікробної етіології. Чисельні дослідження стверджують, що саме такі бактерії спричиняють важкі інфекційні ускладнення [11].

Мета дослідження: оцінка здатності до біоплівкоутворення домінуючих різновидів мікробіоценозу бойових ран та впливу диоксидину на рівень їх експресії.

Матеріали та методи

Здатність до утворення біоплівки визначали методом адгезії до полістиролу в плоскодонних пластикових планшетах. Добові бульйонні культури наносили по 0,15 мл в лунки планшета в 4 повторях з подальшою

інкубацією при 37 °С 18–20 годин. Потім рідку фазу видаляли, а осад прилиплих бактерій промивали фізіологічним розчином 3 рази і забарвлювали 1% спиртовим розчином крісталвіолета. Після інкубації протягом 45 хвилин барвник з лунок видаляли, промивали дистильованою водою 3 рази, додавали по 0,2 мл етанолу і інкубували при кімнатній температурі 45 хвилин для екстрагування барвника. Потім вимірювали оптичну густину (ОГ) на мікропланшетному рідері при 540 нм, порівнюючи показники OD540 зразків з таким негативним контролем. Відсутність біоплівки фіксували при OD зразку \leq OD контролю, слабку ступінь продукції біоплівки – при OD контролю $<$ OD зразка \leq 2 OD контролю, середній ступінь продукції біоплівки – при 2 OD контролю $<$ OD зразка \leq 4 OD контролю, високий рівень продукції біоплівки – при 4 OD контролю $<$ OD зразка, в відповідності до рекомендацій Rodrigues et al., 2010 [14]. Усі експерименти проводили у трьох повторях.

Дослідження виконані згідно з Гельсінською декларацією Всесвітньої медичної асоціації «Етичні принципи медичних досліджень за участю людини у якості об'єкта дослідження», яка була прийнята 18-ою Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (Гельсінкі, Фінляндія, червень 1964), з наступними переглядами.

Вплив диоксидину вивчали таким чином: при одночасному внесенні його у лунки з бульйонною культурою збудників, доведеною до концентрації 10^5 КУО/мл (дія на «молоді» біоплівки) та при додаванні на вже сформовані 24-годинні біоплівки («зрілі»). За порогову приймали дозу антибіотика, яка відповідає його МБК (МБК – мінімальна бактерицидна концентрація) по відношенню до планктонної культури. Для оцінки дії біоциду на біоплівкові культури збудників з кожної лунки проводили висів. Для цього біоплівки, що сформувались, руйнували механічним шляхом (мікробіологічною петлею), додавали 0,2 мл МПБ та переносили 0,1 мл отриманої суспензії в пробірку з 0,9 мл бульйону з 2% глюкози, інкубували 2 год при 35 °С, потім по 0,1 мл висівали на м'ясо-пептонний (МПА) агар. Посіви інкубували при 35 °С протягом 18–20 год. Далі оцінювали наявність росту культури та робили кількісну оцінку [4, 14].

Селекцію стійких варіантів мікроорганізмів здійснювали шляхом послідовних пересівань бактеріальної культури в нові порції поживного бульйону, який містить концентрації препарату, що ступінчасто підвищуються, починаючи з концентрації, удвічі меншою МБК [13]. Для цього готували серію дворазових розведень препарату в обсязі 4 мл поживного бульйону та вносили в кожну пробірку по 50 мкл бактеріальної культури та інкубували при температурі 37° С. Після 2–3 днів інкубації з пробірки з максимальною концентрацією препарату, в якій спостерігався бактеріальний ріст, відбирали порцію 50 мкл і пересівали в нову серію пробірок з більш високими концентраціями диоксидину. Процес селекції продовжували до моменту, коли припинялося збільшення значення МБК для цієї культури протягом п'яти пересівів. При значенні МБК \leq 10 мг/мл робили висновок про ефективність диоксидину проти цього штаму.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням пакету прикладних програм для Microsoft Excel 2003. Аналіз якісних даних проводили за допомогою критерію χ^2 . Вираховували середні

арифметичні значення для ряду даних (M) і похибки середніх величин (m). Вірогідність отриманих даних оцінювали шляхом парного порівняння та визначення довірчого інтервалу на підставі розрахунку коефіцієнта Стьюдента (t). Відмінності вважали вірогідними при $p \leq 0,05$ [7].

