

ГОСПИТАЛЬНАЯ МИКРОФЛОРА И БИОПЛЕНКИ

Габриэлян Н.И., Горская Е.М., Романова Н.И., Цирульникова О.М.

ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова»
Минздрава России, г. Москва

В обзоре изложены данные литературы о значении образования биопленок условнопатогенными бактериями в хирургии. Представлены сведения о микробном составе биопленок, архитектуре и физиологии. Обращено внимание на значение микробных сообществ, образующих биопленки, в хирургии. Разбираются механизмы повышенной резистентности биопленочных бактерий по сравнению с планктонными. Приводятся данные литературы о процессах образования биопленок на внутрисосудистых катетерах и методы их ингибиции и протекции. Излагаются методы изучения образования и подавления биопленок *in vitro* и *in vivo* на медицинских устройствах. Обсуждаются различные биотехнологические приемы, основанные на использовании антиадгезивных, антисептических, биофизических средств и биопрепаратов, которые будут способствовать снижению и предупреждению инфекционных осложнений в хирургии и в трансплантологии.

Ключевые слова: микробные биопленки, хирургия, инвазивные устройства, антибиотикорезистентность.

NOSOCOMIAL INFECTION AND MICROBIAL BIOFILMS IN SURGERY

Gabrielyan N.I., Gorskaya E.M., Romanova N.I., Tsiurulnikova O.M.

Academician V.I. Schumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow

The review presents data on the role of biofilms formation by opportunistic microbes in surgery. It gives information about the microbial structure of biofilms, their architecture and physiology. The attention was paid to significant importance of microbial communities, which form biofilms in surgery. Mechanisms of increased resistance of biofilms bacteria are compared with plankton. The review includes literature data on the process of formation biofilms on intravascular catheters and methods of inhibition and protection. Methods of studying formation and inhibition of biofilms *in vitro* and *in vivo* are presented. Different biotechnology methods, based on using antiadhesive, antiseptic, biophysical resources and biomaterials are discussed.

Key words: microbial biofilms, surgery, invasive devices, resistance to antibiotics.

ВВЕДЕНИЕ

Существенное снижение эффективности антибактериальной терапии, наблюдаемое практически во всех областях клинической медицины, и значительное увеличение количества хронических инфекций, вызванных антибиотикорезистентной бактериальной популяцией, определяет настоятельную необходимость разработки новых альтернативных средств ингибиции и элиминации микроорганизмов, обладающих множественной резистентностью к антибактериальным препаратам. Несомненную значимость указанная проблема приобретает для

хирургических стационаров, и прежде всего, связанных с проведением высокотехнологичных операций. Среди перспективных научных направлений решения проблемы наиболее значимым представляется направление, связанное с углубленным изучением функциональных, биохимических, морфологических и иных свойств микроорганизмов, обладающих толерантностью к лекарственным препаратам. Публикации последних лет содержат углубленные сведения, касающиеся характера и свойств микроорганизмов, находящихся как в обычной, как правило, хорошо изученной планктонной форме,

Статья поступила в редакцию 22.06.12 г.

Контакты: Горская Елена Михайловна, д. м. н., ст. научный сотрудник бактериологической лаборатории.

Тел. 8-905-519-09-31, e-mail: egorskaya@mail.ru

так и существующих в виде микробных сообществ – микробных биопленок. К настоящему времени известно достаточное количество фактов, свидетельствующих в пользу того, что эффект множественной резистентности микрофлоры к стрессорным воздействиям и в частности низкая чувствительность к антибактериальным препаратам связаны прежде всего с существованием микрофлоры в виде биопленок, микробных популяций или микробного консорциума. Огромный научный и практический интерес к пленкообразующей способности микроорганизмов объясняет прогрессию роста научных исследований по данной проблеме, которые, начиная с 2009 г., докладываются на международных конгрессах и широко публикуются в научной литературе. Учитывая, что количественные параметры биопленочной активности микроорганизмов могут значительно варьировать, представляется важным получение углубленных знаний о стадиоспецифической физиологии микроорганизмов, а также данных, касающихся оценки характера, свойств и особенностей образования биопленок, характерных для представителей госпитальной флоры.

