

METODA PRO HODNOCENÍ ÚČINKU PŘÍPRAVKŮ S OBSAHEM BAKTERIOFÁGOVÉHO STAFYLOKOKOVÉHO LYZÁTU NA RŮST BAKTERIÍ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* POMOCÍ DETEKCE ZMĚNY VODIVOSTI

Nejeschlebová H., Říha J.

Bentley Czech s.r.o.

The conductivity changes detection method for evaluation of the effect of preparations contains staphylococcal phage lysate on the growth of *Staphylococcus aureus*

Abstrakt

Cílem práce je prezentovat metodický postup ke stanovení účinku přípravků s obsahem stafylokokového fágového lyzátu, případně dalších tekutých přípravků, na růst bakterií *Staphylococcus aureus* na základě detekce změn vodivosti. Přípravky testované v rámci tohoto experimentu by měly být určeny k omezení šíření *Staphylococcus aureus* (včetně multirezistentních kmenů) v chovech hospodářských zvířat a k léčbě mastitidních stafylokokových infekcí dojníc. Metodický postup prezentovaný v tomto článku představuje rychlou metodu pro ověření účinnosti různých šarží preparátů s možností podrobného hodnocení jejich účinnosti in-vitro.

V rámci experimentu byly testovány přípravky s označením G1 a S1/G2 s 15% obsahem bakteriofágového stafylokokového lyzátu, u kterých byla prokázána inhibice růstu kontrolního kmene *Staphylococcus aureus*. Užití báze receptury pro oba přípravky (agar a hydroxyethylcelulosa) neinhibují aktivitu fágového lyzátu, a tudíž se jeví jako vhodné pro výrobu fágových přípravků.

Polypropylén, jako materiál použitý pro uskladnění přípravků, inhibuje podle výsledků experimentu aktivitu fágového lyzátu, a nelze ho proto doporučit pro skladování přípravků s obsahem fágového lyzátu. Vhodnějším materiálem pro tyto účely je sklo.

Na základě provedeného testování je možné vytvořenou metodiku doporučit pro rychlou detekci účinnosti přípravků s předpokládanou antimikrobiální aktivitou.

Klíčová slova: vodivost, *Staphylococcus aureus*, fágový lyzát

Abstract

The aim of this paper is to evaluate an efficacy of two products containing staphylococcal phage lysate on

Staphylococcus aureus growth by detection of conductivity changes. These two preparations should be used for reduction in spread of *Staphylococcus aureus* (multidrug resistant strains including) in livestock and as a tool for treatment of staphylococcal mastitis infections. The method presented in this paper represents rapid microbiological method for fast and detailed detection of antimicrobial activity and function of different batches of preparations during their in-vitro testing.

The preparations marked "G1" a "S1/G2" with 15% phage lysate content have been tested in this experiment and they induce growth inhibition of *Staphylococcus aureus* control strain. The base formulas used for both of preparations, agar and hydroxyethylcellulose, do not show inhibition of phage lysate activity and appear to be suitable for usage in products containing phage lysate.

Polypropylene, as a material used for preparations storage, shows inhibition effect of phage lysate. It can not be recommended for storage of products containing phage lysate. Glass appears to be more suitable for these purposes.

On the base of presented testing method, it can be recommended for rapid efficacy evaluation of products with assumed antimicrobial activity.

Key words: conductivity, *Staphylococcus aureus*, phage lysate

Úvod

Staphylococcus aureus (dále *S. aureus*) patří k závažným patogenům humánní a animální populace. Je komenzálem teplokrevných živočichů a člověka, přirozeně osidluje jejich sliznice, kůži a kožní žlázy, běžně se však vyskytuje i ve vnějším prostředí (1). Při oslabení imunitního systému hostitele je schopen vyvolat široké spektrum onemocnění od běžných zánětů kůže a sliznic až po život ohrožující septické stavy (2). V oblasti animální populace se *S. aureus* řadí k významným patogenům vyvolávajícím zánět mléčné žlázy (tzv. mastitidu) skotu, ovcí a koz, přičemž mastitidy jsou považovány za jedno z nejčastějších produkčních onemocnění dojníc a také za nejčastější příčinu ekonomických ztrát chovatelů (3). *S. aureus* je také považován za významného kontaminanta potravinových surovin (zejména mléka a masa) a vyvolavatele stafylokokových enterotoxikóz (4). Vůči vlivům zevního prostředí vykazují bakterie *S. aureus* značnou odolnost, což vede k jejich přežívání ve vnějším prostředí a snadnému šíření. Mastitidy vyvolané *S. aureus* nabývají na významu také v důsledku vzrůstající rezistence kmenů k antibiotické léčbě (5). Závažný problém představují v současnosti zejména intenzivní chovy prasat, skotu a drůbeže jako zdroj specifického typu meticilin rezistentního *S. aureus* CC398, jehož přenos je možný i na člověka (6, 7).