Результати досліджень

Загалом було проведено визначення здатності до біоплівкоутворення 20 клінічних штамів збудників (*S. haemolyticus* – 8 зразків; *K. pneumoniae* – 4 зразки; *E. coli*, *P. aeruginosa* і *S. epidermidis* – по 2 зразки та *C. amalonaticus* і *S. aureus* – по одному) та 3 еталонних культур Американської колекції типових культур (ATCC): *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

У таблиці 1, 2 представлені зведені дані щодо визначення ступеня адгезії до полістиролу клінічних та еталонних штамів мікроорганізмів.

Дані, наведені у таблиці 1 і 2 свідчать що, як референтні, так і клінічні штами мікроорганізмів, характеризувались здатністю до утворення біоплівок різного ступеню щільності. Штами з високою здатністю до біоплівкоутворення склали 55,0% (11 штамів), серед яких домінували *S. haemolyticus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* (половина від загальної кількості цих штамів) та *S. epidermidis*. Штами з середньою здатністю до утворення біоплівок склали 40,0% і були представлені як стафілококами, так і грамнегативними мікроорганізмами.

На наступному етапі дослідження проведено визначення мінімальної бактерицидної концентрації за оцінкою антибактеріальної активності препарату для планктонних клітин. Чутливість планктонних клітин мікроорганізмів до препарату визначали методом серійних розведень на агарі [4]: на поверхню живильного агару, що містить серійні розведення діоксидину (від 5 до 0,04 мг/мл) наносили 10 мкл бактеріальної суспензії тестованого штаму в концентрації

10⁷ КУО/мл і залишали до повного збирання мікрокаплі. Інкубували при температурі 37⁰ С протягом 72 год. За мінімальну бактерицидну концентрацію (МБК) приймали мінімальну концентрацію препарату в живильному середовищі, при якому не було зростання тест-культури. За результатами проведених досліджень встановлено, що препарат діоксидин проявляв антимікробну активність проти планктонних клітин всіх використаних у роботі грамнегативних бактерій з МБК від 0,04 до 0,63 мг/мл, окрім клітин штаму *P. aeruginosa* № 1853 (МБК = 5 мг/мл) (рисунок 1).

Варто особливо наголосити, що діоксидин проявляв активність проти штамів, що несуть генетичні детермінанти антибіотикорезистентності та мають фенотип множинної лікарської стійкості (MDR), наприклад, для штамів *K. pneumoniae* МБК діоксидина складала 0,31–0,63 мг/мл. Найменший рівень активності препарату відзначений проти штамів стафілококів (МБК від 1,25 до >2,5 мг/мл), окрім крім планктонних клітин штаму *S. aureus* МБК діоксидину для якого становила 5 мг/мл.

На наступному етапі дослідження було проведено визначення динаміки формування стійкості до діоксидину з застосуванням референтних штамів *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Отримані дані приведені на рисунку 2.

Штам *S. aureus* ATCC25923 в умовах селективного тиску ступінчастого підвищення концентрацій діоксидину сформував високий рівень стійкості до цього препарату (МБК=20 мг/мл) протягом 29 днів (7 пасажів). Цей рівень стійкості в два рази перевищив концентрацію діоксидину у препараті, а рівень МБК цього штаму вчетверо, порівняно з вихідним. Для штаму *P. aeruginosa* ATCC 27853 за 20 діб (6 пасажів) культивування в умовах селективного тиску діоксидину відбулося підвищення МБК діоксидину 8 разів – до значення 10 мг/мл. Показано, що препарат, що вивчається, виявляв більш високий рівень активності проти грамнегативних бактерій, ніж проти грампозитивних бактерій, що узгоджується з даними інших дослідників, які раніше повідомляли про нижчу активність діоксидину щодо деяких грампозитивних бактерій [5].

