

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 579.22.017.3

Е.В. Анганова<sup>1,4</sup>, Е.Д. Савилов<sup>1,4</sup>, О.А. Ушкарева<sup>2</sup>, А.М. Аблов<sup>3</sup>, А.В. Духанина<sup>1</sup>

### СПОСОБНОСТЬ ПАТОГЕННЫХ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ К ФОРМИРОВАНИЮ БИОПЛЕНОК

<sup>1</sup> Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека (Иркутск)<sup>2</sup> Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Саха (Якутия) (Якутск)<sup>3</sup> Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория (Иркутск)<sup>4</sup> Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования (Иркутск)

Большинство исследованных возбудителей кишечных инфекций способны к формированию биопленок (*Salmonella* spp. – 84,2 %; *Shigella* spp. – 90,0 %; патогенные *E. coli* – 75,0 %; условно-патогенные энтеробактерии, изолированные от людей с кишечными инфекциями – 100,0 %, изолированные от больных животных – 83,3 %). У изученных микроорганизмов в условиях культивирования при температуре 37 °С, по сравнению с более низкой температурой (24 °С), наблюдалось более активное формирование биопленочных сообществ.

**Ключевые слова:** бактериальные биопленки, степень биопленкообразования, условно-патогенные энтеробактерии, шигеллы, сальмонеллы, патогенные эшерихии, возбудители кишечных инфекций

### ABILITY OF PATHOGENIC AND OPPORTUNISTIC PATHOGENIC ENTEROBACTERIACEAE TO THE FORMATION OF BIOFILMS

E.V. Anganova<sup>1,4</sup>, E.D. Savilov<sup>1,4</sup>, O.A. Ushkareva<sup>2</sup>, A.M. Ablov<sup>3</sup>, A.V. Dukhanina<sup>1</sup><sup>1</sup> Scientific Center for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk<sup>2</sup> Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Sakha (Yakutia), Yakutsk<sup>3</sup> Irkutsk Interregional Veterinary Laboratory, Irkutsk<sup>4</sup> Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk

The most of studied pathogens of intestinal infections are capable of forming biofilms (*Salmonella* spp. – 84,2 %; *Shigella* spp. – 90,0 %; pathogenic *E. coli* – 75,0 %; opportunistic Enterobacteriaceae isolated from people with intestinal infections – 100,0 %, isolated from diseased animals – 83,3 %). More active formation of biofilms in studied microorganisms was detected in conditions of cultivation at 37 °C, in comparison with lower temperatures (24 °C).

**Key words:** bacterial biofilms, degree of biofilm formation, opportunistic Enterobacteriaceae, *Shigella*, *Salmonella*, pathogenic *Escherichia*, enteric pathogens

#### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время биопленки находятся в фокусе особого внимания, что связано с возросшим объемом информации, касающейся роли данной организации микроорганизмов при инфекционных заболеваниях человека [1, 3]. Н.В. Белобородова [2], И.В. Чеботарь с соавт. [9] и другие авторы подчеркивают, что в ближайшее время мишенью для воздействия на инфекционный и микробный процессы станут не только сами бактерии, но также и микробные биопленки, т. к. биопленочные сообщества обеспечивают бактериям большую устойчивость к неблагоприятным факторам воздействия. Особое практическое значение имеет определение степени способности микроорганизмов образовывать биопленки [4].

