

МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ MICROBIOLOGY AND VIROLOGY

DOI: 10.29413/ABS.2019-4.5.6

Бактериальные биоплёнки при гнойно-септических инфекциях

Савилов Е.Д.^{1,2}, Анганова Е.В.², Носкова О.А.^{1,3}, Духанина А.В.¹¹ ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, Россия);² Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ (664079, г. Иркутск, Юбилейный, 100, Россия); ³ ГБУЗ Иркутская государственная областная детская клиническая больница (664022, г. Иркутск, бульвар Гагарина, 4, Россия)**Автор, ответственный за переписку:** Носкова Ольга Александровна, e-mail: noskovaepid@yandex.ru

Резюме

Значительная часть инфекционных заболеваний обусловлена способностью их возбудителей существовать в форме биоплёнок. Биоплёночные инфекции существенно ограничивают проведение профилактических и лечебных мероприятий в медицинских учреждениях. Учитывая тот факт, что биоплёночная активность различных микроорганизмов значительно варьирует, особый интерес представляет её изучение у госпитальных штаммов.

Цель: изучение биоплёнок микроорганизмов, выделенных из различных локусов при гнойно-септических инфекциях.

Материалы и методы. Биоплёнкообразование определяли по способности к адсорбции кристалвиолета этанолом. Оптическую плотность измеряли с помощью спектрофотометра Multiscan Plus. Исследовали бактерии различных таксономических групп (*Staphylococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, неферментирующие грамотрицательные бактерии), выделенных из различных локусов у пациентов с сепсисом.

Результаты. Биоплёнки выявлены у подавляющего большинства протестированных микроорганизмов (73,3 ± 11,4 %). Наиболее высокая степень биоплёнкообразования установлена у *Klebsiella pneumoniae* (0,445 ± 0,05 единиц оптической плотности), а также преимущественно у изолятов из клинически значимых локусов (кровь, мокрота), минимальная – у *Staphylococcus haemolyticus* (0,095 ± 0,05). Большая часть протестированных микроорганизмов характеризовалась средней степенью активности биоплёнкообразования; пятая часть штаммов – слабой степенью, а высокая активность пленкообразования установлена только у 13,3 % изолятов. Микробиоты, выделенные из крови, мокроты и смыва с трахеобронхиального дерева во всех случаях обладали способностью к формированию биоплёнок.

Заключение. Штаммы в большинстве случаев образуют биоплёнки и характеризуются разной степенью активности биоплёнкообразования. Подчёркивается необходимость разработки мер профилактики инфекций, вызванных биоплёнками в медицинских организациях.

Ключевые слова: бактериальные биоплёнки, гнойно-септические инфекции, локусы мониторинга, клинически значимые локусы

Для цитирования: Савилов Е.Д., Анганова Е.В., Носкова О.А., Духанина А.В. Бактериальные биоплёнки при гнойно-септических инфекциях. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(5): 38-42. doi: 10.29413/ABS.2019-4.5.6

Bacteria Biofilms in Purulent-Septic Infections

Savilov E.D.^{1,2}, Anganova E.V.¹, Noskova O.A.^{1,3}, Dukhanina A.V.¹

¹ Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems (Timiryazev str. 16, 664003 Irkutsk, Russian Federation); Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education – Branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education (Yubileyniy 100, 664049 Irkutsk, Russian Federation); ³ Irkutsk Children's Clinical Hospital, Russia (Gagarina Blvd. 4, 664022 Irkutsk, Russian Federation)

Corresponding author: Olga A. Noskova, e-mail: noskovaepid@yandex.ru

Abstract

The causative agents of many infectious diseases can exist in the form of biofilms. The aim of the work is to study of the frequency of occurrence and the degree of activity of biofilm formation of microorganisms isolated from different locus in purulent-septic infections.

Materials and methods. Fifteen strains isolated from patients with purulent-septic infections were examined. Biofilms were determined by the ability to adsorption a crystalviolet to ethanol.

