

Порівняльне визначення чутливості мультирезистентних клінічних штамів бактерій групи ESKAPE до продуктів біодеградації сплавів MZZ-P та MZZ-MB

Мовчан О.С.¹, Котелюх Б.А.¹✉, Кирик Д.Л.¹

Резюме. Актуальність. Антибіотикорезистентність мікроорганізмів групи ESKAPE є однією з провідних загроз сучасної медицини, особливо в контексті імплант-асоційованих інфекцій в ортопедії та травматології. Пошук нових біоматеріалів із власними антибактеріальними властивостями є перспективним напрямком профілактики ускладнень. **Мета дослідження.** Провести порівняльну оцінку антибактеріальної дії продуктів біодеградації сплавів MZZ-P та MZZ-MB щодо мультирезистентних клінічних штамів бактерій групи ESKAPE. **Матеріали та методи.** Дослідження виконано на мультирезистентних штаммах *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecalis* (VRE), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Acinetobacter baumannii*. Чутливість до антибіотиків визначали за стандартами EUCAST (диско-дифузійний метод, метод серійних розведень). Антимікробну активність продуктів біодеградації сплавів оцінювали за бактеріостатичним і бактерицидним ефектами протягом 72 год інкубації з подальшим висівом на агар Мюллера – Хінтона. Статистичний аналіз проводили з використанням критерію Вілкоксона. **Результати.** Встановлено виражену антибактеріальну активність продуктів біодеградації обох сплавів щодо всіх досліджених штамів. Відмічено поступове зниження кількості колоній мікроорганізмів у процесі інкубації, що свідчить про бактерицидну дію. Сплав MZZ-MB продемонстрував статистично значущо вищу ефективність порівняно з MZZ-P ($p < 0,05$), особливо щодо грамнегативних неферментуючих бактерій. **Висновки.** Продукти біодеградації сплавів MZZ-P та MZZ-MB мають виражені бактерицидні властивості щодо мультирезистентних збудників групи ESKAPE. Отримані результати обґрунтовують перспективність їх використання як біодеградуючих імплантів для профілактики імплант-асоційованих інфекцій.

Ключові слова: ESKAPE-патогени; мультирезистентні бактерії; продукти біодеградації; магнієві сплави; антибактеріальна активність; імплант-асоційовані інфекції; остеомієліт.

Вступ

Згідно з даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), швидке зростання стійкості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів загрожує підірвати основи охорони здоров'я, закладені протягом останніх 50 років. Як наслідок, ВООЗ визначила антибіотикорезистентність однією з головних загроз людству. Недостатня обізнаність клініцистів щодо правил раціональної антибіотикотерапії призводить до невиправданих призначень антибактеріальних препаратів [1]. У різних країнах, регіонах і навіть лікувальних за-

кладах чутливість мікроорганізмів до антибіотиків значно варіює, проте існує уявлення про групу проблемних мікроорганізмів – ESKAPE: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, дослідженню яких приділяється значно більше уваги. Інфекція, що проявляється на ранніх стадіях після остеосинтезу, переважно спричинена високовірулентними мультирезистентними збудниками цієї групи: *Staphylococcus aureus* (резистентний до метициліну – MRSA), *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* та *Pseudomonas aeruginosa*, яким властиве формування стійкості до карбапенемів і багатошарових біоплівки з низькою проникністю матриксу [2, 3, 4].

Захворювання і травми опорно-рухової системи посідають друге місце серед причин травматизму і

✉ Котелюх Б.А., xcisman257@gmail.com

¹ Національний університет охорони здоров'я України ім. П. Л. Шупика, Київ, Україна

третє місце серед хвороб, що призводять до інвалідності дорослого населення. Ортопедичні імпланти займають особливе місце як у клінічній практиці, так і в біомедичній промисловості. Найбільшу зацікавленість викликають імпланти, що здатні біодеградувати в разі їх імплантації в організм людини. Концепція імплантів, що біодеградують, з'явилася завдяки становленню й розвитку застосування шовних матеріалів, що розсмоктуються в організмі. Важливим аспектом під час проведення хірургічних втручань із використанням імплантів є попередження виникнення гнійно-запальних інфекційних ускладнень, які часто пов'язані з неефективною антибактеріальною терапією [5]. Значна частота виникнення незадовільних результатів антибактеріальної терапії в ортопедо-травматологічній практиці потребує пошуку принципово нових матеріалів, продукти біодеградації яких забезпечують профілактику та ефективне лікування імплант-асоційованих остеомієлітів.