Безумовно, ці дослідження є недостатніми для формування остаточних висновків, у зв'язку з пошуківим напрямом досліджень, і потребують повторення експериментів на більшій кількості штамів, особливо внутрішньолікарняних, з генетично підтвердженими детермінантами антибіотикорезистентності.

Таблиця 1. Оцінка інтенсивності біоплівкоутворення тест-штамами мікроорганізмів

Штами мікроорганізмів	OD ₅₄₀	Ступінь утворення біоплівки
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,261	середня
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,383	висока
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,547	висока

Таблиця 2. Оцінка інтенсивності біоплівкоутворення клінічними штамми мікроорганізмів

Штами мікроорганізмів/кількість	Показник плівкоутворення (OD ₅₄₀)					
	низький		середній		високий	
	Кількість штамів	OD ₅₄₀	Кількість штамів	OD ₅₄₀	Кількість штамів	OD ₅₄₀
<i>E. coli</i> / 2			1	0,269	1	0,383
<i>K. pneumoniae</i> / 4			2	0,31±0,02	2	0,35±0,01
<i>P. aeruginosa</i> / 2			1	0,288	1	0,544
<i>C. amalonaticus</i> / 1			1	0,340		
<i>S. haemolyticus</i> / 8	1	0,179	3	0,31±0,01	4	0,41±0,04
<i>S. epidermidis</i> / 2					2	0,44±0,03
<i>S. aureus</i> / 1					1	0,369
Усього	1		8		11	

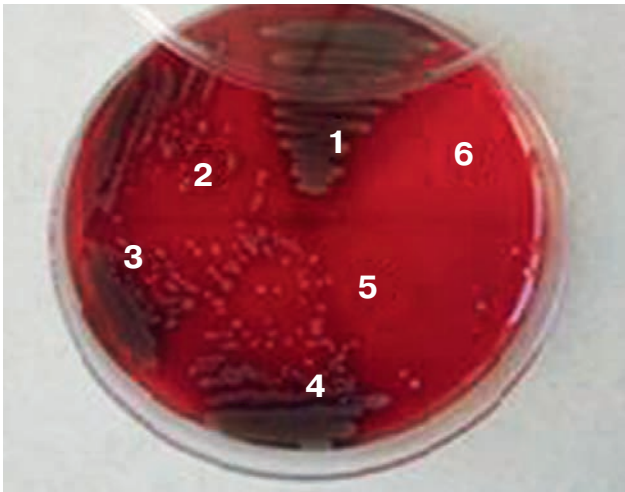


Рис. 1. Визначення МБК діоксидину для клінічного штаму *P. aeruginosa* № 1853. 1 – концентрація діоксидину – 0,15 мг/мл, 2 – концентрація діоксидину – 0,31 мг/мл, 3 – концентрація діоксидину – 0,63 мг/мл, 4 – концентрація діоксидину – 1,25 мг/мл, 5 – концентрація діоксидину – 2,5 мг/мл, 6 – концентрація діоксидину – 5 мг/мл

Висновки

1. Встановлено наявність високого ступеню здатності до біоплівкоутворення у 55% досліджених штамів з домінуванням *S. haemolyticus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*.