**Цель исследования:** изучение биопленкообразования у патогенных и условно-патогенных энтеробактерий, выделенных от человека и животных при кишечных инфекциях.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биопленкообразование определяли у культур, выделенных из испражнений, поступивших на исследование в бактериологические лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Саха (Якутия)». Всего исследовано 63 штамма бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, в т. ч. условно-патогенные энтеробактерии (УПЭ) – 34 (*Proteus mirabilis* – 3, *Klebsiella oxytoca* – 3, *K. pneumoniae* – 15, *Citrobacter freundii* – 8, *Enterobacter aerogenes* – 2, *E. cloacae* – 2, *Morganella morganii* – 1), патогены – 29 (*Salmonella typhimurium* – 2, *S. enteritidis* – 17, *Shigella flexneri* 2a – 5, *S. sonnei* – 5). Также исследовали 14 изолятов, выделенных от животных на базе Иркутской межобластной ветеринарной лаборатории, из них патогенные *E. coli* – 8 (O4 – 1; O20 – 2; O141 – 1; O15 – 2; O8 – 2), условно-патогенные энтеробактерии – 6 (*P. vulgaris* – 2, *P. mirabilis* – 2, *P. rettgeri* – 1, *C. Freundii* – 1). Идентификация микроорганизмов проводилась методами традиционной таксономии с учетом морфо-

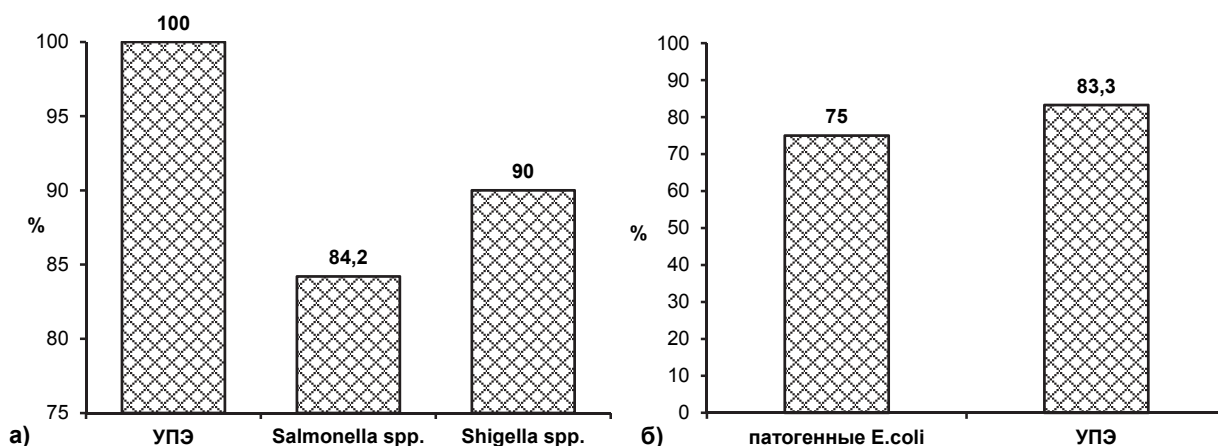


Рис. 1. Способность патогенных и условно-патогенных энтеробактерий, возбудителей кишечных инфекций к образованию биопленок: а – изоляты от человека; б – изоляты от животных.

логических, культуральных, биохимических и антигенных свойств, согласно существующим методикам [5, 6, 7]. Образование биопленок изучали с помощью определения способности штаммов энтеробактерий к адгезии на поверхности 96-луночной полистироловой панели [10]. Микроорганизмы культивировали на мясо-пептонном бульоне (МПБ) при двух температурах (24 ° и 37 °С) в течение 48 ч. Из лунок панели удаляли планктонные клетки и окрашивали пленки. Для этого в лунку вносили 150,0 мкл дистиллированной воды и 20,0 мкл 1% кристаллвиолета и инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре. После трехкратного промывания дистиллированной водой в лунки для экстракции краски из пленки добавляли 200,0 мкл 96% этанола и измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 492 нм. Интенсивность окрашивания содержимого лунок соответствовала степени пленкообразования. Количественным выражением степени образования биопленок служили значения оптической плотности (ОП), измеряемые на спектрофотометре. Значимость различий полученных показателей определяли по критерию Стьюдента [8].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Свойство биопленкообразования было выявлено у подавляющего большинства протестированных изолятов. Условно-патогенные энтеробактерии, изолированные от людей с острыми кишечными инфекциями, в 100 % случаев обладали способностью к формированию биопленочных сообществ; среди шигелл и сальмонелл данное свойство выявлено в 90,0 % и 84,2 % случаев соответственно. Также высокой оказалась частота встречаемости биопленкообразования у энтеробактерий, изолированных от больных животных (рис. 1).