Бактеріальна інфекція під час регенерації кісткової тканини є серйозною проблемою, оскільки призводить до інфікування тканини з подальшим пошкодженням імпланту. Лікування антибіотиками – одне з рішень, яке дає змогу розв'язати цю проблему, але постає нова проблема – підвищена стійкість бактерій, що пов'язана з нераціональним використанням антибіотиків. Досить часто це закінчується розвитком остеомієлітів – від 3,0 до 24,0 % після відкритих переломів та до 8,0 % після оперативного лікування закритих переломів із застосуванням імплантів [6]. Імплант-асоційовані інфекції спричинені мікроорганізмами, що розташовані на поверхні імплантату і призводять до уповільненої бактеріємії. Патогенна мікрофлора може змінюватися залежно від розташування імпланта та стану імунної системи пацієнта. Бактерії колонізують його поверхню у вигляді біоплівки, що значно підвищує їх стійкість до антибіотиків і дезінфікуючих засобів, інгібуючи вроджений та адаптивний імунний захист людського організму [7].

Формування і поширення резистентності до карбапенемів у грамнегативних бактерій є однією з найактуальніших проблем сучасної антимікробної хіміотерапії. Карбапенеми зазвичай розглядаються як найефективніші антимікробні препарати для лікування тяжких нозокоміальних і позалікарняних інфекцій полімікробної етіології. Проте набута стійкість до препаратів цієї групи останнім часом зустрічається все частіше, особливо серед збудників нозокоміальних інфекцій, включно з імплант-асоційованими. Провідними серед таких збудників є карбапенемрезистентні

K. pneumoniae та грамнегативні неферментуючі бактерії – *Acinetobacter baumannii* та *Pseudomonas aeruginosa*, а також метицилінрезистентний *Staphylococcus aureus* (MRSA) і ванкомицинрезистентний *Enterococcus faecalis* (VRE) [8, 9, 10].

Мета дослідження. Провести порівняльну оцінку антибактеріальної дії продуктів біодеградації металевих сплавів MZZ-P та MZZ-MB щодо мультирезистентних клінічних штамів нозокоміальних збудників групи ESCAPE з метою мікробіологічного обґрунтування можливості їх використання в ортопедо-травматологічній практиці.

Матеріали і методи

Вивчення антимікробної активності сплавів проводили на базі мікробіологічної лабораторії кафедри мікробіології, вірусології та імунології Національного університету охорони здоров'я України ім. П. Л. Шупика. У роботі використовували мультирезистентні штами мікроорганізмів, що були виділені від хворих з інфекцією, обумовленою наданням хірургічної допомоги: метицилінрезистентний *Staphylococcus aureus* (MRSA), ванкомицинрезистентний *Enterococcus faecalis* (VRE), карбопенемрезистентні *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* та *Klebsiella pneumoniae*.

Вивчення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів проводили згідно з вимогами Європейського комітету з визначення чутливості до антимікробних препаратів (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control as recommended by EUCAST, версія 15.0 (2025); <http://www.eucast.org>) [11, 12]. Дослідження проводили диско-дифузійним методом згідно з положеннями EUCAST з використанням агару Мюллера – Хінтона (MXA) виробництва Himedia Laboratories Pvt. Limited, Індія, без додаткових добавок, розлитого по 25 мл у скляні чашки Петрі (товщина агару дорівнювала $4 \pm 0,5$ мм). Перед посівами поверхню агару в чашках підсушували у термостаті за температури 37 °C, що запобігло формуванню нечіткої зони затримки росту навколо колоній. Для визначення чутливості культур мікроорганізмів до антибіотиків готували інокулят досліджуваного штаму методом прямого суспендування. З цієї метою чисту 18–24-годинну культуру бактерій, що виросла на МПА, стерильною бактеріологічною петлею суспендували в стерильному фізіологічному розчині і доводили бактеріальну суспензію до щільності 0,5 за стандартом мутності МакФарланда з використанням денсиметра для визначення оптичної щільності бактеріальної

суспензії (виробництва Erba Lachema, Чехія). Оптична щільність 0,5 за МакФарландом відповідала навантаженню $1,5 \times 10^8$ КУО/мл. Після цього на поверхню агару МХА рівномірно (для отримання суцільного газону) штриховими рухами наносили інокулят. Через 1–2 хв після нанесення суспензії на поверхню підсушеного агару з досліджуваною культурою поміщали диски з антибіотиками виробництва Himedia Laboratories Pvt. Limited (Індія). Чашки з посівами інкубували в термостаті за температури $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 16–20 год, після чого проводили облік результатів: вимірювання діаметру зони затримки росту (мм) мікроорганізму навколо диску з антибіотиком.