2. В результаті проведених досліджень показано, що препарат діоксидин проявляв антимікробну активність проти більшості планктонних клітин всіх використаних у роботі грамнегативних бактерій з МБК від 0,04 до 0,63 мг/мл. Найменший рівень активності препарату відзначений проти штамів стафілококів (МБК

Література

- Аналіз моніторингового дослідження антибіотикорезистентності збудників гнійно-запальних процесів м'яких тканин / А.П. Превар, А.В. Крижановська, В.О. Радіонов, В.М. Мруг. Вісник Вінницького національного медичного університету. 2018. Т. 22. № 2. С. 285–288.
- Бендас В.В., Стефак Я.П., Мойсюк В.Д. Таксономічний склад, популяційний рівень і мікроекологічні показники мікробіоти ранового вмісту вогнепальних поранень та міно-вибухових травм. Клініч. експеримент. патол. 2019. № 18(2). С. 13–18.
- Біологічні властивості основних збудників гнійно-запальних захворювань у хірургічних хворих Запорізької лікарні швидкої допомоги / Н.М. Поліщук, Д.Л. Кирик І.Є., Юрчук та ін. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2020. Т. 13. № 2(33). С. 271–277.
- Вплив антибіотиків на біоплівкоутворення MSSA та MRSA штамами стафілокока / С.А. Деркач, І.А. Воронкіна, С.Л. Габишева та ін. Інфекційні хвороби. 2017. № 4. С. 46–51.
- Изучение антимикробной активности мазей, содержащих диоксидин, на стандартных штаммах основных возбудителей раневой инфекции [Электронный ресурс] / Е.А. Штанюк, В.В. Минухин, Н.А. Ляпунов и др. *Universum: медицина и фармакология: электронный научный журнал*. 2014. № 5 (6). Раздел 43: Химиотерапия и антибиотики
- Кондратюк В.М. Мікробіологічна характеристика інфекційних ускладнень бойових поранень в різних збройних конфліктах. *Укр. журн. мед. біол. спорт.*, 2017. № 3 (7). С. 219–223.
- Лапач С.М., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. К.: МОПОН. 2001. 408 с
- Мікробіологічні аспекти ранової інфекції у потерпілих внаслідок бойових дій та її комплексне лікування з застосуванням вакуум-терапії / М.Д. Желба, А.В. Верба, Г.Л. Богущ та ін. *Сучасні медичні технології*. 2019. № 3. С. 50–55.
- Мікрофлора сучасної бойової рани та її чутливість до антибіотиків. Частина I / О.О. Фомін, Н.С. Фоміна, В.П. Ковальчук, С.А. Аслаян. *Укр. Мед. Часопис*. 2023. № 3 (155) – V/VI. С. 82–85
- Перетятко О.Г. Роль ентерококів у виникненні нозокоміальних інфекцій (огляд літератури). *Annals of Mechnikov Institute*. 2013. № 4. С. 22–27.
- Стимування антимікробної резистентності на підході «Єдине здоров'я»: Монографія. / А.Г. Салманов, Д.В. Щеглов, В.В. Артьоменко та ін. – К.: АграрМедІа груп. – 2022. – 380 с
- Achromobacter spp. Surgical site infections: a systematic review of case reports and case series / E. Ronin, C. Derancourt, A. Cabié et al. *Microorganisms*. 2021. № 9 (12). P. 2471
- Braoudaki M., Hilton A.C. Adaptive Resistance to Biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and Cross-Resistance to Antimicrobial Agents. *J. Clin. Microbiol.* 2004. № 42(1). P. 73–78.
- Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse / L.B. Rodrigues, Dos L.R. Santos, V.Z. Tagliari et al. *Braz. J. Microbiol.* 2010. № 41(4). P. 1082–1085.
- Web Appendix 4. Summary of a systematic review on screening for extended spectrum beta-lactamase and the impact on surgical antibiotic prophylaxis. *Global Guidelines for the Prevention of Surgical Site Infection*. World Health Organization, 2018.