Zvyšující se nárůst výskytu multirezistentních kmenů bakterií vyvolává potřebu nových alternativních metod léčby bakteriálních infekcí a právě takovou metodou by se mohla stát fágová terapie. Výhodou aplikace fágů oproti antibiotikům je nízká pravděpodobnost vzniku rezistence a vysoká specifita k cílovému kmeni hostitele. Fágová te-

rapie může být rychlá, efektivní a zároveň levná metoda při léčbě a profylaxi různých bakteriálních onemocnění (8, 9).

Jednou z možností, jak hodnotit účinnost fágového preparátu, je metoda impedanční mikrobiologie (10). Tato metoda využívá skutečnosti, že mikroorganismy jsou schopny přeměňovat živné médium na vodivé elementy, např. emisí produktů svého metabolismu, čímž dochází ke změně impedance, resp. vodivosti média (10, 11). Tyto změny jsou v pravidelných intervalech zaznamenávány měřicím systémem a slouží mj. k určení tzv. času detekce TTD (Time To Detection). Jedná se o bod, kdy byla poprvé zaznamenána odchylka růstové křivky. Platí, že čím vyšší je počáteční hustota bakterií v inokulu, tím je čas detekce kratší. Na základě získané růstové křivky a dosažení času detekce je pak možné hodnotit schopnost růstu bakterií v médiu bez přidavku a s přidavkem posuzovaného preparátu (12).

Metodu pro hodnocení bakteriálního růstu pomocí změny vodivosti lze využít mj.:

- k detekci TTD - resp. času, kdy dochází k exponenciální fázi růstu v médiu; z TTD odvozené kalibrační rovnice pak lze výsledky využít pro hodnocení CFU;
- k analýze růstových křivek, které reflektují stav bakteriální populace v průběhu měření a jejich diskuzi;
- k detekci různých typů bakterií v tekutých médiích a pro různé aplikace (11, 13, 14).

Cílem práce je prezentovat a ověřit metodický přístup s využitím měření změn vodivosti média pro stanovení účinku dvou přípravků s obsahem stafylokokového fágového lyzátu na růst bakterií *Staphylococcus aureus*. Testované přípravky by v budoucnosti měly být určeny k omezení šíření *Staphylococcus aureus* (včetně multirezistentních kmenů) v chovech hospodářských zvířat a k léčbě mastitidních stafylokokových infekcí dojníc.

Metodika

Instrumentace a materiál

- Analyzátor RABIT2 (Don Whitley Scientific Inc.)
- Denzitometr DEN-1 (Biosan)
- Autoklávatelné impedanční zkumavky RABIT (Don Whitley Scientific Inc.)
- Kultivační média
 - Mozkosrdcová infuse (Carl Roth GmbH & Co. Kg)
 - Krevní agar (LABMediaServis)
- Želatinové disky s čistou kulturou *S. aureus* CCM 3953 (Česká sbírka mikroorganismů, MU, Brno)
- Stafylokokový fágový lyzát ($7,5 \times 10^9$ PFU) (ÚEM, MU, Brno)
 - Byl použit fágový kmen odvozený z bakteriofága 812, který je podrobně genomicky (15), proteomicky (16) a strukturně (17) charakterizován.
- Dále běžné vybavení mikrobiologické laboratoře
- Přípravek G1 obsahuje agar jako básovou recepturu.
- Přípravek S1/G2 obsahuje hydroxyethylcelulosu jako básovou recepturu.

Testované přípravky obsahují 15 % fágového lyzátu, testování proběhlo 72 hod od jejich přípravy.