Вивчення чутливості бактерій до колістину виконували згідно з вимогами EUCAST методом серійних (послідовних) розведень. Спочатку виготовляли основний розчин колістину з розрахунку 1000,0 мкг антибіотика на 1 мл дистильованої води. У стерильних скляних пробірках в об'ємі 1 мл з основного розчину готували ряд серійних двократних розведень у бульйоні Мюллера – Хінтона (МХБ) (Himedia Laboratories Pvt. Limited, Індія) до концентрації 0,122 мкг/мл. Таким чином, дослідні концентрації антибіотика складали: 500 мкг/мл; 250 мкг/мл; 125 мкг/мл; 62,5 мкг/мл; 31,25 мкг/мл; 15,6 мкг/мл; 7,8 мкг/мл; 3,9 мкг/мл; 1,95 (≈ 2) мкг/мл; 0,987 (≈ 1) мкг/мл; 0,49 ($\approx 0,5$) мкг/мл; 0,24 мкг/мл; 0,122 мкг/мл; 0,061 мкг/мл; 0,03 мкг/мл. Кінцева кількість бактерій, що вносилися у пробірку з розведеннями антибіотика, складала 5×10^5 КУО/мл. Посіви інкубували при температурі $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$ 16–20 год, після чого проводили облік результатів і визначали мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК), яка встановлювалася за останньою пробіркою з візуально відсутнім ростом бактерій. Зростання культури в присутності антибіотика порівнювали з референтною пробіркою («негативний» контроль), що містила основний розчин без додавання в нього мікроорганізмів. Позитивним контролем дослідження слугували ємності з середовищем та культурами без додавання антибіотика. Штам вважався чутливим до колістину, якщо його МІК відповідала нормативним даним, наведеним у EUCAST, тобто ≤ 2 мг/л (2 мкг/мл).

Антибіотикорезистентність клебсієли вивчали до ампіциліну (10 мкг/диск), ампіцилін-сульбактаму (10–10 мкг/диск), цефокситину (30 мкг/диск), цефепіму (30 мкг/диск), цефтріаксону (30 мкг/диск), цефотаксиму (5 мкг/диск), цефтазідиму (10 мкг/диск), іміпенему (10 мкг/диск), меропенему (10 мкг/диск), гентаміцину (10 мкг/диск), амікацину (30 мкг/диск), ципрофлоксацину (5 мкг/диск), офлоксацину (5 мкг/диск).

Чутливість штамів ацинетобактера і синьогній-

ної палички визначали до гентаміцину (10 мкг/диск), амікацину (30 мкг/диск), тобраміцину (10 мкг/диск), меропенему (10 мкг/диск), іміпенему (10 мкг/диск), ципрофлоксацину (5 мкг/диск), левофлоксацину (5 мкг/диск). Чутливість псевдомонади до колістину визначали згідно з вимогами EUCAST методом серійних (послідовних) розведень. Штами *P. aeruginosa* вважалися чутливими до даного антибіотика, якщо його МІК дорівнювала або була меншою ніж 2 мкг/мл (2 мг/л).

У стафілококу вивчали чутливість до бензилпеніциліну (1 Од/диск), ампіциліну (2 мкг/диск), цефокситину (30 мкг/диск), норфлоксацину (10 мкг/диск), еритроміцину (15 мкг/диск), кліндаміцину (2 мкг/диск), лінезоліду (10 мкг/диск). Дослідження антибіотикочутливості у ентерококу проводили з використанням дисків з ампіциліном (2 мкг/диск), іміпенемом (10 мкг/диск), норфлоксацином (10 мкг/диск), ципрофлоксацином (5 мкг/диск), гентаміцином (30 мкг/диск), стрептоміцином (300 мкг/диск), ванкоміцином (5 мкг/диск), лінезолідом (10 мкг/диск), тігецикліном (15 мкг/диск).

Для проведення експериментів навіски стружки досліджуваних металів масою 5 мг попередньо промивали у стерильному фізіологічному розчині (0,85 % NaCl), потім стерилізували у 70 % спирті протягом 5 хв і промивали у стерильному фізіологічному розчині. Після стерилізації стружку занурювали в ємності зі свіжоприготованим бульйоном Мюллера – Хінтона, pH 7,4 (виробництво HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Індія) з розрахунку 1 мг стружки на 1 мл бульйону. Ємності зі зануреною стружкою інкубували в термостаті за температури 37°C протягом 72 годин. Інкубація стружки в рідкому середовищі супроводжувалася утворенням продуктів біодеградації сплаву внаслідок електрохімічних реакцій. Після інкубації надосадову рідину відбирали та центрифугували за допомогою лабораторної центрифуги при 1000 оборотах/хвилину упродовж 5 хвилин. Отриманий таким чином надосад характеризувався прозорістю та лужним середовищем pH 8–9.