Биопленки как способ существования микробных популяций. Биопленки микроорганизмов образуются на биотических и абиотических поверхностях. Согласно современным представлениям, биопленки, приоритет изучения которых принадлежит ZoBell, работавшему с микроорганизмами, выделенными из морской воды, представляют собой преобладающий способ жизни микробов в природе и искусственно созданных условиях, в том числе в госпитальных или внутрибольничных условиях [40]. К настоящему времени биопленка рассматривается в качестве многоклеточного организма с определенным циклом развития. Опубликованы работы, детально описывающие состав и свойства микробных сообществ. Биопленка характеризуется кооперативным поведением составляющих ее особей, которое координируется quorum sensing системой (QS), основанной на продукции сигнальных молекул или аутоиндукторов и способности микробов воспринимать эти сигналы. Индукторы QS представляют малые молекулы – феромоны или гормоноподобные соединения. Они описаны при изучении пленок, образованных популяциями микроорганизмов различного вида – *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Yersinia enterocolitica* и многих других [3, 5, 24, 27, 39]. Показано, что QS-система кодирует факторы вирулентности, деление клеток и их подвижность. Аутоиндукторы биопленки позволяют также мониторировать окружение, результатом чего является возможность модифицировать гены экспрессии, приобретая конкурентные преимущества, необходимые для выживания данной популяции [23, 26, 39]. Изучена последо-

вательность основных этапов пленкообразования. Практически хорошо описаны такие этапы, как адгезия бактерий к поверхности, формирование микроколоний, процесс продукции полисахаридов и других внеклеточных метаболитов. В дальнейшем в жизненном цикле биопленочных микроорганизмов в качестве обязательных присутствуют процессы, характерные для созревания биопленки, и процессы, типичные для зрелой биопленки. Зрелая биопленка представляет «цитадель» – структуру типа гриба, с каналами, подобными капиллярам, пространственно-временными взаимоотношениями между клетками и матриксом и синергической метаболической кооперацией. Матрикс биопленки является ретикулярной структурой, состоящей из полисахаридов, экстрацеллюлярной ДНК, белков и солей. Биопленки растут, созревают и становятся видимыми макроскопически. Клеточная плотность биопленки может составлять 10^4 – 10^8 кл/см². В отличие от планктонных клеток биопленка имеет другой фенотип, заключающийся в изменении параметров роста и экспрессии специфических генов. Функционально планктонные клетки определяют возможности микрофлоры в процессах диссеминации и колонизации новых ниш. Образование и созревание собственно биопленки – это последующий цикл жизнедеятельности микрофлоры. Так, в биопленке *Pseudomonas aeruginosa* в процессе созревания изменяются подвижность микробов, продукция альгината и другие характеристики [35]. Когда планктонные клетки были сравнены с клетками биопленки в поздней стадии созревания, оказалось, что более 800 белков имеют шестикратное изменение уровня экспрессии (около 50% протеома) [39]. Важно отметить, что биопленочный консорциум может состоять из одного или многих видов микроорганизмов [12]. Кроме того, в составе биопленок помимо бактерий могут присутствовать в различных сочетаниях грибы и простейшие. По мере жизнедеятельности биопленки планктонные клетки, находящиеся в ее глубоких слоях, отделяются и путем транслокации колонизируют новые, в частности еще интактные, поверхности.

Безусловно, что важнейшим свойством биопленок является их устойчивость к любому виду стресса, которая объясняется следствием высокой активности метаболических процессов, характерной для биопленок, по сравнению с планктонными клетками. Среди изученных повреждающих факторов описаны такие, как воздействие дезинфектантов, антибиотиков и других химиопрепаратов, влияние температурных колебаний, а также эндогенных факторов макроорганизма – антител, комплемента и др. [3, 23, 37, 38].

Согласно данным литературы и результатам собственных исследований, различные группы госпи-

тальных микроорганизмов обладают существенно различающейся способностью к образованию пленок. Из исследованных нами штаммов госпитальных микроорганизмов (*Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, *CNS*, *Enterococcus spp.*) наилучшая способность к пленкообразованию выявлена у неферментирующих микроорганизмов рода *Acinetobacter spp.* Показано, что наиболее значимая способность к пленкообразованию обнаружена у штаммов, изолированных из бронхоальвеолярного лаважа, сосудистых катетеров и ран. Кроме того, высокие показатели пленкообразования выявлены у коагулазоотрицательных стафилококков (*CNS*), изолированных из объектов внешней среды и кожи пациентов, находящихся на момент обследования в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) [8].

Синегнойная палочка (*P. aeruginosa*) представляет угрозу практически для всех хирургических стационаров ввиду тяжести вызываемых ею инфекционных осложнений и множественной резистентности к антибактериальным препаратам. Представлен анализ активности образования биопленок 148 госпитальными штаммами *P. aeruginosa*, выделенными от пациентов хирургических, акушерского и детского стационаров [7]. Исследование проводили, используя планшетный метод. Наибольшая способность к пленкообразованию (61,2%) отмечена у штаммов *P. aeruginosa*, изолированных от пациентов ОРИТ.

Инфекционно-воспалительные процессы и биопленки. Согласно современным позициям, многие процессы, связанные с жизнедеятельностью микроорганизмов, определяются свойствами микробов, существующих именно в составе биопленок [9, 28, 38]. В исследованиях Costerton и его сотрудников постулирована важная роль биопленочных микроорганизмов в различных биологических процессах, в том числе в этиологии инфекционных заболеваний человека [23]. Опубликованы данные, согласно которым развитие инфекционной патологии при различных нозологических формах заболеваний может быть связано с микрофлорой, существующей в биопленочном матриксе.

