

СТАТЬЯ

УДК 616-022.7:616.6:576.52

ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЁНОК ОППОРТУНИСТИЧЕСКИМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

Малафеева Э.В., Гульнева М.Ю.

ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Ярославль, e-mail: ch-ma@mail.ru

Формирование биопленки представляет собой защищенный способ роста микроорганизмов и обеспечивает им преимущества по сравнению с изолированными клетками. В работе представлены результаты сравнительного изучения образования биопленок оппортунистическими микроорганизмами, колонизирующими слизистые оболочки верхних дыхательных и мочевыводящих путей. При бактериологическом обследовании больных острым ринитом, острым циститом и практически здоровых лиц группы сравнения выделено 239 штаммов оппортунистических грамположительных и грамотрицательных бактерий. Выделенные микроорганизмы изучены с позиции их способности формировать биопленку. Для оценки пленкообразования использован метод, основанный на способности микроорганизмов в составе биопленки связывать краситель кристаллический фиолетовый. Установлено, что грамположительные и грамотрицательные оппортунистические микроорганизмы, выделенные у больных, формируют биопленку с различной частотой. Образование биопленки у *S. aureus* наблюдалось в 84,44% случаев, у коагулазоотрицательных стафилококков вида *S. epidermidis* в 60% случаев ($p < 0,05$). Микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* (родов *Proteus*, *Klebsiella*) и *Pseudomonas aeruginosa* в 100% случаев формировали биопленку. Наряду с этим культуры *S. aureus*, выделенные у больных, отличались более интенсивным формированием биопленок. Интенсивность образования биопленок коагулазонегативными стафилококками и грамотрицательными бактериями, полученными при обследовании больных гнойно-воспалительными инфекциями и лиц группы сравнения, не носила существенных различий. Культуры синегнойной палочки имели меньшую интенсивность образования биопленки, однако формирование биопленок в 100% случаев может свидетельствовать о выраженной способности *P. aeruginosa* участвовать в патогенезе инфекции и повышать персистирующий характер течения этих процессов. Высокая способность и интенсивность формирования биопленок может определять этиологическую роль оппортунистических микроорганизмов при гнойно-воспалительных инфекциях на слизистых оболочках, что необходимо учитывать при проведении патогенетически обоснованной терапии.

Ключевые слова: биопленки, оппортунистические микроорганизмы, возбудители гнойно-воспалительных инфекций

FORMATION OF BIOFILMS BY OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS

Malafeeva E.V., Gulneva M.Yu.

Yaroslavl State Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation,

Yaroslavl, e-mail: ch-ma@mail.ru

Biofilm formation is a protected method for the growth of microorganisms and provides them with advantages over isolated cells. The work is devoted to a comparative study of the formation of biofilms by opportunistic microorganisms that colonize the mucous membranes of the upper respiratory and urinary tract. During bacteriological examination of patients with acute rhinitis, acute cystitis and practically healthy individuals of the comparison group, 239 strains of opportunistic gram-positive and gram-negative bacteria were isolated. Isolated microorganisms have been studied from the perspective of their ability to form biofilms. To evaluate film formation, a method was used based on the ability of microorganisms in the composition of a biofilm to bind a crystalline violet dye. It was found that gram-positive and gram-negative opportunistic microorganisms isolated from patients form a biofilm with different frequencies. Biofilm formation in *S. aureus* was observed in 84.44% of cases, in coagulase-negative staphylococci of the species *S. epidermidis* in 60% of cases ($p < 0,05$). Microorganisms of the *Enterobacteriaceae* family (of the genera *Proteus*, *Klebsiella*) and *Pseudomonas aeruginosa* in 100% of cases formed a biofilm. Along with this, *S. aureus* cultures isolated from patients were distinguished by more intensive biofilm formation. The intensity of biofilm formation by coagulase-negative staphylococci and gram-negative bacteria obtained during examination of patients with purulent-inflammatory infections and persons of the comparison group did not have significant differences. *Pseudomonas aeruginosa* cultures had a lower intensity of biofilm formation, however, biofilm formation in 100% of cases may indicate a pronounced ability of *P. aeruginosa* to participate in the pathogenesis of infection and increase the persistent nature of the course of these processes. The high ability and intensity of biofilm formation can determine the etiological role of opportunistic microorganisms in purulent-inflammatory infections on the mucous membranes, which must be taken into account when conducting pathogenetically substantiated therapy.