При проведенні дослідів використовували штамми нозокоміальних збудників, які в процесі підготовки до дослідження вирощували на простому живильному середовищі МПА (виробник HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Індія) за температури 37°C протягом 24 годин. У стерильних умовах із добових культур бактеріологічною петлею готували гомогенний інокулюм у фізіологічному розчині до щільності 1,0 за стандартом мутності МакФарланда, що відповідала навантаженню $1,0 \times 10^9$ КУО/мл. З отриманого інокулюму методом серійних розведень у фізіологічному розчині готували робочі суспензії мікроорганізмів від 10⁻¹ до 10⁻⁵.

Густина цих розведень відповідала концентрації мікроорганізмів від 108 до 104 КУО/мл.

В експерименті в стерильних умовах готовий екстракт стерильною піпеткою розливали по 2 мл у пробірки. У кожену пробірку вносили бактеріальний інокулюм у відповідній концентрації, з розрахунку 0,1 мл суспензії на 1 мл екстракту. Додатково ставили три контролю: росту культури, стерильності середовища та екстракту, відповідно. Ёмності з посівами ентеробактерій, неферментуючих грамнегативних мікроорганізмів і грампозитивних коків та контролюми інкубували в термостаті при $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ протягом 72 годин (4 доби). Щодоби візуально визначали наявність зростання мікроорганізмів у пробірках та робили висів вмісту (0,1 мл) на чашки з агаром Мюллера – Хінтона. Чашки з посівами термостатували при 37°C протягом 24 год. Таким чином проводили по п'ять висівів з пробірок з клебсіелою, неферментуючими грамнегативними мікроорганізмами та грампозитивними коками. В якості контролю використовували чашки зі стерильним агаром.

Проводилась оцінка бактеріостатичної та бактерицидної активності екстракту, а саме, продуктів біодеградації досліджуваних сплавів. Бактеріостатичну активність визначали візуально за наявністю або відсутністю зростання мікроорганізмів у пробірках із посівами мікроорганізмів впродовж 72 годин (3 доби). Бактерицидну дію екстракту вивчали за наявністю або відсутністю росту колоній мікроорганізмів на чашках з агаром Мюллера – Хінтона. Після кожного висіву з пробірок по закінченню інкубації чашок проводили підрахунок колоній, що виросли на агарі. Дослідження антимікробної активності екстрактів сплавів проводили в п'яти повторях.

Статистичний аналіз результатів вивчення бактерицидної активності продуктів біодеградації сплавів проводили за допомогою ліцензійних комп'ютерних програм Microsoft Excel 2010 і StatSoft Statistica v12. При аналізі розподілів кількісних даних визначали міри центральної тенденції – медіану (Me) і міри дисперсії – міжквартильний інтервал у вигляді 25-го і 75-го перцентилів. Порівняння кількісних показників у двох незалежних вибірках (результати дії екстрактів сплавів MZZ-P та MZZ-MB) здійснювали за допомогою непараметричного Т-критерію Вілкоксона (Wilcoxon T-test). Відмінності між групами вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати

Проведене дослідження антибактеріальної дії продуктів біодеградації сплавів MZZ-P і MZZ-MB щодо клінічного карбапенем-резистентного шта-

му клебсіели, виділеного від хворого з нозокоміальною інфекцією, встановило бактеріостатичну і бактерицидну дію цих сплавів. Для підтвердження наявності генів карбапенем-резистентності застосовано швидкий імунохроматографічний тест NG RAPID Test CARBA-5 виробництва DIAMEDIX Diagnostica (Румунія) (рис.1). За допомогою тесту виявлені гени карбапенемрезистентності груп CTX і KPC. Клінічний штам клебсіели виявився високочутливим до дії продуктів біодеградації сплаву MZZ-P (табл. 1): загибель мікроорганізмів відбувалася у концентраціях від 106 до 104 КУО/мл, кількість колоній збудника відповідно зменшувалася від 17 до 4. Ефективніше знешкоджували цей збудник продукти біодеградації сплаву MZZ-MB у концентраціях від 106 до 105 КУО/мл, кількість колоній збудника відповідно зменшувалась від 43 до 5 ($p < 0,05$). У всіх проведених дослідженнях з мультирезистентними клінічними штамами після перших трьох висівів з пробірок, до яких було додано найбільшу концентрацію бактерій (109 – 107 КУО/мл), кількість колоній на агарі у більшості дослідів неможливо було підрахувати через їх значне число та майже зливне зростання (∞).