В табл. 1 представлены примеры патологических процессов, развитие которых ассоциировано с микробными биопленками. Считается, что инфекции билиарного тракта, эндокардиты, инфекции, связанные с перитонеальным диализом, следует рассматривать как биопленочные инфекции. Контаминация внутренних сред организма госпитальной флорой с возможностью последующего развития инфекционного процесса с достаточной степенью вероятности связана с проведением инвазивных, диагностических и лечебных манипуляций, установки различного вида медицинской аппаратуры и специальных устройств, сосудистых, мочевых и иных катетеров. Будут иметь опасность инфекции после введения эндотрахеальных трубок, артериовенозных

Таблица 1

Патологические процессы, ассоциированные с микробными биопленками

Инфекционное заболевание или патологический процесс	Микробы-возбудители, способные к формированию биопленок
Инфекции костно-мышечной системы	<i>Staphylococcus spp.</i>
Некротизирующие фасцииты	<i>Staphylococcus</i> группы А
Инфекции билиарного тракта	<i>Enterobacteriaceae</i>
Остеомиелиты	Различные виды бактерий и грибов
Бактериальные простатиты	<i>E.coli</i> и др. грамотриц. бактерии
Эндокардиты	Различные группы стрептококков
Кистозно-фиброзная пневмония	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>
Мелиоидозы	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Внутрибольничные инфекции	Грамотриц. палочки и некоторые др. микробы
Пневмонии, вызванные различными возбудителями, в отделениях интенсивной терапии	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Инфекция хирургических швов	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i>
Артериовенозные шунты	Грамположит. кокки
Катетерные циститы мочеполовой системы	Множество бактерий и грибы
Диализные перитониты	<i>Actinomyces israelii</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
Эндотрахеальные трубки	<i>S. epidermidis</i> , <i>Candida albicans</i>
Хикман-катетеры	<i>S. epidermidis</i> и др.
Центральные венозные катетеры	<i>S. epidermidis</i> и др.
Искусственные сосуды сердца и клапаны	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>
Сосудистые имплантаты	Грамположит. кокки
Билиарные эндопротезы	Множество бактерий и грибы
Ортопедические протезы	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i>

шунтов, катетеров мочеполовой системы [30, 31, 34, 40]. Использование внутрисосудистых катетеров, необходимых для лечебных и диагностических целей, может привести к увеличению риска катетер-ассоциированных инфекций (КАИ), патогенез которых связан с образованием микробных биопленок. В таких случаях имеет место как высокая частота КАИ, так и увеличение стоимости риска неблагоприятного прогноза лечения [29]. Один из путей образования катетерных микробных биопленок связан с проникновением микрофлоры с кожи пациента, контаминацией, колонизацией и последующим образованием полимерного экзополисахаридного матрикса на внутренней поверхности катетеров. Процесс образования биопленки сложный и зависит от многих факторов – таких, как материал катетера, гидродинамические условия, физические и химические свойства жидкости при контакте с катетером, свойства микробных клеток. Микробы преобладают на наружной поверхности катетера при нахождении его в организме <10 дней и на внутренней – при длительности >10 дней. Биопленки обладают высокой резистентностью к антимикробным препаратам и активно продуцируют пирогенные субстанции [30]. При исследовании внутрисосудистых катетеров обнаружены биопленки в виде моноплёнок или коагрегатов, содержащих несколько видов микроорганизмов. Состав микробных ассоциаций, обнаруживаемых в биопленках, может существенно влиять на их толерантность к антибиотикам. Показано, что бета-лактамазоположительный штамм *Moraxella catarrhalis* снижает чувствительность *S. pneumoniae* к бета-лактамам АБ при росте их обоих в биопленке [19]. Сходный протективный эффект был показан в смешанной бактериально-грибковой ассоциации, состоящей из *S. epidermidis* и *Candida albicans*. Стафилококковый экзополимер защищал клетки грибов от антифунгальных препаратов (азолов). В то же время дрожжеподобные грибы снизили активность ванкомицина против бактерий [33]. Кроме того, немикробные компоненты хозяина, такие как эритроциты и фибрин, могут скапливаться в катетер-ассоциированной биопленке и препятствовать диффузии антимикробных агентов в структуру пленки.