Pracovní postup

1) Příprava suspenze *S. aureus*

Denzita 1. stupně McFarlandovy zákalové stupnice, 24hodinová kultura *S. aureus* vyrostlá na krevním agaru, ředící médium: mozkosrdcová infuse.

2) Inokulace

Do každé impedanční zkumavky bylo napipetováno 5 ml bujónu (mozkosrdcová infuse). Další komponenty (inokulum, voda, fágový lyzát, zkoušené přípravky) byly pipetovány dle schématu inokulace zkumavek (viz níže).

Schéma inokulace zkumavek

- A1 1. zkumavka: *negativní kontrola*: 5 ml BHI
- A2 2. zkumavka: *pozitivní kontrola SA*: 5 ml BHI + 1 ml inokula + 2 ml vody
- A4 4. zkumavka: *kontrola lyzátu*: 5 BHI + 1 ml inokula + 2 ml ředěného lyzátu (1 lyzát : 1 voda)
- A5 5. zkumavka: *kontrola lyzátu*: 5 BHI + 1 ml inokula + 2 ml ředěného lyzátu (2 lyzát : 3 voda)
- A6 6. zkumavka: *kontrola báze*: 5 ml BHI + 1 ml inokula + 2 ml báze G1
- A7 7. zkumavka: *kontrola báze*: 5 ml BHI + 1 ml inokula + 2 ml báze S1/G2
- A8 8. zkumavka: *test přípravku G1*: 5 ml BHI + 1 ml inokula + 2 ml G1
- B2 10. zkumavka: *test přípravku S1/G2 plast*: 5 ml BHI + 1 ml inokula + 2 ml S1/G2 plast
- B6 14. zkumavka: *test přípravku S1/G2*: 5 ml BHI + 1 ml inokula + 2 ml S1/G2

Vysvětlivky:

báze - základní komponenta přípravku bez stafylokokového fágového lyzátu
 BHI - mozkosrdcová infuse
 SA - *Staphylococcus aureus*
 S1/G2 plast - přípravek skladovaný v polypropylenovém (PP) kelímku

3) Nastavení parametrů měření (vytvoření test code)

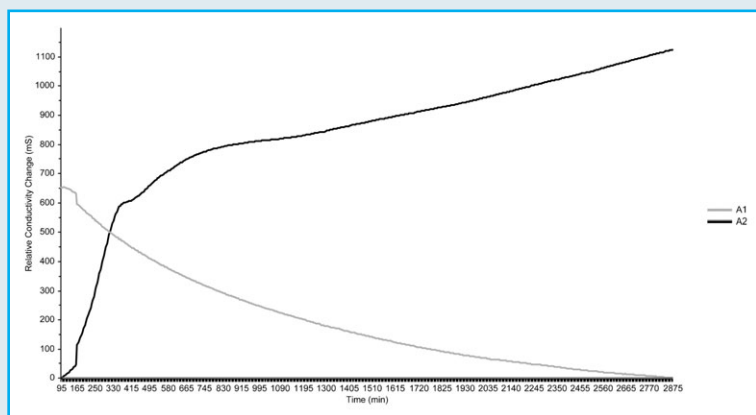
- Doba trvání testu: 48 hodin
- Inkubační teplota: 37 °C
- Interval zaznamenávání změn impedance: 5 minut