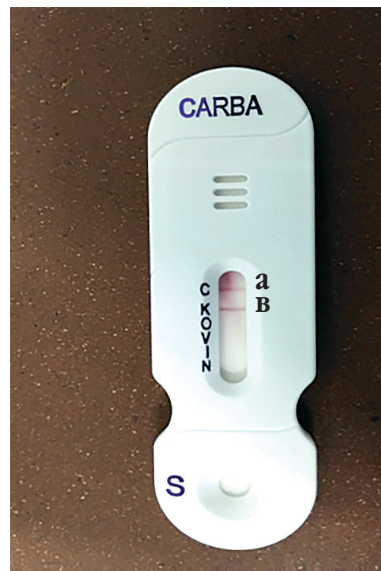


Рис.1. Імунохроматографічне виявлення карбапенем-резистентних генів у штаму *K. pneumoniae* №367: а - CTX; в - KPC

У процесі вивчення бактерицидної активності екстрактів сплавів щодо грампозитивних мультирезистентних стафілококів та ентерококів, виявлено, що вони чутливі до дії продуктів біодеградації досліджуваних сплавів. Протягом терміну інкубації кількість коків в екстракті значно зменшувалася, що підтверджувалося зниженням кількості колоній, які виросли на агарі Мюллера – Хінтона після кожного висіву. Продукти біодеградації досліджуваного MZZ-P сплаву та підвищене рН

середовища обумовили як бактеріостатичний, так і бактерицидний ефект на штамі *S. aureus* № 127. Зафіксовано зменшення кількості колоній мікроорганізмів, які виростили на поверхні агару після кожного висіву з пробірок у концентраціях від 10^6 до 10^4 КУО/мл; кількість колоній збудника відповідно зменшувалась від 673 до 2 (табл.). Ефективніше цей збудник знешкоджували продукти біодеградації сплаву MZZ-MB при концентраціях від 10^6 до 10^5 КУО/мл, кількість колоній збудника відповідно зменшувалась від 247 до 2 ($p < 0,05$).

Мультирезистентний штамі *E. faecalis* № 223, як і штамі *S. aureus* № 127, проявив помірну резистентність до дії продуктів біодеградації сплаву MZZ-P. Знешкодження ентерококів відбувалося досить повільно, проте з кожним висівом кількість колоній на агарі Мюллера – Хінтона зменшувалась, що свідчило про загибель клітин в екстракті протягом усього періоду інкубації. Це підтверджувалося зменшенням кількості колоній мікроорганізмів, які виростили на поверхні агару після кожного висіву з пробірок: при концентраціях від 10^6 до 10^4 КУО/мл кількість колоній збудника відповідно зменшувалась від 576 до 8 (табл.). Також встановлено вищий бактерицидний ефект продуктів біодеградації сплаву MZZ-MB. Загибель бактерій спостерігалася при посівних дозах від 10^6 до 10^5 КУО/мл, при цьому кількість колоній збудника відповідно зменшувалась від 208 до 12 ($p < 0,05$).

На підставі проведених досліджень виявлено, що досліджувані екстракти сплавів володіють високою бактерицидною активністю щодо мультирезистентних клінічних штамів групи грамнега-

тивних неферментуючих бактерій: *P. aeruginosa* №182 та *A. baumannii* №171 (табл.). Під час візуального обліку посівів в екстрактах досліджуваних сплавів визначено, що впродовж 72 год інкубації бактерій у термостаті відбулося зменшення кількості колоній синьогнійної палички та ацинетобактера на всіх щільних поживних середовищах. У результаті вивчення бактерицидної активності сплаву MZZ-P щодо штаму *P. aeruginosa* №182 виявлено, що під час інкубації відбувалася поступова загибель бактерій в екстракті. Це підтверджувалося зменшенням кількості колоній мікроорганізмів, які виростили на поверхні агару після кожного висіву з пробірок у концентраціях від 10^6 до 10^4 КУО/мл, відповідно від 369 до 2. Ефективніше знешкоджували цей збудник продукти біодеградації сплаву MZZ-MB у посівних дозах від 10^6 до 10^5 КУО/мл, кількість колоній синьогнійної палички відповідно зменшувалась від 276 до 6 ($p < 0,05$).

Визначено, що під час інкубації штаму *A. baumannii* №171 в екстракті сплаву MZZ-P, його кількість протягом чотирьох діб поступово зменшувалась, що підтверджувалося результатами підрахунків колоній, які виростили на агарі після висівів з екстракту у посівних дозах від 10^6 до 10^4 КУО/мл. Кількість колоній збудника відповідно зменшувалась від 64 до 4. Під час періоду спостереження також виявлено більш ефективне знезараження мікробної зависі цього збудника продуктами біодеградації сплаву MZZ-MB. У посівних дозах від 10^6 до 10^5 КУО/мл кількість колоній збудника відповідно зменшувалась від 10 до 3 ($p < 0,05$).