Наличие бактерий, прикрепившихся к поверхности биомедицинских изделий, и формирование в организме бактериальной биопленки может привести к воспалительному процессу с участием макрофагов, лимфоцитов, пролиферации соединительной ткани, накоплению матриксных протеинов, нарушению микроциркуляции. Отрыв биопленки может сопровождаться метастазированием возбудителя в системный кровоток и эмболией сосудов. Многолетний опыт применения контрпульсации и обхода желудочков сердца в нашем Центре показал, что

инфекционные осложнения чаще регистрируются у больных с обходом желудочков и искусственного сердца [2]. Возбудителями ИО чаще всего являлись эпидермальные стафилококки (39%), затем синегнойные палочки (23%) и энтерококки (12%). Доминирующие места локализации инфекции – кровь, места введения баллончикового зонда, соединительные магистрали. Полимерную поверхность насосов крови колонизируют микробы, устойчивые к действию АБ, что многократно подтверждалось данными антибиотикограмм. В последующем могли развиваться такие серьезные осложнения, как «эндокардит» насоса. Актуальной задачей остается совершенствование биоматериалов, контактирующих с кровью, применение антибактериальных покрытий и других мер по предотвращению адгезии и колонизации микроорганизмами устройств механической поддержки кровообращения.

В последние годы стало понятно, что благодаря QS биопленки патогенных и условно-патогенных микробов преодолевают механизмы защиты хозяина и проявляют иммуномодулирующее действие отрицательной направленности, приводящее к серьезному повреждению тканей хозяина. Представлено удивительное доказательство, что аутоиндукторы не только контролируют гены экспрессии в бактериях, но и подобные гены в клетках млекопитающих. Иммуномодуляция патологической направленности включает модуляцию провоспалительных цитокинов, фагоцитоз и индукцию апоптоза. Некоторые эти события, как указывалось, оказывают разрушительное действие на иммунный ответ хозяина [40].

Биопленочные микроорганизмы и антибиотики. Характерным для микроорганизмов, существующих в составе биопленок, в отличие от планктонных клеток является высокая толерантность, несмотря на однотипность реализующих механизмов, к различным группам антибиотиков. Одним из объясняющих факторов является наличие в биопленках персистеров – особых персистирующих форм бактерий. Персистеры находятся в состоянии анабиоза. Это покоящиеся клетки, у которых отмечается блокировка метаболических путей. Таким образом, значительное торможение метаболической активности в таких клетках-персистерах определяет их нечувствительность к действию антибиотиков.

Множественную резистентность микрофлоры, находящейся в составе биопленки, также связывают с эффектом фильтрующей способности экзополисахаридного матрикса. Матрикс биопленок связывает клетки в единую фильтрующую систему, которую называют «молекулярным фильтром». Своеобразный фильтр замедляет проникновение антибиотиков внутрь биопленок. Эта способность рассматривается как одна из важнейших функций биопленок, определяющая жизнеспособность микробной по-

пуляции [32]. Так, глицерол-фосфорилированные бета-глюканы синегнойной палочки не только замедляют диффузию аминокликозидов в пленку, но и активно связывают антибиотики. Слизистые полисахариды, выделенные из биопленок эпидермального стафилококка, и слизистый матрикс эпидермального и золотистого стафилококка снижали антибактериальный эффект ванкомицина и тейкопланина и бета-лактамов (оксациллина, цефотаксима). Бактерии биопленки способны выживать при воздействии антибактериальных соединений в таких высоких концентрациях, которые не могут быть достигнуты в организме человека при стандартных дозировках [30]. В обзоре [11] приводятся некоторые конкретные данные экспериментальных исследований, подтверждающие это положение. В то же время, исходя из имеющихся данных, следует указать на неоднозначность этих процессов. Так, в экспериментальных работах Dunne et al. показано, что в ряде экспериментов слизистый матрикс эпидермального стафилококка не препятствовал перфузии ванкомицина и рифампицина сквозь биопленку [32]. Значимым является предположение, что результат взаимодействия матрикса и антибиотика зависит не только от типа антибактериального препарата и штаммовых особенностей бактерий, входящих в состав биопленки, но и от химического состава и архитектуры матрикса. Характерной особенностью состава матрикса пленок, существующих в различных биотопах организма пациента, является наличие субстанций организма хозяина, фибрина и других белков крови, клеточных дериватов. В работе Donlan показано, что в биопленке имплантата, содержащей культуру стафилококков, присутствуют не только микробные клетки, фибриллярные и пленчатые структуры, но и компоненты немикробного происхождения [30]. Считается, что низкая восприимчивость биопленочных бактерий к агрессивным воздействиям ассоциирована с различными показателями, такими как QS-сигналы, параметры мутабельности бактерий и многими другими, специфичными для различных

изученных к настоящему времени популяций. Так, определяющим для штаммов *P. aeruginosa* является недостаток кислорода, для изолятов *Klebsiella pneumoniae* – ограничение питательных веществ, для *S. aureus* – состав микроокружения. Детали функционирования биопленок стали известны с применением сканирующей электронной и конфокальной микроскопии.

В табл. 2 приведены некоторые из возможных механизмов формирования устойчивости биопленочных микроорганизмов к антибиотикам.