Keywords: biofilms, opportunistic microorganisms, pathogens of purulent-inflammatory infections

Биопленка – это сообщество микробов, которые обычно обитают на поверхности, включены во внеклеточный матрикс и очень отличаются от своих планктонных аналогов, оказывая огромное влияние на нашу жизнь, как позитивное, так и нега-

тивное [1]. Формирование биопленки представляет собой защищенный способ роста микроорганизмов, который делает бактериальные клетки менее восприимчивыми к уничтожению иммунными эффекторными механизмами хозяина, наделяет ассоцииро-

ванные бактерии высокой устойчивостью к антимикробным агентам, способствует возникновению рецидивирующих или персистирующих инфекционных заболеваний [2]. Формирование микроорганизмами биопленок обеспечивает патогены многими преимуществами по сравнению с планктонными формами. Различные виды микроорганизмов обладают способностью формировать биопленку и характеризуются гетерогенностью по биопленкообразованию [3]. Разнообразие инфекций, связанных с биопленкой, со временем увеличивается и более 60% инфекций вызывают микроорганизмы, способные расти как биопленка [4, 5]. Образование биопленки, имеющее инфекционное значение, чаще всего встречается на «имплантационных устройствах», связанных с аппаратом ИВЛ, эндокардиальными трубками, катетер-ассоциированными инфекциями мочевыводящих путей [2]. Однако при ряде других инфекций микроорганизмы способны расти как биопленка [6]. Оппортунистические микроорганизмы, инфицируя критических больных и пациентов с ослабленным иммунитетом, являются частой причиной гнойно-воспалительных заболеваний с различной локализацией и инфекций, которые возникают у больных при получении медицинской помощи (ИСМП) [7]. Особую актуальность приобретает изучение образования биопленок оппортунистическими микроорганизмами, которые наиболее часто (в 70–95% случаев) вызывают гнойно-воспалительные инфекции на слизистых оболочках верхних дыхательных и мочевыводящих путей [8, 9]. В связи с этим имеет практическое значение изучение особенностей формирования биопленок грамположительными и грамотрицательными условно-патогенными микроорганизмами, вызывающими гнойно-воспалительные процессы на слизистых оболочках организма хозяина.

Цель исследования: сравнительное изучение образования биопленок оппортунистическими микроорганизмами, колонизирующими слизистые оболочки верхних дыхательных и мочевыводящих путей.

Материалы и методы исследования

При микробиологическом обследовании 110 больных острым ринитом, 84 пациентов с острым циститом и 40 практически здоровых лиц группы сравнения выделено 239 штаммов оппортунистических микроорганизмов. Материалом для исследования служили моча и отделяемое со слизистых оболочек носа. Диагностику гнойно-воспалительной инфекции (острого ринита и острого цистита) проводили на основании клиниче-

ских симптомов и результатов микробиологического исследования. Получение и изучение исследуемого материала проведено в соответствии с приказом МЗ № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» (2006). Выделенные оппортунистические микроорганизмы были изучены с целью видовой идентификации по основным морфологическим, тинкториальным, культуральным и ферментативным признакам в соответствии с международной классификацией бактерий (Берджи, 2001). Изучение 195 штаммов грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, полученных при обследовании больных, и 44 штаммов, изолированных у практически здоровых носителей, позволило их идентифицировать по видовой и родовой принадлежности и отнести к видам стафилококка (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*), бактериям семейства *Enterobacteriaceae* (родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*) и виду *Pseudomonas aeruginosa*.

Способность и интенсивность формирования биопленок полученными штаммами оппортунистических микроорганизмов оценивали по степени связывания кристаллического фиолетового суточными культурами выделенных бактерий [10]. Результаты биопленкообразования учитывали на ридере при длине волны 540 нм. Коэффициент, характеризующий образование биопленок, вычисляли по отношению A_{540} опыт / A_{540} контроль, положительным считали значения более 1,1.