Таблиця №1

Кількість колоній мультирезистентних нозокоміальних штамів бактерій групи ESKAPE, які виростили на агарі Мюллера – Хінтона після інкубації в екстракті сплавів через 72 години, Ме (Q25-Q75)

NN п/п	Назва штаму	Посівна доза, КУО/мл	MZZ-P	MZZ-MB
1	2	3	4	5
1.	<i>S. aureus</i> N127 (MRSA)	106	673(505-841)	247(185-309)
		105	189(142-236)	2(1,5-2,5)
		104	2(1,5-2,5)	0
2.	<i>E. faecalis</i> № 223 (VRE)	106	576(432-720)	208(156-260)
		105	83(62-104)	12(9-15)
		104	8(6-10)	0
3.	<i>P. aeruginosa</i> № 182	106	369(277-461)	275(206-344)
		105	32(24-40)	6(4,5-7,5)
		104	2(1,5-2,5)	0
4.	<i>A. baumannii</i> №171	106	64(48-80)	10(7,5-12,5)
		105	11(8,25-13,75)	3(2-4)
		104	4(3-5)	0
5.	<i>K. pneumoniae</i> № 367	106	17(13-21)	43(32-54)
		105	8(6-10)	5(3,8-6,3)
		104	4(3-5)	0

Обговорення

Захворювання та травми опорно-рухової системи посідають друге місце серед причин травматизму і третє місце серед хвороб, що призводять до інвалідності дорослого населення. Ортопедичні імплантати займають особливе місце як у клінічній практиці, так і в біомедичній промисловості. На сьогодні найбільшу зацікавленість викликають імпланти, здатні біодеградувати у разі їх імплантації в організм людини. Концепція імплантів, що біодеградує, з'явилася завдяки становленню й розвитку застосування шовних матеріалів, що розсмоктуються в організмі. Важливим аспектом під час проведення хірургічних втручань із використанням імплантів є попередження виникнення гнійно-запальних інфекційних ускладнень, які часто пов'язані з неефективною антибактеріальною терапією [13]. Значна частота виникнення незадовільних результатів антибактеріальної терапії в ортопедо-травматологічній практиці потребує пошуку принципово нових матеріалів, продукти біодеградації яких забезпечують профілактику та ефективне лікування імплантат-асоційованих остеомієлітів [14]. Бактеріальна інфекція під час регенерації кісткової тканини є серйозною проблемою, оскільки призводить до її інфікування з подальшим пошкодженням імплантату. Лікування антибіотиками – одне з рішень, яке дає змогу розв'язати цю проблему, але постає нова проблема підвищеної стійкості бактерій, що пов'язана зі зловживанням антибіотиками. Досить часто це закінчується розвитком остеомієліту – від 3,0 до 24,0 % після відкритих переломів та до 8,0 % після оперативного лікування закритих переломів із застосуванням імплантів [15].

Інфекції, асоційовані з імплантатами (implant-associated infections, IAI), зумовлені колонізацією поверхні імплантованих конструкцій мікроорганізмами з подальшим формуванням біоплівки (biofilm). Біоплівка є високоорганізованою мікробною спільнотою, зануреною в екстрацелюлярний полімерний матрикс (extracellular polymeric substance, EPS), що забезпечує персистенцію патогенів, їх захист від факторів імунної відповіді та антимікробних препаратів, а також сприяє розвитку хронічного інфекційного процесу, рецидивів і, в окремих випадках, персистуючої бактеріємії. Етіологічний спектр збудників визначається локалізацією імплантату, типом імплантованої конструкції, механізмом інфікування та імунологічним статусом пацієнта. Після контамінації поверхні імплантату бактерії послідовно проходять стадії початкової адгезії, незворотної фіксації, проліферації, синтезу екстрацелюлярно-

го полімерного матриксу та дозрівання біоплівки, яка міцно інтегрується з поверхнею імплантату і набуває високої резистентності до антимікробної терапії та механізмів імунного захисту організму. Саме формування біоплівки є одним із ключових факторів хронізації інфекції та невдачі антибактеріального лікування без видалення або ревізії імплантату [16]. Формування і поширення резистентності до карбапенемів у грамнегативних бактерій є однією з найбільш актуальних проблем сучасної антимікробної хіміотерапії. Карбапенеми зазвичай розглядаються як найбільш ефективні антимікробні препарати при лікуванні важких нозокоміальних і позалікарняних інфекцій полімікробної етіології. Проте набута стійкість до препаратів цієї групи останнім часом зустрічається все частіше, особливо серед збудників нозокоміальних інфекцій, включно з імплант-асоційованими. Одними з таких збудників є карбапенем-резистентні *K. pneumoniae* та група неферментуючих грамнегативних бактерій – *Acinetobacter baumannii* та *Pseudomonas aeruginosa* [17].