Таким образом, как следует из анализа опубликованных в доступной нам литературе данных, генез резистентности биопленочных бактерий к антибиотикам определяется как известными, характерными для планктонных форм бактерий, так и специфическими вариантами резистентности, формирование которых характерно для биопленочных ассоциаций.

Основываясь на том, что именно биопленки являются основным способом существования микроорганизмов, к настоящему времени уже не может считаться достаточным стандартный метод определения антибиотикочувствительности, в котором оценивается резистентность планктонных форм. Публикуются новые оригинальные способы определения антибиотикочувствительности в биопленках, но это выходит за целевые рамки статьи.

Пути и способы преодоления эффектов пленкообразования. Для клинической практики определяющее значение имеют разработки технологий для предупреждения и лечения инфекционно-воспалительных процессов, патогенез которых связан с формированием микробных биопленок. В табл. 3 приведены данные о технологиях, использование которых может способствовать снижению или предотвращению пленкообразования.

Важным для проблемы являются данные, согласно которым в составе биопленки обнаружены микробы, в силу своей дифференцировки находящиеся в состоянии множественной устойчивости ко всем известным препаратам [37]. Это уже упоминавшиеся персистеры. Показано, что в матриксе

Таблица 2

Примеры различных типов антибиотикорезистентности у биопленочных бактерий [11]

Тип устойчивости к антибиотикам	Биопленочная бактерия	Биохимический механизм устойчивости
Модификация мишени действия	<i>Staphylococcus aureus</i>	Мутации, которые ведут к структурным изменениям ДНК-зависимой РНК-полимеразы – основной мишени рифампицина
Инактивация антибиотика	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Инактивация бета-лактамовых антибиотиков за счет продукции бета-лактамаз
Активное выведение антибиотика из микробной клетки (эффлюкс)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Гиперэкспрессия <i>MexCD-OprJ</i> эффлюкс-помпы

Таблица 3

Технологии снижения или предотвращения пленкообразования [31]

Ингредиенты	Механизм действия	Потенциальное применение	Валидация в клинических исследованиях
Хелатирующие агенты	Антимикробный; дестабилизация экзополисахаридного матрикса (ЭМ)	Закрытое лечение для удаления зрелой биопленки (бактерии и грибы)	Да
Этанол	Антимикробный; пенетратор ЭМ	Закрытое лечение для удаления зрелой биопленки (бактерии)	Да
Тауролидин-цитрат	Антимикробный	Закрытое лечение для предотвращения колонизации или для удаления зрелой биопленки (бактерии)	Да
Дисперсанты биопленки	Дисперсия клеток из биопленок	Закрытое лечение для удаления зрелой биопленки (бактерии и грибы)	Нет
Бактериофаги	Антимикробный; деградация ЭМ	Предобработка катетерных поверхностей	Нет
Оксид натрия	Реализация оксида натрия от покрытых поверхностей до увеличения иммунного ответа	Предобработка катетерных поверхностей для предотвращения колонизации	Нет
GlmU Энзимный ингибитор	Антимикробный; анти-адгезин	Предобработка катетерных поверхностей для предотвращения колонизации	Нет
RIP QS-ингибитор	Ингибция QS, необходимая для образования биопленки <i>S. aureus</i>	Парентеральные инъекции для удаления зрелой биопленки	Нет

Примечание. GlmU – N-acetyl-d-glucosamin-1-phosphate acetyltransferase; RIP – RNAIII-ингибиторный пептид.

различных, неродственных микроорганизмов находятся фрагменты внеклеточной ДНК, содержащей гены бактериальной хромосомы и плазмид. Опубликовано очень интересное исследование еще об одном механизме повышения антибиотикорезистентности бактерий в биопленке [10]. Показано, что разрушение внеклеточной ДНК ферментом ДНКазой растущей и зрелой биопленки грамотрицательных (гр-) и грамположительных (гр+) бактерий приводит к необратимому изменению таких важных свойств, как уменьшение биомассы и снижение количества антибиотикоустойчивых клеток. При действии ДНКазы выявлено частичное угнетение передачи плазмидных генов, контролирующей антибиотикоустойчивость. Примечательно, что использование ДНКазы способствует проявлению действия различных антибактериальных препаратов на бактерии биопленки.

Экспериментальные данные, полученные при использовании антибактериальных препаратов, показали, что антибиотики левофлоксацин и азитромицин оказывают ингибирующее действие путем преодоления барьера липидных мембран клеток человека и активного проникновения в микробные клетки – мишени. Для изучения активности даптомицина и ванкомицина в отношении биопленок, образуемых *S. epidermidis* на внутрисосудистых ка-

тетерах, использована модель *in vitro* на полиуретановых катетерах, которая приближается к условиям *in vivo* [18]. Через каждые 24 ч сегменты катетеров извлекались, отмывались и санифицировались. Жизнеспособность бактерий определялась на чашках с питательным агаром. Результаты показали, что через 48 ч после экспозиции с даптомицином происходила редукция бактерий на 4 lg по сравнению с контролем. На этой же модели ванкомицин ингибировал бактерии только на 1,3 lg.