Следует отметить влияние температуры на биопленкообразование бактерий. При культивировании при более низкой температуре способность штаммов энтеробактерий образовывать биопленки снижалась. Установлено, что у энтеробактерий, выделенных от больных с кишечными инфекциями, формирование

биопленок более активно идет при температуре 37 °С, по сравнению с таковым при температуре 24 °С. Так, при температуре 24 °С способность формировать биопленки выявлена у 60,3 % штаммов микроорганизмов, при 37 °С – у 93,6 % изолятов. Различия носили значимый характер ( $p < 0,05$ ). Данная закономерность выявлена как в отношении условно-патогенных энтеробактерий, так и в отношении патогенов-бактерий родов *Salmonella* и *Shigella* (рис. 2).

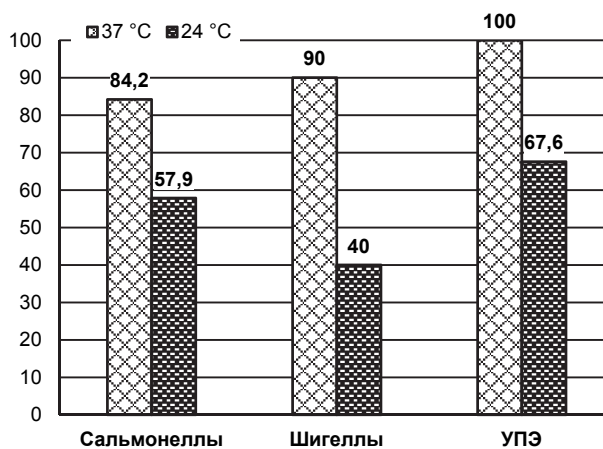


Рис. 2. Способность шигелл, сальмонелл и условно-патогенных энтеробактерий формировать биопленки при разных температурах культивирования (%).

Условно-патогенные энтеробактерии при температуре 37 °С формировали биопленки во всех случаях, при снижении температуры их способность к пленкообразованию уменьшилась до 67,6 % ( $p < 0,01$ ). Бактерии рода *Salmonella* в условиях 37 °С были способны к биопленкообразованию в 84,2 % случаев, в условиях 24 °С – только в 57,9 % случаев. Культивирование представителей рода *Shigella* при снижении температуры также привело к уменьшению ( $p < 0,05$ ) встречаемости изолятов, способных формировать биопленки (с 90,0 % до 40,0 % соответственно).

Сравнение плотности пленкообразования при культивировании в разных температурных условиях показало, что при более высокой температуре (37 °С)