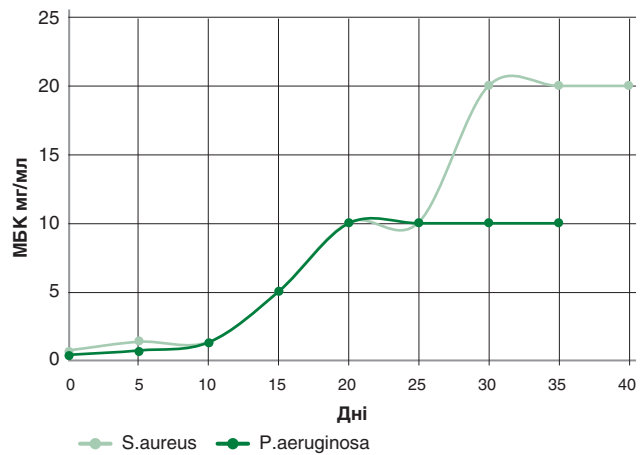


Рис. 2. Динаміка збільшення показника мінімальних бактерицидних концентрацій діоксидину для *P. aeruginosa* ATCC 27853 та *S. aureus* ATCC25923

від 1,25 до >2,5 мг/мл), окрім крім планктонних клітин штаму *S. aureus* № 2093 МБК діоксидину для якого становила 5 мг/мл.

3. Перевірка динаміки формування стійкості до діоксидину у референтних штамів мікроорганізмів продемонструвала виникнення варіантів, стійких до дії препарату, у штама *S. aureus* ATCC25923 (МБК ≥ 10 мг/мл), та відсутність аналогічних для *P. aeruginosa* ATCC 27853, що вказує на можливість використання діоксидину при тривалій терапії ранової інфекції.

Перспективи подальших досліджень – розробка методу комплексного лікування для певних фаз ранового процесу, що дозволяють одночасно впливати на декілька факторів патогенезу.