4) Vložení zkumavek do modulu přístroje RABIT

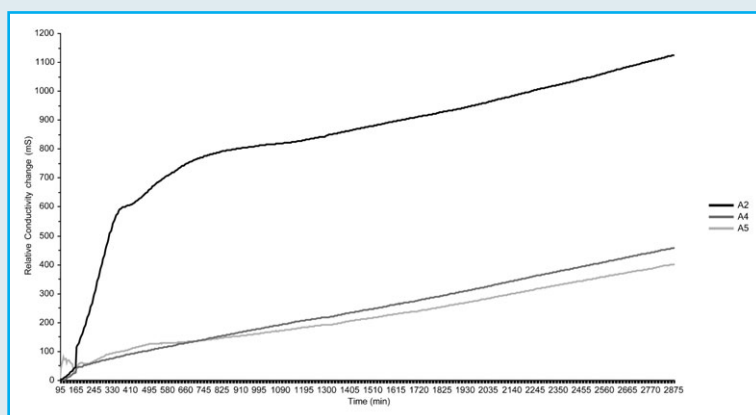
5) Měření

6) Vyhodnocení výsledků

Na základě průběhu růstových křivek hodnotíme schopnost růstu bakterií *S. aureus* v médiu bez přidavku a s přidavkem přípravku obsahujícího stafylokokový fágový lyzát. Růstové křivky zobrazují vodivost média a její změny v časovém intervalu 5 minut, vodivost je zaznamenávána v mS (milisiemens). Díky různé počáteční vodivosti jednotlivých vzorků, byla data pro zobrazení růstových křivek po stabilizaci experimentu (95 minut)



Obr. 1 Růstové křivky pro pozitivní (vzorek A2) a negativní (vzorek A1) kontrolu



Obr. 2 Růstové křivky vzorků pro testování účinnosti lyzátu (vzorek A4, A5) a pozitivní kontrola (vzorek A2)

matematicky srovnána na jednotnou úroveň (baseline; Unscrambler X 10.3, Transform, Baseline Offset).

Výsledky a diskuze

Základní přehled o účinnosti fágových přípravků bylo možné získat již po několika hodinách od započetí testování. V našem případě byla doba trvání testu zvolena na 48 hodin z důvodu získání co největší části růstové křivky a detailního přehledu o jejím průběhu.

Kontrolní vzorky, účinnost fágového lyzátu

Použitelnost metody a použitého postupu ilustrují růstové křivky pro pozitivní a negativní kontrolu (vzorky A2, resp. A1) na obrázku 1 (povolné klesání vodivosti média pro negativní kontrolu; křivka kopírující růst bakteriální populace ve vzorku s pozitivní kontrolou).

V rámci experimentu byla provedena kontrola účinnosti použitého fágového lyzátu v různém ředění (vzorky označené A4 a A5). Z růstových křivek (Obrázek 2) je patrný inhibiční účinek na nárůst bakteriální populace v obou použitých ředěních.

Na základě porovnání růstových křivek pozitivní kontroly *S. aureus* (vzorek A2) a růstových křivek *S. aureus* v prostředí testovaných bází

(vzorek A6, A7) nevykazují tyto báze inhibiční růstu kontrolního kmene *S. aureus* (Obrázek 3). Inhibiční efekt v pokusech s přípravky s obsahem fágového lyzátu (Obrázek 2) tak může být připisován výhradně obsaženému fágovému lyzátu.

Testování přípravků s adicí fágového lyzátu

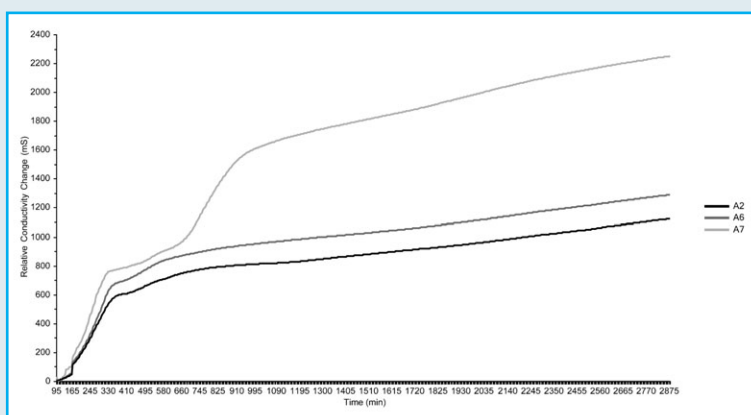
Z porovnání růstových křivek pozitivní kontroly *S. aureus* (vzorek A2) a růstových křivek *S. aureus* v přípravcích s fágovým lyzátem (vzorek A8, B6) vyplývá, že přípravky označené jako G1 a S1/G2 inhibují růst kontrolního kmene *S. aureus* (Obrázek 4). Průběh růstové křivky *S. aureus* v přípravku S1/G2 (vzorek B6) je srovnatelný s průběhem růstové křivky *S. aureus* v přítomnosti lyzátu ředěného vodou v poměru 1:1 (vzorek A4) (Obrázek 2). Z uvedeného vyplývá, že použité báze receptury neinhibují účinnost fágového lyzátu, a tudíž se jeví jako vhodné pro výrobu fágových přípravků.