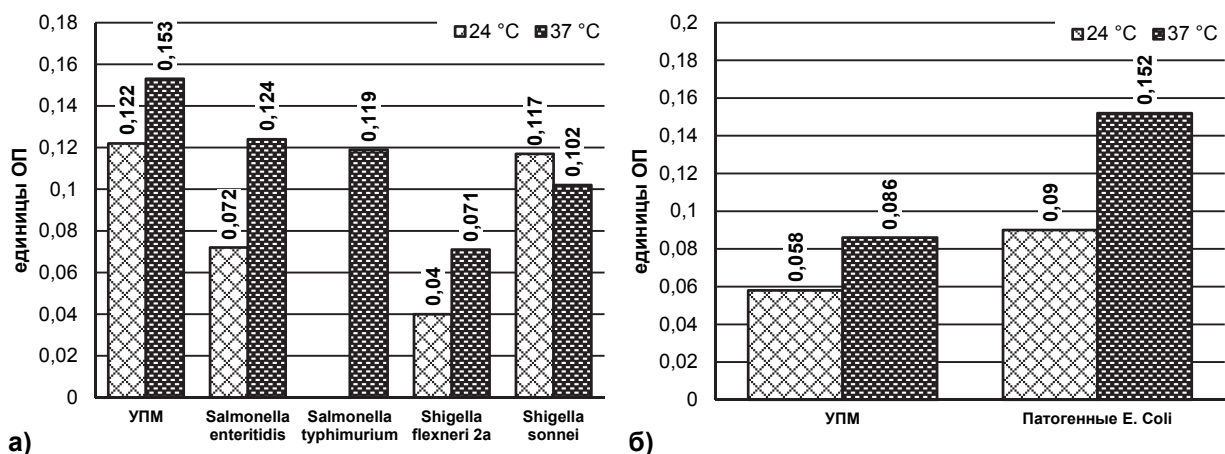


Рис. 3. Плотность пленкообразования энтеробактерий при разных температурах культивирования: а – изоляты от человека; б – изоляты от животных.

уровень адсорбции кристалвиолета этанолом был выше, чем при 24 °C. Превышение оптической плотности пленкообразования в условиях культивирования при температуре 37 °C, по сравнению с более низкой температурой, было отмечено в отношении большинства протестированных штаммов (рис. 3).

Сравнение различных представителей энтеробактерий по степени биопленкообразования показало, что условно-патогенные энтеробактерии, выделенные от людей с кишечными инфекциями, характеризовались более высоким уровнем адсорбции кристалвиолета этанолом, по сравнению с *Salmonella spp.* и *Shigella spp.* Низкая степень пленкообразования была отмечена у *Shigella flexneri* 2a: 0,04 единиц ОП при температуре 24 °C и 0,071 единиц ОП при температуре 37 °C. Патогенные *E. coli*, изолированные от животных с колибактериозами, характеризовались высокой плотностью биопленки при культивировании при 37 °C (0,152 единиц ОП).

Таким образом, проведенные исследования показали, что большинство исследованных возбудителей кишечных инфекций, изолированных от человека и животных, способны к образованию биопленок. У протестированных микроорганизмов более активное формирование биопленочных сообществ наблюдалось в условиях культивирования при температуре 37 °C, по сравнению с более низкой температурой (24 °C). Наиболее высокая плотность биопленок была выявлена в условиях культивирования при 37 °C среди условно-патогенных энтеробактерий, изолированных от людей с кишечными инфекциями, и патогенных *E. coli*, выделенных от животных при колибактериозах.

#### ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Анганова Е.В. Условно-патогенные энтеробактерии: доминирующие популяции, биологические свойства, медико-экологическая значимость: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Иркутск, 2012. – 46 с.
2. Анганова Е.В. Opportunistic pathogenic Enterobacteriaceae: dominant populations, biological features, medico-ecological relevance: Abstract of dissertation

of Doctor of Biological Sciences. – Irkutsk, 2012. – 46 p. (in Russian)

2. Белобородова Н.В. Клиническое значение микробных биопленок [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.internist.ru>.

Beloborodova N.V. Clinical relevance of microbial biofilms [Digital Source]. – On-line access: <http://www.internist.ru>. (in Russian)

3. Голуб А.В. Бактериальные биопленки – новая цель терапии? // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 23–29.

Golub A.V. Bacterial biofilms – new aim of therapy? // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. – 2012. – Vol. 14, N 1. – P. 23–29. (in Russian)

4. Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В. Проблемы в медицине, связанные с бактериальными биопленками // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 4. – С. 268–275.

Lyamin A.V., Botkin E.A., Zhestkov A.V. Problems in medicine connected with bacterial biofilms // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. – 2012. – Vol. 14, N 4. – P. 268–275. (in Russian)

5. Определитель бактерий Берджи: в 2-х т. Пер. с англ. / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли, С. Уилльямса. – М.: Мир, 1997. – Т. 1. – 432 с.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology: in 2 volumes. Transl. from the Engl. / Ed. by J. Holt, N. Krieg, P. Sneath, J. Staley, S. Williams. – Moscow: Mir, 1997. – Vol. 1. – 432 p. (in Russian)

6. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: Приказ МЗ СССР № 535 от 22.04.1985.