Статистическую обработку полученных данных проводили по программе STATISTICA 10.0 (StatSoftInc., США). Вычисляли показатель: средняя \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Сравнение непрерывных величин с нормальным распределением проводили по t-критерию Стьюдента. Дискретные величины сравнивали по критерию χ^2 . Статистически значимыми были различия при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что оппортунистические микроорганизмы, выделенные у больных, обладали различной способностью к образованию биопленок (табл. 1). Способность к формированию биопленок у грамотрицательных бактерий семейства *Enterubacteriaceae*, полученных при обследовании больных, обнаружена с высокой частотой. Штаммы *E. coli*, выде-

ленные у больных, формировали биопленку примерно в 79,41 % случаев, а рода *Enterobacter* – в 70 % случаев. Энтеробактерии родов *Klebsiella* и *Proteus* в 100 % случаев имели признак образования биопленок, что существенно чаще, чем у штаммов *E. coli* ($p < 0,05$). Высокой способностью к образованию биопленок обладали штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, формируя биопленку в 100 % случаев. Грамположительные микроорганизмы также характеризовались высокой способностью к формированию биопленок. Стафилококки вида *S. aureus*, выделенные у больных, формировали биопленку с высокой частотой (84,44 % случаев). Биопленкообразование выявлено у 60 % штаммов *S. epidermidis* и 70,83 % штаммов *S. haemolyticus*. Различия в частоте образования биопленки у *S. aureus* и *S. epidermidis* имели существенные различия ($p < 0,05$).

У лиц группы сравнения на слизистых оболочках были обнаружены грамположительные и грамотрицательные оппор-

тунистические микроорганизмы, формирующие биопленку. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae*: родов *Escherichia* и *Enterobacter* и стафилококки видов *S. aureus*, *S. epidermidis* (табл. 2). При сравнительном изучении микроорганизмов, выделенных у больных и лиц группы сравнения, установлены различия в частоте образования биопленок у данных культур.

Штаммы *E. coli*, выделенные у больных и лиц группы сравнения, формировали биопленку соответственно в 79,41 % и 85,71 % случаев ($p > 0,05$), *Enterobacter spp.* – соответственно в 70 % и 37,5 % случаев ($p > 0,05$). Штаммы *S. aureus* формировали биопленку соответственно в 84,44 % и 50 % случаев ($p < 0,05$), *S. epidermidis* – в 60 % и 37,5 % случаев ($p > 0,05$).

Результаты определения интенсивности формирования микробных биопленок оппортунистическими микроорганизмами, выделенными у больных, представлены на рис. 1.

Таблица 1
Образование биоплёнок клиническими штаммами оппортунистических микроорганизмов

Микроорганизмы	Микроорганизмы, выделенные у больных		
	Число штаммов	Число штаммов, образующих биоплёнку	
	n	n	%
Грамотрицательные			
<i>E. coli</i>	34	27	79,41
<i>Klebsiella spp.</i>	19	19	100
<i>Enterobacter spp.</i>	20	14	70
<i>Proteus spp.</i>	18	18	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	15	100
Грамположительные			
<i>S. aureus</i>	45	38	84,44
<i>S. haemolyticus</i>	24	17	70,83
<i>S. epidermidis</i>	20	12	60

Таблица 2
Образование биоплёнок оппортунистическими микроорганизмами

Микроорганизмы	Опportunистические микроорганизмы						
	Выделенные у больных			Выделенные у здоровых			p
	Число штаммов	Штаммы, образующие биоплёнку		Число штаммов	Штаммы, образующие биоплёнку		
	п	п	%	п	п	%	
Грамотрицательные							
<i>E. coli</i>	34	27	79,41	14	12	85,71	>0,05
<i>Enterobacter spp.</i>	20	14	70	8	3	37,5	>0,05
Грамположительные							
<i>S. aureus</i>	45	38	84,44	6	3	50	<0,05
<i>S. epidermidis</i>	20	12	60	16	6	37,5	>0,05

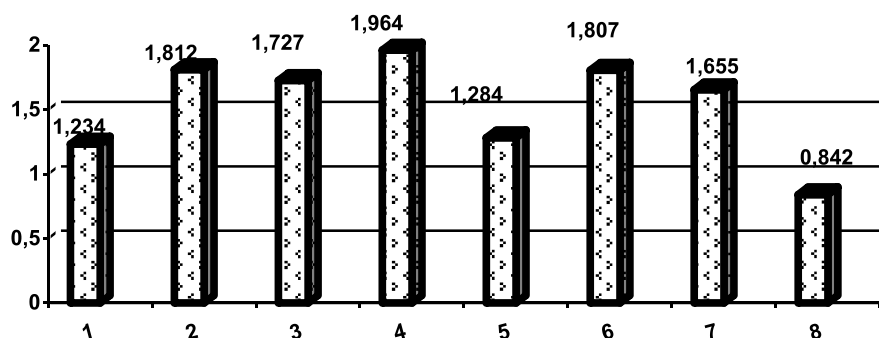


Рис. 1. Интенсивность образования биопленок оппортунистическими микроорганизмами, выделенными у больных.
Примечание. Грамотрицательные микроорганизмы: 1 – *E. coli*, 2 – *Klebsiella spp.*, 3 – *Enterobacter spp.*, 4 – *Proteus spp.*, 5 – *Pseudomonas aeruginosa*. Грамположительные микроорганизмы: 6 – *S. aureus*, 7 – *S. haemolyticus*, 8 – *S. epidermidis*