Интересны новые факты, касающиеся механизмов антибактериального эффекта бактериофагов. При клиническом использовании бактериофаги помимо непосредственного литического действия индуцируют продукцию деполимераз в микробных биопленках. Показано, что положительный клинический результат после аэрозольного применения антисинегнойного бактериофага больным муковисцидозом можно связать с эффектом активной деградации экзополисахаридного компонента биопленочного матрикса, который возникает при проникновении бактериофагов во внутренние слои микробной биопленки [13]. В работе Carson et al. [21] использованы литические бактериофаги для лечения и предотвращения образования биопленок *Proteus mirabilis* и *Escherichia coli* на урологических устройствах и катетерах у урологических

больных. Наблюдалось предотвращение формирования биопленок на биоматериалах катетеров после их импрегнации с гидрогель-связанными бактериофагами. В результате применения фагов биопленочная ассоциация была редуцирована на 3–4 lg. При этом по сравнению с необработанным контролем происходило отчетливое в 90% случаев подавление образования биопленок госпитальными штаммами *Proteus mirabilis* и *Escherichia coli*. Бактериофаги также были использованы для подавления образования биопленок, образованных *S. epidermidis* в катетерах [25].

Из поисковых работ, направленных на выявление препаратов и материалов, активно ингибирующих образование биопленочных консорциумов, интерес представляет работа, согласно результатам которой миноциклин – EDTA (М-EDTA) на кроличьей модели предотвращает микробную колонизацию катетеров. Работа интересна тем, что определения проводили как на свежесформированной, так и на зрелой биопленке. Каждый из сегментов катетеров был инкубирован с различными дозами следующих растворов – стрептокиназой, гепарином, ванкомицином, ванкомицином-гепарином, EDTA, М-EDTA. Количественное исследование микрофлоры сегментов проводили после сонификации. Эффект редукции колонизации *S. epidermidis*, *S. aureus* или *Candida albicans* раствором М-EDTA оказался в значительной степени более выраженным в сравнении с прочими препаратами. Важно отметить, что эффект подавления наблюдался в отношении как свежей, так и зрелой биопленки [45]. Новый способ борьбы с биопленками условно-патогенной микрофлоры, в частности образованных *P. aeruginosa*, демонстрирует возможность фотодинамической эрадикации планктонных и биопленочных культур. Этот способ называют фотодинамической дезинфекцией возбудителей бактериальных инфекций. *P. aeruginosa* – проблемный оппортунистический патоген для хирургических стационаров с множественной антибиотикорезистентностью и способностью продуцировать защитный биопленочный матрикс. В экспериментах *in vitro* осуществлена экспозиция планктонных клеток с фотосенсибилизатором, связанным с метиленовым синим. Результаты показали, что облучение планктонных клеток с фотосенсибилизатором при использовании 670 нм нетермального диодного лазера, проводимое в условиях однократной экспозиции, определяло эффект 100% эрадикации микрофлоры [49].

В настоящее время разрабатываются другие новые подходы к преодолению толерантности микробов в биопленках путем поиска различных препаратов, а также сочетаний антибиотиков, способных проникать через матрикс биопленки, растворять его

или воздействовать другими путями, способными предупреждать развитие микробных биопленок [4, 6, 15]. В эксперименте получена дезорганизация биопленок *Staphylococcus aureus* и CNS метаболитами лактобацилл [1]. Комбинация ципрофлоксацина или линезолида с рифампицином оказывает подавляющий эффект на биопленку *E. faecalis in vitro*. Предлагается рассматривать эту комбинацию для применения у людей с ранней инфекцией протеза, вызванной этим микробом [36].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Улучшение состояния здоровья населения является приоритетной задачей национальной политики. Для хирургии высоких технологий, кардиохирургии и трансплантологии решение задачи ассоциируется с повышением количества и эффективности проводимых операций. Достижение указанной цели напрямую связано с реализацией возможности уменьшения послеоперационных инфекционных осложнений, вероятность развития и низкая курбельность которых во многом определяются лекарственной полирезистентностью госпитальной флоры. Междисциплинарная команда в составе представителей различных научных направлений и специалистов клинической медицины занята в решении этой актуальной для XXI века проблемы – выявление механизмов образования и способов преодоления множественной резистентности микрофлоры к антибиотикам. Результатом всплеска работ по изучению процесса пленкообразования в микробиологии явилось развитие нового направления, изменяющего наше представление об организации жизнедеятельности микробов, способов их адаптации к существованию во внешней среде и организме хозяина. Для клиники представляется важным возможность использования методов, оценивающих активность пленкообразования госпитальных микроорганизмов и ингибиции биопленок. Предлагаемые к применению способы и методы разрушения биопленок, связанных с различными биотопами и имплантатами пациентов, а также поверхностями медицинских устройств и аппаратуры, основанные на использовании антиадгезивных, антисептических и антибиотических средств, имеют большую перспективу для создания новых технологий и средств для предупреждения и лечения инфекционных осложнений в хирургии и в трансплантологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В.М., Рыбальченко О.В., Орлова О.Г. и др. Дезорганизация биопленок клинических штаммов стафилококков метаболитами лактобацилл // Журн. микробиол. 2010. № 6. С. 66–70.