To the standardization of microbiological (bacteriological) methods of research used in clinicodiagnostic laboratories of medical preventive institutions: Order of Ministry of Health of the USSR N 535 d.d. 22.04.1985. (in Russian)

7. Руководство по медицинской микробиологии / Под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой. – М.: БИНОМ, 2013. – 752 с.

Manual on the medical microbiology / Ed. by A.S. Labinskaya, N.N. Kostyukova. – Moscow: BINOM, 2013. – 752 p. (in Russian)

8. Савилов Е.Д., Астафьев В.А., Жданова С.Н., Заруднев Е.А. Эпидемиологический анализ: методы статистической обработки материала. – Новосибирск: Наука-Центр, 2011. – 156 с.

Savilov E.D., Astafjev V.A., Zhdanova S.N., Zarudnev E.A. Epidemiological analysis: methods of statistical data processing. – Novosibirsk: Nauka-Centr, 2011. – 156 p. (in Russian)

9. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В. и др. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 51–58.

Chebotar I.V., Mayanskiy A.N., Konchakova E.D., Lazareva A.V. et al. Antibiotic resistance of biofilm bacteria // Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. – 2012. – Vol. 14, N 1. – P. 51–58. (in Russian)

10. O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development // Ann. Rev. Microbiol. – 2000. – Vol. 54. – P. 49–79.

#### Сведения об авторах

**Анганова Елена Витальевна** – доктор биологических наук, профессор кафедры эпидемиологии и микробиологии Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования, старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально значимых инфекций Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (664025, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 3; тел.: 8 (3952) 33-34-25; e-mail: eva.irk@mail.ru)

**Савилов Евгений Дмитриевич** – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально значимых инфекций Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, заведующий кафедрой эпидемиологии и микробиологии Иркутской государственной медицинской академии последипломного образования (e-mail: savilov47@gmail.com)

**Ушкарева Ольга Антоновна** – главный врач Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Саха (Якутия) (677005, г. Якутск, ул. Петра Алексеева, 60/2; тел.: 8 (4112) 22-63-70; e-mail: fguz@fguz-sakha.tu)

**Аблов Александр Михайлович** – заместитель директора Иркутской межобластной ветеринарной лаборатории (664005, г. Иркутск, ул. Боткина, 4; тел.: 8 (3952) 38-91-09, e-mail: imvl2004@mail.ru)

**Духанина Алла Владимировна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально значимых инфекций Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека (e-mail: duhanina.alla@yandex.ru)

#### Information about the authors

**Anganova Elena Vitaljevna** – Doctor of Biological Sciences, Professor of the Department of Epidemiology and Microbiology of Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Senior Research Officer of the Laboratory of Epidemiologically and Socially Significant Infections of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (Karl Marks str., 3, Irkutsk, 664025; tel.: +7 (3952) 33-34-25; e-mail: eva.irk@mail.ru)

**Savilov Yevgeny Dmitrievich** – Doctor of Medical Sciences, Professor, Chief Research Officer of the Laboratory of Epidemiologically and Socially Significant Infections of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Head of the Department of Epidemiology and Microbiology of Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education (e-mail: savilov47@gmail.com)

**Ushkareva Olga Antonovna** – Head Physician of the Center for Hygiene and Epidemiology in the Republic of Sakha (Yakutia) (Petra Alekseeva str., 60/2, Yakutsk, 677005; tel.: +7 (4112) 22-63-70; e-mail: fguz@fguz-sakha.tu)

**Ablov Alexander Mikhaylovich** – Deputy Director of Irkutsk Interregional Veterinary Laboratory (Botkina str., 4, Irkutsk, 664005; tel.: +7 (3952) 38-91-09; e-mail: imvl2004@mail.ru)

**Dukhanina Alla Vladimirovna** – Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of the Laboratory of Epidemiologically and Socially Significant Infections of Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (e-mail: duhanina.alla@yandex.ru)