References

- Prevar AP., Kryzhanovskaya AV., Radionov VA., & Mrug VM. Analiz monitoringovoho doslidzhennia antybiotykorezystentnosti zbudnykiv hniino-zapalnykh protsesiv miakkykh tkany [Analysis of the monitoring study of the antibiotic-resistance of the agents of purulent-inflammatory processes of soft tissue]. *Visnyk Vinnytskoho natsionalnoho medychnoho universytetu* 2018; 22(2): 285–288.
- Bendas VV, Stefak YaP, Moysuk VD. Taksonomichnyy sklad, populyatshynnyy riven i mikroekologichni pokaznyky mikrobioty ranovogo vmystu vognepalnykh poranen ta minno-vyubuhovykh travm [Taxonomic composition, population level and microecological indicators of the microbiota of wound contents of gunshot wounds and mine-explosive injuries]. *Clin. Experiment. patol.* 2019; 18(2): 13–18.
- Polichshuk NM, Kyryk DL, Urchuk IE et al. Biologichni vlastyvyty osnovnykh zbudnykiv gniyno-zapalnykh zakhvoruvan u khirurgichnykh khvorykh Zaporizkoi likarni shvydkoi dopomogy [Biological properties of the main causative agents of purulent-inflammatory diseases in surgical patients of Zaporizhzhya Emergency Hospital]. *Aktualni putannya farmachevichnoi nauku tapraktiky*. 2020; 2(33): 271–277.
- Derkach SA., Voronkina I.A., Habyshva LS. et al Vplyv antybiotykiv na bioplivkoutvorenyya MSSA ni MRSA shtamamy stafilokoka [Effect of antibiotics on biofilm formation by MSSA and MRSA strains of staphylococcus]. *Infektsiyni tshvoroby*. 2017. (4): 46–51.
- Shtanuk EA., Minyrhin VV., Lyapunov NA. et al Izushenie antymikrobnoy aktivnosti mazey, soderzhashchirh dioksidin, na standartnykh shtammarh vuzbuditeley raneyoy infektsii [Study of the antimicrobial activity of ointments containing dioxidine on standard strains of the main causative agents of wound infection] *Universum: meditschina i farmakologiya*. 2014; 5 (6), razdel 43: Khimioterapiya i antibiotiki
- Kondratuk VM. Microbiologichna kharakterystyka infektsiynnykh usklznden boyovykh poranen v ryznykh zbroynnykh konfliktakh [Microbiological characteristics of infectious complications of combat wounds in various armed conflicts]. *Ukr. zhurn.med.sport.* 2017; 3(7): 219–223.
- Lapach SM, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispolzovaniem Excel [Statistical methods in medical and biological research using Excel]. K: Morion. 2001: 408 s.
- Zheliba MD, Verba AV, Bogusch GL et al. Microbiologichni aspekty ranovoy infektsii u poterpylykh vnaslidok boyovyry dy ta ii kompleksne likuvannya z zastosuvannym vacuum-terapii [Microbiological aspects of wound infection in combat victims and its complex treatment using vacuum therapy]. *Schasni medichni tekhnologii*. 2019; 3: 50–55.
- Fomin OO, Fomina NS, Kovalchuk VP & Aslanyan SA. Mikroflora suchasnoi boyovoy rany taii chutlivust do antybiotykiv. Chastyna I [Microflora of a modern combat wound and its sensitivity to antibiotics. Part I]. *Ukr.Med.Chasopus*. 2023; 3(155): 82–85.
- Peretyatko EG. Rol enterokokiv u vynykneni nozokomialnykh infektsii (ohliad literatury) [Role of enterococci in the occurrence of nosocomial infections]. *Annals of Mechnikov Institute*. 2013; 4: 22–27.
- Salmanov AG, Shcheglov DV, Artemenko VV. et al Strymuвання antymikrobnoy rezystentnosti na pidkhodach «edyne zdorovya: monografiya [Containment of antimicrobial resistance using «One Health» approaches: Monograph]. K: AhrarMediaGrup. 2022: 380 s.
- Ronin E, Derancourt C, Cabié A. et al Achromobacter spp. Surgical site infections: a systematic review of case reports and case series. *Microorganisms*. 2021; 9(12): 2471
- Braoudaki M, Hilton AC. Adaptive Resistance to Biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and Cross-Resistance to Antimicrobial Agents. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(1): 73–8.
- Rodrigues LB., Dos Santos LR., Tagliari VZ et al Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Braz. J. Microbiol.* 2010; 41(4): 1082–5.
- World Health Organization. Web Appendix 4. Summary of a systematic review on screening for extended spectrum beta-lactamase and the impact on surgical antibiotic prophylaxis. In *Global Guidelines for the Prevention of Surgical Site Infection*. 2018.

DETERMINATION OF BIOFILM FORMATION ABILITY OF REPRESENTATIVES OF MICROBIOCENOSE OF BATTLE WOUNDS

Kutasevych Ya. F.¹, Dzhoraieva S. K.¹, Kondakova G. K.¹, Khoroshun E. M.^{2,3}, Lyapunov N. A.⁴,
Goncharenko V. V.¹, Oliynuk I. O.¹, Birukov M. S.², Kupriyanchuk V. V.², Shipilov S. A.^{2,3}

¹ SE «Institute of Dermatology and Venereology of the NAMS of Ukraine»

² Military Medical Clinical Center of the Northern Region of the Command of the Medical Forces of the Armed Forces of Ukraine

³ Kharkiv National Medical University

⁴ State Scientific Institution «Institute for Single Crystals» of NAS of Ukraine:

Abstract. The article presents experimental data on the study of the ability to form biofilms of clinical strains of bacteria isolated from combat wounds. The search results regarding the determination of MBC dioxidin in relation to clinical strains – representatives of different taxonomic groups are provided. The dynamics of formation of resistance to dioxidin was determined using the reference strains *S. aureus* ATCC25923, *P. aeruginosa* ATCC27853.

