

УДК 628.353.153:616.728.2-089.84-77-022

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНКИ РАЗЛИЧНЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ШТАММАМИ БАКТЕРИЙ НА ПОВЕРХНОСТИ ПОЛИСТИРОЛА И СТЕКЛА

Осипова Е.В., Шипицына И.В., Науменко З.С.

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава России», Курган, e-mail: office@ilizarov.ru

Исследована способность к образованию биопленки на поверхности стекла и полистирола 20 клинических штаммов, выделенных из мочи пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой, поздний период (*E. coli*, n=9); с околоуставных тканей и с частей эндопротезов пациентов с развившейся нестабильностью тазобедренного сустава (*S. epidermidis*, n=6 и MRSE, n=5). Все штаммы были способны к образованию биопленки с различной степенью интенсивности. Наиболее выраженная способность к образованию биопленки как на поверхности полистирола, обладающей гидрофобными свойствами, так и на поверхности стекла, имеющей гидрофильные свойства, характерна для штаммов *S. epidermidis*. Менее интенсивно формировали биопленку на поверхности стекла штаммы *E. coli*, у штаммов MRSE отмечена слабая способность к формированию биопленки на поверхности полистирола.

**Ключевые слова:** биопленка, *Staphylococcus epidermidis*, MRSE, *Escherichia coli*, количественный анализ

## A COMPARATIVE QUANTITATIVE EVALUATION OF THE POTENTIAL OF BIOFILM FORMATION BY DIFFERENT BACTERIAL CLINICAL STRAINS ON POLYSTYROLE AND GLASS SURFACE

Osipova E.V., Shipitsyna I.V., Naumenko Z.S.

Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopaedics» of the RF Ministry of Health, Kurgan, e-mail: office@ilizarov.ru

The potential of biofilm formation on glass and polystyrole surfaces studied in 20 clinical strains isolated from urine of the patients with the spine-spinal cord injury, the late period (*E. coli*, n=9); from periarticular tissues, as well as from the implant parts of patients with the hip instability developed (*S. epidermidis*, n=6 and MRSE, n=5). All the strains had different-intensity potential of biofilm formation. The most marked potential of biofilm formation both on the polystyrole surface having hydrophobic properties, and on the glass surface having hydrophilic properties, is characteristic of *S. epidermidis* strains. *E. coli* strains formed biofilm on glass surface less intensively, MRSE strains had a weak potential of biofilm formation on polystyrole surface.

**Keywords:** biofilm, *Staphylococcus epidermidis*, MRSE, *Escherichia coli*, quantitative analysis

В настоящее время установлено, что многие хронические инфекции, возникающие при использовании медицинского имплантируемого оборудования – катетеров, протезов и др. – связаны со способностью патогенных бактерий формировать биопленки на поверхности этих устройств [1, 5].

Существуют различные методы лабораторного получения и количественного учета способности бактерий к образованию биопленок [5]. Наиболее распространенный и доступный метод исследования определения способности бактерий формировать биопленки на поверхности пластика, предложен G.O'Toole и R. Kolter [8]. Исследование способности бактерий формировать биопленки на поверхности стекла, как правило, ограничивается визуальным, описательным характером и лишь в некоторых случаях полуколичественной или количественной оценкой [3, 6].

По данным литературы, в 40-50% случаев основным возбудителем острого или хронического инфекционного процесса, возникающего после протезирования тазо-

бедренного сустава, является *Staphylococcus epidermidis*, в том числе и метициллинрезистентные штаммы (MRSE) [1]. У пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой среди возбудителей инфекции мочевыделительной системы преобладает *Escherichia coli* [9]. Значительная роль данных микроорганизмов в патогенезе инфекционных осложнений возникающих в результате их способности связываться с поверхностями имплантируемых устройств посредством неспецифической адгезии [7, 9] и, как следствие, формировать биопленки и определяет актуальность нашего исследования.

Цель нашего исследования – количественный анализ способности различных клинических штаммов бактерий формировать биопленки на гидрофобных (полистирол) и гидрофильных (стекло) поверхностях.

### Материалы и методы исследования

Исследована способность к образованию биопленки 20 клинических штаммов, выделенных от 18 пациентов, находившихся на лечении в РНЦ

«ВТО». Микроорганизмы были выделены из мочи пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой, поздний период (*E.coli*, n=9); с околоуставных тканей и с частей эндопротезов пациентов с развившейся нестабильностью тазобедренного сустава (*S.epidermidis*, n=6 и MRSE, n=5). Материал отбирали во время оперативного вмешательства при ревизионном эндопротезировании.

Выделение чистой культуры штаммов проводили общепринятыми методами. Идентификацию исследуемых штаммов проводили на бактериологическом анализаторе WalkAway-40 Plus («Siemens», США), используя панели PBCPC 20.