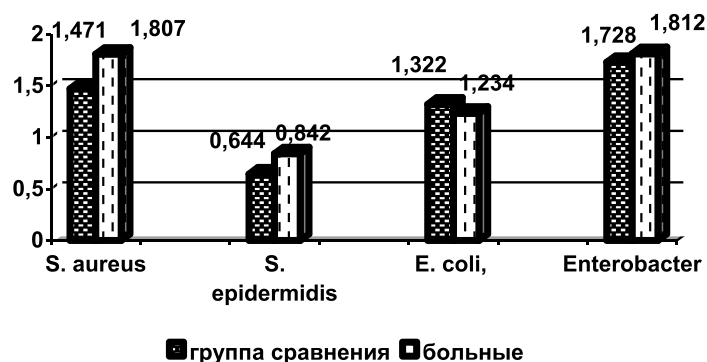


Рис. 2. Сравнительная характеристика образования биопленок оппортунистическими микроорганизмами

Грамотрицательные бактерии семейства *Enterobacteriaceae* характеризовались различной интенсивностью формирования биопленок. Штаммы *E. coli* формировали биопленку менее интенсивно по сравнению с другими грамотрицательными бактериями семейства *Enterobacteriaceae* ($p < 0,05$). Грамотрицательные бактерии родов *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Proteus* отличались высокой интенсивностью формирования биопленки соответственно в пределах $1,812 \pm 0,106$; $1,727 \pm 0,279$; $1,964 \pm 0,164$. Штаммы *Pseudomonas aeruginosa* характеризовались низкой интенсивностью образования биопленок в пределах $1,284 \pm 0,124$. Стафилококки видов *S. aureus* и *S. haemolyticus*, выделенные у обследованных пациентов, характеризовались высокой интенсивностью формирования биопленок, чем существенно отличались от эпидермального стафилококка ($p < 0,05$).

Интенсивность формирования микробных биопленок оппортунистическими микроорганизмами, выделенными у больных

и лиц группы сравнения, имела определенные различия (рис. 2).

Культуры *S. aureus*, выделенные у больных, отличались интенсивным формированием биопленок в пределах $1,807 \pm 0,089$, в то время как уровень формирования биопленок коагулазопозитивными стафилококками, изолированными у лиц группы сравнения, был равен $1,471 \pm 0,124$ ($p < 0,05$). Изучение интенсивности образования биопленок штаммами *S. epidermidis* и грамотрицательными бактериями (*E. coli* и *Enterobacter spp.*), выделенными у больных гнойно-воспалительными инфекциями и лиц группы сравнения, показало, что микроорганизмы двух групп формировали биопленки с однотипной интенсивностью вне зависимости от биотопа выделения ($p > 0,05$).

Клинические штаммы оппортунистических микроорганизмов, играющих этиологическую роль при гнойно-воспалительных процессах на слизистых оболочках верхних дыхательных и мочевыводящих путей, обладают выраженной способно-