Testování vlivu obalového materiálu (PP kelímek, vzorek B2)

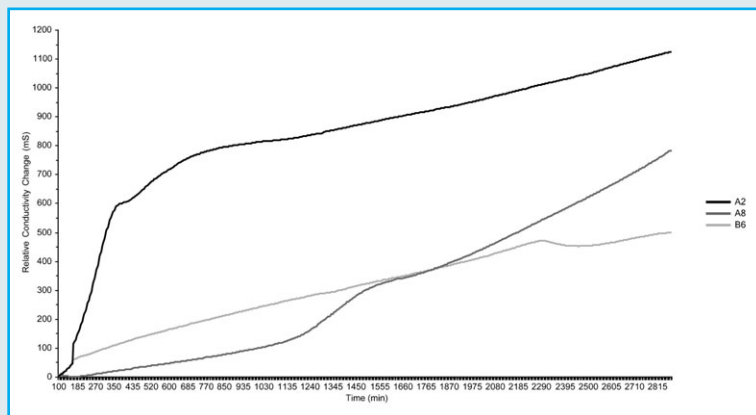
Část přípravku S1/G2 byla uchovávána v PP kelímku (vzorek S1/G2 plast). Bylo zjištěno, že průběh růstové křivky *S. aureus* v přípravku S1/G2 plast (vzorek B2) se shoduje s průběhem růstové křivky pozitivní kontroly *S. aureus* (vzorek A2) (Obrázek 5). Z výsledků pak můžeme usuzovat, že polypropylen pravděpodobně inhibuje aktivitu fágového lyzátu a není tudíž vhodným materiálem pro skladování přípravku s obsahem fágového lyzátu. V ostatních případech byly přípravky G1 a S1/G2 uchovávány ve skleněných nádobách.

Závěr

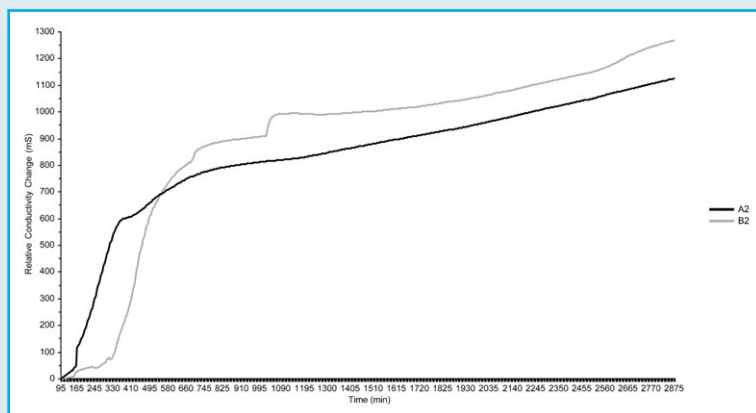
Použité báze receptury (agar a hydroxyethylcelulosa) neinhibují účinnost fágového lyzátu, a jeví se tudíž jako vhodné pro výrobu fágových přípravků. Přípravky G1 a S1/G2 vykazují inhibiční růstu kontrolního kmene *S. aureus*, naopak samotné báze růst *S. aureus* neinhibují.



Obr. 3 Růstové křivky vzorků pro testování báze přípravků bez adice fágového lyzátu (vzorek A6, A7) a pozitivní kontrola (vzorek A2)



Obr. 4 Růstové křivky vzorků obsahujících fágový lyzát (vzorek A8, B6) a pozitivní kontrola (vzorek A2)



Obr. 5 Růstové křivky pro přípravek uskladněný v polypropylenovém obalu (vzorek B2) a pozitivní kontrolu (vzorek A2)

Výsledný inhibiční efekt v pokusech s přípravky G1 a S1/G2 tak může být připisován výhradně účinku obsaženého fágového lyzátu.

Polypropylén inhibuje aktivitu fágového lyzátu, a nelze ho proto doporučit pro skladování přípravku s obsahem fágového lyzátu. Za vhodnější materiál k uchování uvedených přípravků je možné považovat sklo.

Vytvořenou metodiku lze využít pro rychlou detekci účinnosti přípravků s antimikrobiální aktivitou, neboť základní přehled o účinnosti fágových přípravků je možné získat již po několika hodinách od započetí testování.