Исследование способности штаммов формировать биопленки на поверхности 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетов для иммуноферментного анализа проводили по методу G.O'Toole и R. Kolter [11]. По уровню адсорбции красителя этанолом, измеренному в единицах оптической плотности ( $OD_{630}$ ) на фотометре ELx808 (BioTek, США) при длине волны 630 нм оценивали активность формирования биопленки. Для интерпретации полученных данных определяли критерии способности штаммами формировать биопленки в соответствии с рекомендациями Stepanovic S. et al. [10]: при значениях  $OD_{630}$  ниже 0,090 – считали, что штаммы не обладали способностью к образованию биопленки; при  $0,090 < OD_{пл} \leq 0,180$  – штаммы обладали слабой; при  $0,180 < OD_{пл} \leq 0,360$  – средней; при  $OD_{пл} > 0,360$  – высокой способностью к образованию биопленки.

Для визуальной и количественной оценки способности бактерий формировать биопленки на поверхности покровного стекла использовали стерильные стеклянные чашки Петри диаметром 100 мм. В каждую чашку помещали стерильное покровное стекло размером 24x24 мм, на поверхность которого осторожно наливали 200 мкл суточной культуры штамма с концентрацией клеток  $10^7$  кл/мл и помещали в термостат при 37°C. Через 3 часа добавляли мясопептонный бульон до 2 мл и помещали в термостат при 37°C. Через 24 и 48 часов после инкубации питательную среду сливали, поверхность стекол трижды промывали 1,15M фосфатным буфером, фиксировали 96° спиртом, высушивали, окрашивали раствором генциан-виолета в течение 2 минут при комнатной

температуре, после чего промывали фосфатным буфером.

Полученные препараты исследовали под микроскопом при увеличении в 640 раз (об. 40; ок. 16). Цифровые изображения полей зрения получали с помощью цифровой камеры-окуляра DCM-300 (Китай), установленной на бинокулярном микроскопе XSP107E.

Для определения количественных характеристик использовали программу ImageJ (США). На цифровых изображениях препаратов измеряли площадь поля зрения, количество и площадь, занимаемую единичными адгезированными клетками и микроколониями. Рассчитывали количество единичных адгезированных клеток и микроколоний на единицу площади ( $1\text{мм}^2$ ), и доли, занимаемые ими в площади поля зрения. При этом учитывали размер микроколоний: до  $10\text{ мкм}^2$ , от 10 до  $100\text{ мкм}^2$ , от 100 до  $1000\text{ мкм}^2$ , от 1000 до  $10000\text{ мкм}^2$ ,  $> 10000\text{ мкм}^2$ . С каждого препарата вводили не менее 20 случайных полей зрения, полученные результаты усредняли.

Статистическую обработку данных исследования выполняли с помощью табличного редактора «Microsoft Excel – 2010» и программного обеспечения анализа данных AtteStat Версия 13.0 [2]. Для оценки статистической значимости различий между группами использовали критерий Вилкоксона. Различия между группами считали существенными при  $p < 0,05$ .

Для оценки тесноты и направления связи между количеством и площадью (долями), занимаемой единичными клетками и микроколониями, и оптическими плотностями ( $OD_{630}$ ) рассчитывали коэффициент корреляционного отношения Пирсона.

### Результаты исследования и их обсуждение

По данным фотометрического анализа наиболее активно биопленку на поверхности полистирола формировали штаммы *S.epidermidis*, о чем свидетельствуют средние значения  $OD_{630}$  (рис. 1). При этом интенсивность образования биопленок штаммами была различной (таблица).

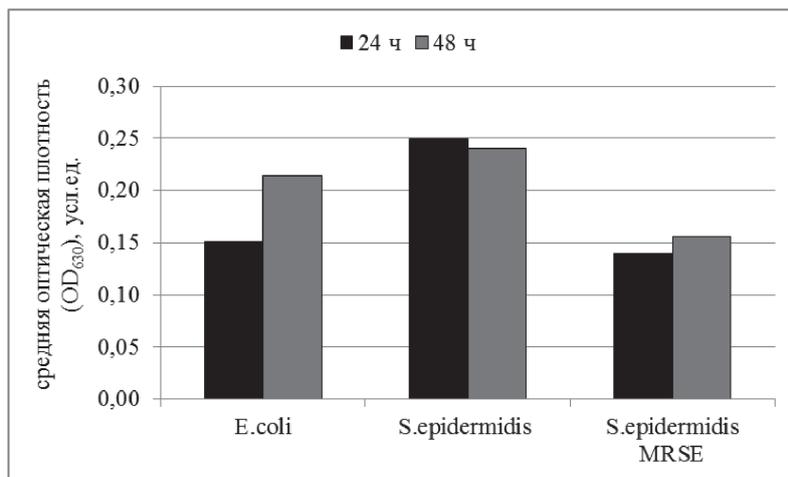


Рис. 1. Изменение средней оптической плотности красителя в лунках полистироловых планшетов, отражающей интенсивность формирования биопленки на их поверхности