The purpose evaluation of the ability to form biofilms of dominant representatives of the microbiocenosis of combat wounds and the effect of dioxidin on their expression level

Materials and methods. In general, the ability to form biofilms of 20 clinical strains of pathogens was determined (*S. haemolyticus* – 8 samples; *K. pneumoniae* – 4 samples; *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* – 2 samples each and *C. amalonaticus* and *S. aureus* – each one) and 3 reference cultures: *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC25923, *P. aeruginosa* ATCC27853 and the effect on their formation of dioxidin solution with determination of MBK against planktonic cells of these strains

Research results: It was established that both reference and clinical strains of microorganisms were characterized by medium and high ability to form biofilms. According to the results of the conducted studies, it was shown that the drug dioxidin showed antimicrobial activity against the majority of planktonic cells of all gram-negative bacteria used in the work, with an MBC from 0.04 to 0.63 mg/ml. The lowest level of activity of the drug was noted against strains of staphylococci (MBC from 1.25 to >2.5 mg/ml), except for planktonic cells of strain *S. aureus* № . 2093, for which the MBC of dioxidin was 5 mg/ml. In the course of the study, an analysis of the dynamics of the formation of resistance to dioxidin in microorganisms of different taxonomic groups was carried out. *S. aureus* ATCC25923 strain formed a variant resistant to dioxidin (MBK ≥ 10 mg/ml), while *P. aeruginosa* ATCC27853 strains did not form such variants, which indicates the possibility of using dioxidin in the long-term therapy of wound infection.

Conclusion. The obtained research results demonstrate the microbiological effectiveness of dioxidin, which can be used in the complex treatment of microbial complications of wound injuries

Key words: microbiocenosis of wounds, biofilms of microorganisms, dioxidin, antimicrobial activity.

Відомості про авторів:

Кутасевич Яніна Францівна – доктор мед. наук, професор, директор ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України», м. Харків

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8706-1487>

Джораєва Світлана Кар'ягдівна – доктор мед. наук., старший дослідник, завідувачка лабораторно-експериментального відділу ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України», м. Харків, E-mail: dzhoraevassvetlana@gmail.com.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2486-5474>

Кондакова Ганна Костянтинівна – кандидат біологічних наук, заступник директора з наукової роботи ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України», м. Харків

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7739-1922>

Хоросун Едуард Миколайович – кандидат медичних наук, Герой України, начальник Військово-медичного клінічного центру Північного регіону Командування Медичних сил Збройних Сил України, Герой України, доцент кафедри хірургії № 4 Харківського національного медичного університету,

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1258-1319>

Ляпунов Микола Олександрович – доктор фармацевтичних наук, професор, завідувач лабораторії технології та аналізу лікарських засобів ДНУ «Науково-технологічний комплекс «Інститут монокристалів НАН України», м. Харків

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5036-8255>

Гончаренко Валентина Василівна – кандидат мед. наук, науковий співробітник лабораторії мікробіології, імунології та молекулярної генетики ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України», м. Харків,

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8168-0818>

Олійник Ірина Олександрівна – доктор медичних наук, старший науковий співробітник, головний науковий співробітник відділу дерматології, інфекційних та паразитарних захворювань шкіри ДУ «Інститут дерматології та венерології НАМН України». м. Харків

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6408-830X>

Бірюков Михайло Сергійович – начальник медичної лабораторії (вірусологічної, молекулярно-генетичних досліджень) клініки лабораторної діагностики Військово-медичного клінічного центру Північного регіону, м. Харків

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0008-6525-0883>

Купріячук Володимир Володимирович – начальник відділення гнійної хірургії хірургічної клініки Військово-медичного клінічного центру Північного регіону, м. Харків

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0003-7478-4813>

Шипілов Сергій Анатолійович – кандидат медичних наук, провідний хірург Військово-медичного клінічного центру Північного регіону Командування Медичних сил Збройних Сил України, асистент кафедри хірургії № 4 Харківського національного медичного університету, м. Харків

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1689-2213>