2. Габриэлян Н.И., Толпекин В.Е., Шумаков Д.В. и др. 30-летний опыт применения контрпульсации и обхода желудочков сердца: проблема инфекции // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2006. № 4. С. 80–82.
3. Гинцбург А.Л., Романова Ю.М. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина // Журн. микробиол. 2011. № 3. С. 99–109.
4. Голуб А.В. Новые возможности профилактики инфекций области хирургического вмешательства // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2011. № 1. С. 56–66.
5. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Система коммуникаций у бактерий и их роль в патогенности // Мол. генет. микробиол. вирусол. 2006. № 3. С. 22–29.
6. Караев З.О., Мамедова Л.Р. Влияние лекарственных препаратов на образование биопленок *Candida albicans* // Проблемы медицинской микологии. 2010. № 3. С. 10–12.
7. Кузнецова М.В. Формирование биопленок нозокомиальными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* // Журн. микробиол. 2011. № 4. С. 8–14.
8. Романова Н.И., Буданова Е.В., Спирина Т.С. и др. Способность к биопленкообразованию у госпитальных микроорганизмов // Матер. X научно-практической конфер. «Внутрибольничные инфекции в стационарах различного профиля, профилактика, лечение осложнений». М., 2012. С. 58–59.
9. 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.
10. Тец Г.В. Роль внеклеточной ДНК и липидов матрикса во взаимодействии бактерий биопленок с антибиотиками: Дис. ... канд. мед. наук. СПб.–М., 2007.
11. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д. и др. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2012. Т. 14. № 1. С. 51–58.
12. Adam B., Baillie G.S., Douglas L.J. Mixed species biofilms on *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis* // J. Med. Microbiol. 2002. Vol. 51. P. 344–349.
13. Azeredo J., Sutherland I.W. The use of phages for the removal of infectious biofilms // Curr. Pharm. Biotechnol. 2008. Vol. 9 (4). P. 261–266.
14. Balaban N., Cirioni O., Giacometti A. et al. Treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm infection by the quorum-sensing inhibitor RIP // Antimicrob. Agents Chemother. 2007. Vol. 51. P. 2226–2229.
15. Balestrino D., Souweine B., Charbonnel N. et al. Eradication of microorganisms embedded in biofilm by an ethanol-based catheter lock solution // Nephrol. Dial. Transplant. 2009. Vol. 24. P. 3204–3209.
16. Banin E., Brady K.M., Greenberg E.P. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm // Appl. Environ. Microbiol. 2006. Vol. 72 (3). P. 2064–2069.
17. Betjes M.G.H., van Agteren M. Prevention of dialysis catheter-related sepsis with a citrate-taurolidine-containing lock solution // Nephrol. Dial. Transplant. 2004. Vol. 19. P. 1546–1551.
18. Garcia I., Conejo M.C., Ojeda A. et al. A dynamic *in vitro* model for evaluating antimicrobial activity against bacterial biofilms using a new device and clinical used catheters // J. Microb. Methods. 2010. Vol. 83. P. 307–311.
19. Budhani R.K., Struthers J.K. Interaction of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* investigation of the indirect pathogenic role of a beta-lactamase-producing *Moraxella* by use of a continuous – culture biofilm system // Antimicrob. Agents Chemother. 1998. Vol. 43. P. 2521–2526.
20. Burton E., Gawande P.V., Yakandawala N. et al. Antibiofilm activity of GlmU enzyme inhibitors against catheter-associated uropathogens // Antimicrob. Agents Chemother. 2006. Vol. 50. P. 1835–1840.
21. Carson L., Gorman S.P., Gilmore B.F. The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli* // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2010. Vol. 59 (3). P. 447–455.
22. Ciofu O. *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal beta-lactamase in patients with cystic fibrosis and chronic lung infection. Mechanism of antibiotic resistance and target of the humoral immune response // APMIS Suppl. 2003. Vol. 116. P. 41–47.
23. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // Science. 1999. Vol. 284. P. 1318–1322.
24. Cotar A.I., Dinu S., Chifiriuc M.C. et al. Screening of molecular markers of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical infections // Roum. Biotech. Letters. 2008. Vol. 13 (3). P. 3765–3770.
25. Curtin J.J., Donlan R.M. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis* // Antimicrob. Agents Chemother. 2006. Vol. 50. P. 1268–1275.
26. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. Vol. 64. P. 847–867.
27. Davies D.G., Chakrabarty A.M., Geesey G.G. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa* // Appl. Environ. Microbiol. 1993. Vol. 59. P. 1181–1186.
28. Davies D.G., Marques C.N.H. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms // J. Bacteriol. 2009. Vol. 191. P. 1393–1403.
29. Donelli G. Vascular catheter-related infection and sepsis // Surg. Infect. (Larchmt). 2006. Vol. 7 (Suppl 2). S. 5–7.
30. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // Clin. Microbiol. Rev. 2002. Vol. 15. P. 167–193.
31. Donlan R.M. Biofilm elimination on intravascular catheters: important consideration for the infectious disease practitioner // Healthcare epidemiology. 2011. Vol. 52 (15). P. 1038–1043.