Распределение штаммов по способности формировать биопленки на поверхности лунок полистироловых планшетов

Штамм	Способность штаммов формировать биопленку (24 ч / 48 ч)		
	слабая	средняя	высокая
S.epidermidis (n=6)	2 / 1	2 / 4	2 / 1
MRSE (n=5)	4 / 4	0 / 1	1 / 0
E.coli (n=9)	7 / 4	1 / 5	1 / 0

При исследовании способности бактерий формировать биопленки на поверхности покровного стекла установлено, что количество единичных адгезированных клеток и микроколоний через 48 часов увеличивалось (рис. 2 А, Б). Однако количество единичных адгезированных грамотрицательных бактерий (E.coli) на поверхности стекла было меньше, чем грамположительных (S.epidermidis, MRSE) (рис. 2 А), а их доля в площади поля зрения в 1,5-2 раза больше, что связано с размером бактерий (рис. 2 В). Площадь бактерий E.coli на двумерном изображении колеблется от 0,4 до 4 мкм<sup>2</sup>, изолятов стафилококка – от 0,196 до 1,766 мкм<sup>2</sup>, т.е. при меньшем количестве бактерии E.coli занимали большую площадь.

Наиболее выраженная способность к образованию биопленки на поверхности стекла отмечена у штаммов S.epidermidis

и MRSE (рис. 2). У всех исследованных штаммов на поверхности стекла преобладали микроколонии размер которых не превышал 10 мкм<sup>2</sup>. При этом на такой показатель, как доля в площади поля зрения большее влияние оказывает наличие микроколоний размером более 10000 мкм<sup>2</sup>. Так, через 48 часов количество и доля микроколоний штаммов MRSE размером более 10000 мкм<sup>2</sup> уменьшались, соответственно, в 8,5 и 4,2 раза, что приводило к уменьшению суммарной доли всех микроколоний в 1,5 раза (рис. 2 Б, Г). У штаммов S.epidermidis, напротив, наблюдали увеличение количества и доли микроколоний, которое происходило в основном за счет микроколоний размером от 100 до 1000 мкм<sup>2</sup>. У штаммов E.coli незначительно увеличивалось количество микроколоний размером от 10 до 10000 мкм<sup>2</sup>.

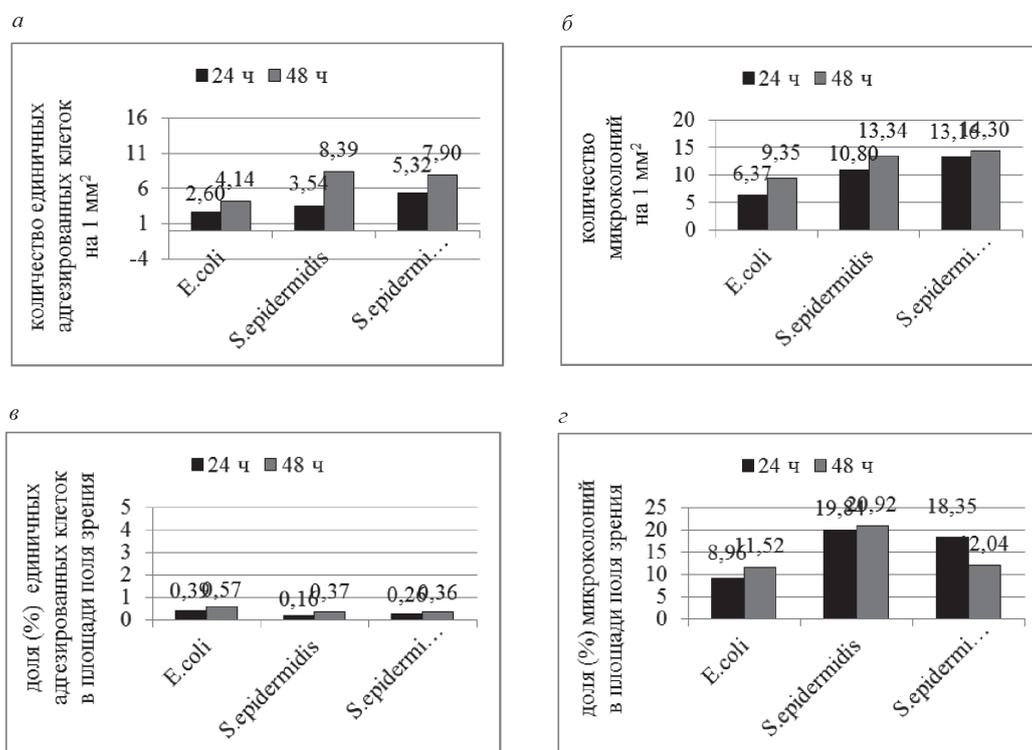


Рис. 2. Соотношение количества (а, б) и долей (в, г) единичных адгезированных клеток и микроколоний, формируемых клиническими штаммами, на поверхности покровного стекла через 24 и 48 ч