стью к образованию микробных биопленок. Эпидермальный стафилококк и оппортунистические грамотрицательные микроорганизмы, колонизирующие слизистые оболочки верхних дыхательных и мочевыводящих путей здоровых лиц, формируют биопленку с такой же частотой, как и бактерии, вызывающие развитие гнойно-воспалительной инфекции, что может определять их этиологическую роль при инфекциях. Коагулазопозитивный стафилококк, выделенный у больных, отличается большей способностью к биопленкообразованию, что может способствовать повышению его вирулентности. Наибольшая интенсивность формирования биопленки проявляется у более патогенных микроорганизмов (*S. aureus*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*), которые являются ведущими возбудителями гнойно-воспалительных процессов. Способность оппортунистических микроорганизмов существовать в составе биопленки и выраженная интенсивность её формирования повышает способность бактерий вызывать гнойно-воспалительный патологический процесс. При этом грамотрицательные и грамположительные бактерии отличаются различной способностью к образованию биопленок, что может быть обусловлено особенностями строения их клеточных стенок, которые характеризуются существенными особенностями и определяют типичные свойства микроорганизмов. Эпидермальный стафилококк и кишечная палочка – основные представители нормальной микрофлоры организма – обладают меньшей способностью к образованию биопленок, так как поверхностных структуры их клеток могут изменяться в микробных биоценозах организма под влиянием активных форм кислорода, продуцируемого представителями доминирующих микроорганизмов микробных биоценозов [11, 12]. Культуры синегнойной палочки отличаются меньшей интенсивностью образования биопленок, однако формирование ее в 100% случаев может свидетельствовать о способности *P. aeruginosa* участвовать в патогенезе инфекции и повышать персистирующий характер течения этих инфекций [6].

Сравнительное изучение образования биопленок оппортунистическими микроорганизмами, колонизирующими слизистые оболочки верхних дыхательных и мочевыводящих путей у больных гнойно-воспалительными инфекциями и здоровых носителей, свидетельствует о высокой способности и интенсивности формирования биопленок условно-патогенными бактериями. Биопленкообразование может определять этиологическую роль оппорту-

нистических микроорганизмов при гнойно-воспалительных инфекциях на слизистых оболочках, что необходимо учитывать при проведении патогенетически обоснованной терапии.

Выводы

1. Оппортунистические микроорганизмы – возбудители гнойно-воспалительных инфекций на слизистых оболочках верхних дыхательных и мочевыводящих путей с высокой частотой и выраженной интенсивностью способны формировать биопленки.

2. Коагулазоположительные стафилококки вида *S. aureus*, выделенные у больных с гнойно-воспалительными инфекциями на слизистых оболочках, характеризуются высокой частотой и интенсивностью формирования биопленок.

3. Коагулазоотрицательный стафилококк (*S. epidermidis*) и грамотрицательные микроорганизмы (*E. coli* и *Enterobacter spp.*), выделенные у здоровых носителей, образуют биопленки с такой же частотой и интенсивностью, как и патогены при гнойно-воспалительных инфекциях, что может определять их оппортунистические свойства.

Список литературы

1. Lee K., Yoon S.S. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. J. Microbiol Biotechnol. 2017. Vol. 28.27(6). P. 1053–1064.
2. Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M.A., Hussain T., Ali M., Rafiq M., Kamil M.A. Bacterial biofilm and associated infections. J. Chin. Med. Assoc. 2018. Vol. 81(1). P. 7–11.
3. Carlos J., Sanchez Jr., Katrin Mende, Miriam L. Beckius, Kevin S. Akers, Desiree R. Romano, Joseph C. Wenke, Clinton K. Murray Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC Infect Dis. 2013. Vol. 29. 13. P. 47.
4. Del Pozo J.L. Biofilm-related disease. Expert Rev Anti Infect Ther. 2018. Vol. 16 (1). P. 51–65.
5. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и в организме хозяина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2011. № 3. С. 99–109.
6. Gellatly S.L., Hancock R.E. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog Dis. 2013. Vol. 67 (3). P. 159–173.
7. Martin R.M., Bachman M.A. Colonization, Infection and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018. Vol. 22.8. P. 4.
8. Klingenberg A., Noll I., Willrich N., Feig M., Emrich D., Zill E., Krenz-Weinreich A., Kalka-Moll W., Oberdorfer K., Schmiemann G., Eckmanns T. Antibiotic-Resistant. *E. coli* in Uncomplicated Community-Acquired Urinary Tract Infection. Dtsch Arztebl Int. 2018. Vol. 23. 115 (29–30). P. 494–500.
9. Vickery T.W., Ramakrishnan V.R. Bacterial Pathogens and the Microbiome. Otolaryngol Clin North Am. 2017. Vol. 50 (1). P. 29–47.
10. Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and analyzing static biofilms. Curr Protoc Microbiol. 2005. Vol. 1. P. 1002.
11. Hillier S.L., Krohn M.A., Klebanoff S.J., Eschenbach D.A. The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women. Obstet Gynecol. 1992. Vol. 79(3). P. 369–373.
12. Бухарин О.В., Сгибнев А.В. Влияние активных форм кислорода на адгезивные характеристики и продукцию биопленок бактериями // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2012. № 3. С. 70–73.