Results. 73,3 ± 11,4 % strains had biofilms (including gram-negative bacteria – 69,2 ± 11,9 %; *Staphylococcus* – 100,0 %; $p < 0,05$). The degree of activity of formation of biofilm by gram-negative bacteria was higher than *Staphylococcus*

($0,302 \pm 0,04$ и $0,134 \pm 0,01$ units of optical density; $p < 0,01$). The highest activity of formation of biofilm was detected in *K. pneumoniae* isolated from patients with sepsis. Strains from clinically important locus (blood, sputum, wound discharge, abdominal fluid) had biofilms in 75,0 %; from locus of monitoring – 66,7 %. The pathogens isolated from locus of the monitoring were characterized by an average degree of activity of biofilm formation (0,180–0,360 units of optical density). Strains from clinically important locus (blood and sputum from patients with sepsis) had a high degree of biofilm formation (more than 0,360 units of optical density).

Conclusion. In most cases, strains were characterized by the presence of biofilms and differed in degrees activity of biofilm formation depending on locus.

Key words: bacteria biofilms, purulent-septic infections, locus of monitoring, clinically important locus

For citation: Savilov E.D., Anganova E.V., Noskova O.A., Dukhanina A.V. Bacteria Biofilms in Purulent-Septic Infections. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(5): 38-42. doi: 10.29413/ABS.2019-4.5.6

В настоящее время предполагают, что значительная часть инфекционных заболеваний человека обусловлена способностью микроорганизмов существовать в форме биоплёночных сообществ [1, 2]. По данным ряда авторов, биоплёнки значительно затрудняют терапию пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями, повышают стоимость лечения и могут приводить к неблагоприятным исходам. Биоплёночные инфекции также отличаются склонностью к хронизации и высокой вероятности генерализации инфекционного процесса вследствие диссеминации возбудителя [3]. Биоплёнки (БП) выявлены у многих видов грамотрицательных и грамположительных бактерий [1, 4, 5, 6], в связи с чем их необходимо учитывать при исследовании механизмов инфекционного процесса. Биоплёнокообразование у микроорганизмов следует рассматривать как один из факторов патогенности, реализуемый в результате воздействия неблагоприятных факторов внешней среды или организма-хозяина (лекарственных препаратов, дезинфицирующих средств, физических факторов, иммунной системы человека). Биоплёнка – это специализированная экосистема со сложным циклом развития и кооперативным поведением входящих в неё родственных и неродственных бактерий, соединённых между собой и фиксированных на различных биотических и абиотических поверхностях (имплантатах, искусственных сердечных клапанах, катетерах, шунтах, оборудовании, изделиях медицинского назначения и т.д.). Образование биоплёнок на инвазивных материалах и изделиях может привести к развитию катетер-ассоциированных, вентилятор-ассоциированных, генерализованных гнойно-септических инфекций. В связи с этим, изучение данных свойств микроорганизмов очень актуально для отделений реанимации и интенсивной терапии, где наиболее часто используются различные инвазивные устройства. Следует отметить, что на современном этапе доказана роль биоплёнокообразующих бактерий в формировании госпитальных штаммов в стационарах различного профиля. Вместе с тем, результаты исследований свидетельствуют о более высокой степени биоплёнокообразования у бактерий, выделенных от больных, чем у микроорганизмов, выделенных с объектов внешней среды [3]. Учитывая тот факт, что биоплёночная активность различных микроорганизмов значительно варьирует, особый интерес представляет её изучение у госпитальных штаммов. На современном этапе формирование биоплёнок служит новой модельной системой для изучения развития микробов [7, 8, 9]. В то же время, несмотря на актуальность данной проблемы, бактериальные биоплёнки до сих пор являются недостаточно изученными [2].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение частоты встречаемости и степени активности биоплёнокообразования у микроорганизмов, выделенных из различных локусов при гнойно-септических инфекциях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение биоплёнокообразования проведено у штаммов, выделенных от пациентов, находящихся на стационарном лечении в Областной детской клинической больнице (г. Иркутск) с тяжёлыми гнойно-септическими инфекциями (сепсис, перитонит, вторичный гнойный менингоэнцефалит). Исследованы изоляты из раневого отделяемого, мокроты, жидкости брюшной полости, зева, крови, смыва с трахеобронхиального дерева (ТБД). На способность формировать биоплёнки протестированы 15 штаммов, в том числе представители семейств *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*), *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas aeruginosa*), *Moraxellaceae* (*Acinetobacter calcoaceticus / baumannii*) и *Staphylococcaceae* (*Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*). Всего проведено 45 исследований.