Отмечены статистически значимые положительные корреляционные связи между анализируемыми показателями для всех исследуемых штаммов. У штаммов MRSE через 48 часов показатели  $OD_{630}$  коррелировали с количеством ( $r=0,93$ ;  $p=0,024$ ) и долей ( $r=0,93$ ;  $p=0,022$ ) микроколоний на поверхности стекла размер которых составлял от 10 до 100 мкм<sup>2</sup>. У штаммов *S.epidermidis* через 48 часов увеличение показателей  $OD_{630}$  коррелировало с увеличением доли микроколоний размером от 100 до 1000 мкм<sup>2</sup> ( $r=0,99$ ;  $p=0,022$ ). У грамотрицательных бактерий (*E.coli*) через 24 часа коэффициент корреляции между  $OD_{630}$  и количеством,  $OD_{630}$  и долей микроколоний размером от 10 до 10000 мкм<sup>2</sup> изменялся от 0,79 до 0,90. Через 48 часов установлена прямая корреляционная связь между  $OD_{630}$  и количеством ( $r=0,73$ ;  $p=0,025$ ),  $OD_{630}$  и долей ( $r=0,81$ ;  $p=0,009$ ) микроколоний размером от 1000 до 10000 мкм<sup>2</sup>.

Известно, что адгезия микроорганизмов зависит не только от свойств поверхности стекла или полистирола, но и свойств самой микробной клетки. Как правило, бактерии с гидрофобными свойствами активнее формируют биопленки на поверхности из гидрофобных материалов, а бактерии с гидрофильными свойствами на поверхности из гидрофильных материалов [4, 7]. При этом разная способность клинических штаммов к формированию биопленки может свидетельствовать о различиях в их вирулентных свойствах [5].

### Заключение

Проведенное исследование позволило получить качественно новую информацию о способности клинических штаммов формировать биопленки. Так, сравнительный анализ количественных данных, показал, что наиболее выраженной способностью к образованию биопленки как на поверхности полистирола, обладающей гидрофобными свойствами, так и на поверхности стекла, имеющей гидрофильные свойства, обладали штаммы *S.epidermidis*. Менее интенсивно формировали биопленку на поверхности стекла штаммы *E.coli*, у штам-

мов MRSE отмечена слабая способность к формированию биопленки на поверхности полистирола.

Наличие корреляционных взаимосвязей между анализируемыми показателями позволяет предположить, микроколонии какого размера и в каком количестве определяют величину показателя оптической плотности красителя в лунках полистироловых планшетов, что свидетельствует о возможности использования количественного анализа микроколоний на поверхности покровного стекла в качестве дополнительного теста для оценки способности бактерий к формированию биопленок и их характеристики.

### Список литературы

1. Божкова С.А. Современные принципы диагностики и антибактериальной терапии инфекции протезированных суставов (обзор литературы) // Травматология и ортопедия России. – 2011. – № 3 (61). – С. 126-136.
2. Гайдышев И.П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++. – СПб.: ВХВ Петербург, 2004. – 505 с.
3. Крюков А.И., Товмасын А.С., Драбкина И.В. и др. Роль микрофлоры в этиологии хронического тонзиллита // Вестник оториноларингологии. – 2010. – № 3. – С. 4-6.
4. Леонов В.В. Количественная оценка способности условно-патогенных микроорганизмов к образованию биопленки в эксперименте // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 10. – С. 57-59.
5. Романова Ю.М., Диденко Л.В., Толордава Э.Р. и др. Биопленки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками // Вестник РАМН. – 2011. – № 10. – С. 31-39.
6. Чеботарь И.В., Таланин Е.А., Кончакова Е.Д. Новый метод количественного учета кокков в надклеточных образованиях – кластерах и биопленке // СТМ. – 2010. – № 3. – С. 14-17.
7. Cerca N., Pier G.B., Vilanova M. et al. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* // Res Microbiol. – May 2005. – Vol. 156, № 4. – P. 506-514.
8. O'Toole G.F., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // Mol. Microbiol. – 1998. – № 30. – P. 295-304.
9. Singh R., Rohilla R.K., Sangwan K. et al. Bladder management methods and urological complications in spinal cord injury patients // Indian J Orthop. – Mar 2011. – Vol. 45, № 2. – P. 141-147.
10. Stepanovic S., Vukovi ć D., Jezek P. et al. Influence of dynamic conditions on biofilm formation by staphylococci // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2001. – № 20. – P. 502-504.