Literatura

- 1) Mathema B., Mediavilla J. R., Liang C., Kreiswirth N. B. Evolution and Taxonomy of Staphylococci. 2009. In CROSSLEY, K. B. a kol. Staphylococci in human disease. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell. ISBN 9781405163323. p. 31-64.
- 2) Lowy F. D. 1998. *Staphylococcus aureus* Infections. New England Journal of Medicine [online] 339, 520-532 [cit. 2015-09-01]. DOI: 10.1056/NEJM199808203390806. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199808203390806>
- 3) Hofírek B., Smola, J., Čížek A., Haas, D. Záněty mléčné žlázy podle původců. In Hofírek, B. a kol. 2009. *Nemoci skotu*. Brno: Noviko, s. 648-661. ISBN 978-80-86542-19-5.
- 4) Dinges M. M., Orwin, P. M., Schlievert P. M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews* 13, 16-34.

- 5) Shi D., Hao Y., Zhang A., Wulan B., Fan X. 2010. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in China. *Transboundary and emerging diseases* [online] 57, 221-224. [cit. 2015-12-27]. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2010.01139.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1865-1682.2010.01139.x>
- 6) Kwon N. H., Park K. T., Moon J. S., Jung W. K., Kim S. H. 2005. Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization and molecular analysis for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and novel SCC*mec* subtype Ivg isolated from bovine milk in Korea. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapeutics* 56, 624-632.
- 7) Van Cleef B. A., Verkade E. J., Wulf M. W., Buiting A. G., Voss A., Huijsdens X. W. & kol. 2010. Prevalence of livestock-associated MRSA in communities with high pig-densities in The Netherlands. *PLoS One* [online]. 5:e9385 [cit. 2016-01-01]. DOI: 10.1371/journal.pone.0009385. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0009385>
- 8) Hyman P. & Abedon S. T. 2010. Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Advances in Applied Microbiology* 70, 217-248.
- 9) Gupta R. & Prasad Y. 2011. Efficacy of polyvalent bacteriophage p-27/HP to control multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* associated with human infections. *Current Microbiology* 62, 255-260. DOI: 10.1007/s00284-010-9699-x.
- 10) Whitley Technical Note: RA02. Basic theory of Electrical Conductivity in Solutions. 2014. Don Whitley Scientific Ltd., UK.
- 11) Whitley Technical Note: RA30. Molecular Approaches - Another Tool for the Food Microbiologist. 2014. Don Whitley Scientific Ltd., UK.
- 12) Don Whitley Scientific Ltd. 1999. Introduction to principles of impedance. Don Whitley Scientific Ltd.
- 13) Asperger H. & Pless P. 1994. *Salmonella* detection in cheese - comparison of methods in regard to the competitive micro-organisms. *Wiener Tierärztliche Monatschrift* 81, 12-17.
- 14) Cousins D. L. & Marlatt F. 1990. An evaluation of a conductance method for the enumeration of *Enterobacteriaceae* in milk. *Journal of Food Protection* 53, 568-570.
- 15) Pantůček R., Rosypalová A., Doškař J., Kailarová J., Růžičková V., Borecká P., Snopková S., Horváth R., Götz F., Rosypal S. 1998. The polyvalent staphylococcal phage phi 812: its host-range mutants and related phages. *Virology* 246, 241-252.
- 16) Eyer L., Pantůček R., Zdráhal Z., Konečná H., Kašpárek P., Růžičková V., Herychová L., Preisler J., Doškař J. 2007. Structural protein analysis of the polyvalent staphylococcal bacteriophage 812. *Proteomics* 7, 64-72.
- 17) Nováček J., Šiborová M., Benešik M., Pantůček R., Doškař J., Plevka P. 2016. Structure and genome release of Twort-like *Myoviridae* phage with a double-layered baseplate. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 9351-9356.

Publikace byla vytvořena za podpory projektů MZe, NAZV KUS č. QJ1510047 a QJ1510216.

Korespondující autor:

Mgr. Jan Riha, Ph.D., Bentley Instruments Inc.,
tel. 776 136 995, mail: jriha@bentleyinstruments.com

Přijato do tisku: 15. 1. 2018

Lektorováno: 29. 1. 2018