Сучасні дослідження зосереджені на розробці медичних сплавів, які б володіли антибактеріальними властивостями та піддавалися біорозкладанню в організмі, виконавши свою функцію з остеосинтезу або зіставлення та загоєння тканин ранових поверхонь. Отримані нами результати підтверджують високу бактеріостатичну та бактерицидну дію досліджених сплавів щодо мультирезистентних штамів основних нозокоміальних збудників. Подібні результати були отримані іншими дослідниками на прикладі дії магнієвого сплаву на ентеробактерії та стафілококи [18], комбінованого біомедичного сплаву (Fe–Mn–Si–Cu) щодо групи грамнегативних неферментуючих бактерій [19] та антимікробної дії комбінованого титановмісного сплаву на *E. coli*. [20]. Надалі наші дослідження можуть фокусуватися на вивченні антимікотичної дії сплавів MZZ-P та MZZ-MB, в першу чергу на нозокоміальні збудники роду *Candida*.

Висновки

1. Продукти біодеградації магнієвих сплавів MZZ-P та MZZ-MB продемонстрували виражену бактеріостатичну та бактерицидну активність щодо клінічних мультирезистентних штамів бактерій групи ESKAPE, включаючи MRSA (*S. aureus*), VRE (*E. faecalis*), *P. aeruginosa*, *A. baumannii* та карбапенем-резистентну *K. pneumoniae*, що підтверджує їх широкий антимікробний потенціал.

2. Результати порівняльного аналізу показали, що продукти біодеградації сплаву MZZ-MB у

більшості випадків забезпечували більш виражений бактерицидний ефект порівняно зі сплавом MZZ-P, що проявлялося швидшим і статистично значущим ($p < 0,05$) зменшенням кількості життєздатних бактеріальних клітин у клінічних ізолятах.

3. Антимікробна дія досліджуваних сплавів характеризувалася поступовим зниженням кількості колонієутворювальних одиниць протягом 72-годинної інкубації у широкому діапазоні початкових концентрацій інокулюму (10^4 – 10^6 КУО/мл), що свідчить про пролонговану бактерицидну активність продуктів їх біодеградації.

4. Отримані результати свідчать про перспективність використання біодеградуючих магнієвих сплавів, особливо MZZ-MB, як матеріалів для створення ортопедичних імплантатів із власними антимікробними властивостями. Водночас для підтвердження їх клінічної ефективності та безпечності необхідне проведення подальших досліджень *in vivo* та клінічних випробувань.