32. Dunne W.M., Mason E.O., Kaplan S.L. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilms // *Antimicrob. Agents Chemoter.* 1993. Vol. 37. P. 2522–2526.
33. Estivill D., Arias A., Torres-Lana A. et al. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials // *J. Microbiol. Methods.* 2011. Vol. 86 (2). P. 238–242.
34. Hall-Stoodley L.J., Costerton W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases // *Nat. Rev. Microbiol.* 2004. Vol. 2. P. 95–108.
35. Hentzer M., Teitzel G.M., Balzer G.J. et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function // *J. Bacteriol.* 2001. Vol. 183. P. 5395–5401.
36. Holmberg A., Morgelin M., Rasmussen M. Effectiveness of ciprofloxacin or linezolid in combination with rifampicin against *Enterococcus faecalis* in biofilms // *J. Antimicrob. Chemoter.* 2012. Vol. 67 (2). P. 433–439.
37. Keren I., Shah D., Spoering A. et al. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 2004. Vol. 186. P. 8171–8180.
38. Khardori N., Yassien M. Biofilms in device-related infections // *J. Ind. Microbiol.* 1995. Vol. 15 (3). P. 141–147.
39. Lazar V., Chifiriuc M.C. Architecture and physiology of microbial biofilms // *Roum Arch Microbiol Immunol.* 2010. Vol. 69 (2). P. 95–107.
40. Lazar V., Chifiriuc M.C. Medical significance and new therapeutic strategies for biofilm associated infections // *Roum Arch. Microbiol. Immunol.* 2010. Vol. 69 (3). P. 125–138.
41. Mandsberg L.F., Ciofu O., Kirkby N. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system // *Antimicrob. Agents Chemoter.* 2009. Vol. 53. P. 2483–2491.
42. Metcalf S.C.L., Chambers S.T., Pithie A.D. Use of ethanol locks to prevent recurrent central line sepsis // *J. Infect.* 2004. Vol. 49. P. 20–22.
43. Nablo B.J., Prichard H.L., Butler R.D. et al. Inhibition of implant-associated infections via nitric oxide release // *Biomaterials.* 2005. Vol. 26. P. 6984–6990.
44. Percival S.L., Kite P., Eastwood K. et al. Tetrasodium EDTA as a novel central venous catheter lock solution against biofilm // *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 2005. Vol. 26. P. 515–519.
45. Raad I., Chatzinikolaou I., Chaiban G. et al. *In vitro* and *ex vivo* activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces // *Antimicrob. Agents Chemoter.* 2003. Vol. 47 (11). P. 3580–3585.
46. Raad I.I., Fang X., Keutgen X.M. The role of chelators in preventing biofilm formation and catheter-related bloodstream infections // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008. Vol. 21. P. 385–392.
47. Sha C.B., Mittelman M.W., Costerton J.W. et al. Antimicrobial activity of a novel catheter lock solution // *Antimicrob. Agents Chemoter.* 2002. Vol. 46. P. 1674–1679.
48. Simon A., Ammann R.A., Wiszniewsky G. et al. Taurolidine-citrate lock solution (TauroLock) significantly reduces CVAD-associated gram positive infections in pediatric cancer patients // *BMC Infect. Dis.* 2008. Vol. 8. P. 102.
49. Street C.N., Gibbs A., Pedigo L. et al. *In vitro* photodynamic eradication of *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm culture // *Photochem. Photobiol.* 2009. Vol. 85 (1). P. 137–143.
50. Yu J., Wu J., Francis K.P. et al. Monitoring *in vivo* fitness of rifampicin-resistant *Staphylococcus aureus* mutants in a mouse biofilm infection model // *J. Antimicrob. Chemoter.* 2005. Vol. 55. P. 528–534.