References

1. World Health Organization. *Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2023*. Geneva: World Health Organization; 2023. doi:10.4060/cc8074en.
2. Miller WR, Arias CA. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nat Rev Microbiol*. 2024;22:598-616. doi:10.1038/s41579-024-01054-w.
3. Venkateswaran P, Vasudevan S, David H, Shaktivel A, Shanmugam K, Neelakantan P, et al. Revisiting ESKAPE pathogens: virulence, resistance, and combating strategies focusing on quorum sensing. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1159798. doi:10.3389/fcimb.2023.1159798.
4. Sarmah P, Das S. Escaping the ESKAPE pathogens: a review on antibiofilm potential and resistance mechanisms. *Microb Pathog*. 2024;194:106842. doi:10.1016/j.micpath.2024.106842
5. Zhang T, Wang W, Liu J, Wang L, Tang Y, Wang K. A review on magnesium alloys for biomedical applications. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:953344. doi: 10.3389/fbioe.2022.953344
6. Walter N, Rupp M, Hierl K, Alt V. Long-term patient-related quality of life after fracture-related infections of the long bones. *Bone Joint Res*. 2021;10(5):321-329. doi:10.1302/2046-3758.105.BJR-2020-0532.
7. Koo H, Allan RN, Howlin RP, Stoodley P, Hall-Stoodley L. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(12):740-755. doi: 10.1038/nrmicro.2017.99.
8. Koenig C, Kuti JL. Evolving resistance landscape in Gram-negative pathogens: an update on β -lactam and β -lactam inhibitor treatment combinations for carbapenem-resistant organisms. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2024;44(8):658-674. doi:10.1002/phar.2950.
9. Li Q, Zhou X, Yang R, Shen X, Li G, Zhang C, et al. Carbapenem-resistant Gram-negative bacteria (CR-GNB) in ICUs: resistance genes, therapeutics, and prevention: a comprehensive review. *Front Public Health*. 2024;12:1376513. doi:10.3389/fpubh.2024.1376513.
10. Paudel R, Shrestha E, Chapagain B, Tiwari BR. Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: review of resistance and detection methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2024;110(1):116370. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2024.116370..
11. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 15.0*. Växjö (Sweden): EUCAST; 2025. Available from: <https://www.eucast.org>
12. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Disk diffusion methodology and quality control tables. Version 15.0*. Växjö (Sweden): EUCAST; 2025. Available from: <https://www.eucast.org>
13. Metsemakers WJ, Morgenstern M, McNally MA, Moriarty TF, McFadyen I, Scarborough M, et al. Fracture-related infection: a consensus on definition and management. *Injury*. 2018;49(3):505-510. doi: 10.1016/j.injury.2017.08.040.
14. Buijs MAS, Haidari S, Ijpma FFA, Hietbrink F, Govaert GAM. What can they expect? Decreased quality of life and increased postoperative complication rate in patients with a fracture-related infection. *Injury*. 2024;55:111425. doi:10.1016/j.injury.2024.111425.
15. Zhang T, Wang W, Liu J, Wang L, Tang Y, Wang K. A review on magnesium alloys for biomedical applications. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:953344. doi:10.3389/fbioe.2022.953344
16. Mackow NA, van Duin D. Reviewing novel treatment options for carbapenem-resistant Enterobacterales. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2024;22(1-3):71-85. doi:10.1080/14787210.2024.2303028.
17. Orapiriyakul W, Young PS, Damiati L, Tsimbouri PM. Antibacterial surface modification of titanium implants in orthopaedics. *J Tissue Eng*. 2018;9:2041731418789838. doi: 10.1177/2041731418789838.
18. Zhang G, Sior G, Szczepański J, Radtke A. Biodegradable Iron-Based Materials-What Was Done and What More Can Be Done? *Materials (Basel)*. 2021;14(12):3381. doi: 10.3390/ma14123381.
19. Durdu S, Yalçın E, Altinkök A, Çavuşoğlu K. Characterization and investigation of electrochemical and biological properties of antibacterial silver nanoparticle-deposited TiO₂ nanotube array surfaces. *Sci Rep*. 2023;13:4699. doi: 10.1038/s41598-023-31937-6.
20. Wang W, Liu H, Guo Z, Hu Z, Wang K, Leng Y, et al. Various Antibacterial Strategies Utilizing Titanium Dioxide Nanotubes Prepared via Electrochemical Anodization Biofabrication Method. *Biomimetics (Basel)*. 2024 Jul 5;9(7):408. doi: 10.3390/biomimetics9070408

Comparative Assessment of the Susceptibility of Multidrug-Resistant Clinical ESKAPE Bacterial Strains to the Biodegradation Products of MZZ-P and MZZ-MB Alloys

Movchan O.S.¹, Koteliukh B.A.¹ ✉, Kyryk D.L.¹

¹Shupyk National Healthcare University of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Summary. Background. Antibiotic resistance of microorganisms belonging to the ESKAPE group is one of the leading threats to modern medicine, particularly in the context of implant-associated infections in orthopedics and traumatology. The search for new biomaterials with inherent antibacterial properties is a promising strategy for preventing such complications. **Objective.** To compare the antibacterial activity of the biodegradation products of MZZ-P and MZZ-MB alloys against multidrug-resistant clinical ESKAPE bacterial strains. **Materials and Methods.** The study was performed using multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecalis* (VRE), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*. Antibiotic susceptibility was determined according to EUCAST standards using the disk diffusion and serial dilution methods. The antimicrobial activity of alloy biodegradation products was assessed based on their bacteriostatic and bactericidal effects over a 72-hour incubation period, followed by subculturing on Mueller–Hinton agar. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon test. **Results.** The biodegradation products of both alloys demonstrated pronounced antibacterial activity against all tested strains. A progressive decrease in the number of microbial colonies during incubation was observed, indicating a bactericidal effect. The MZZ-MB alloy demonstrated statistically significantly higher efficacy compared to MZZ-P ($p < 0.05$), particularly against Gram-negative non-fermenting bacteria. **Conclusions.** The biodegradation products of MZZ-P and MZZ-MB alloys exhibited strong bactericidal activity against multidrug-resistant ESKAPE pathogens. These findings support their potential use as biodegradable implants for the prevention of implant-associated infections.

Key words: ESKAPE pathogens; multidrug-resistant bacteria; biodegradation products; magnesium alloys; antibacterial activity; implant-associated infections; osteomyelitis.