Выделение и идентификацию микроорганизмов осуществляли согласно существующим стандартным методикам [10, 11]. Для выявления образования биоплёнок использовали 96-луночные полистироловые планшеты [7]. Изоляты культивировали в мясо-пептонном бульоне при температуре 37 °С. Удаляли планктонные клетки из лунок, плёнки окрашивали с использованием 1%-ного раствора кристаллвиолета с последующей инкубацией в течение 45 минут при комнатной температуре. После трёхкратного промывания дистиллированной водой осуществляли экстракцию краски из плёнки путём добавления этанола. С помощью спектрофотометра Multiscan Plus измеряли оптическую плотность (ОП) раствора при длине волны 492 нм. Полученные данные интерпретировали следующим образом: при значениях оптической плотности ниже 0,090 единиц изоляты относили к неплёнокообразующим; при $0,090 < ОП \leq 0,180$ штаммы характеризовались слабой способностью к образованию бактериальной плёнки; при $0,180 < ОП \leq 0,360$ – средней; при $ОП > 0,360$ – высокой. Все эксперименты проводили в трёхкратной повторности.

Статистическую обработку результатов осуществляли в соответствии с общепринятыми методиками [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведённых нами исследований биоплёнки выявлены у $73,3 \pm 11,4$ % протестированных штаммов. При этом частота встречаемости биоплёнокообразования у грамотрицательных бактерий составила

69,2 ± 11,9 %; стафилококков – 100,0 % ($p < 0,05$). Среди грамотрицательных бактерий биоплёнки выявлены как у представителей семейства *Enterobacteriaceae*, так и у ферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОБ) (рис. 1).

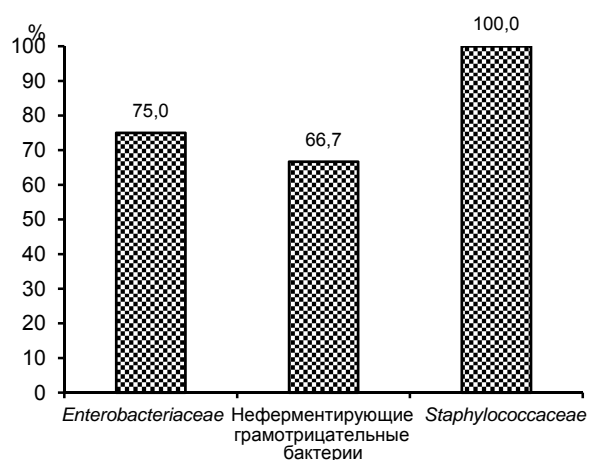


Рис. 1. Частота выявления биоплёнок у бактерий различных таксономических групп (%).

Fig. 1. The frequency of detection of biofilms in bacteria of various taxonomic groups (%).

При этом среди энтеробактерий свойство биоплёнкообразования установлено у *K. pneumoniae* и *S. marcescens*, а кишечная палочка, напротив, характеризовалась отсутствием БП. Различий в частоте встречаемости биоплёнок у неферментирующих грамотрицательных бактерий (*P. aeruginosa* и *A. calcoaceticus* / *baumannii*) не установлено (около 70 %). Среди стафилококков способность к формированию биоплёнок выявлена как у *S. epidermidis*, так и *S. haemolyticus*.

Оценка биоплёнкообразования штаммов, выделенных из различных локусов, показала, что изоляты из клинически значимых локусов (кровь, мокрота, смыв с трахеобронхиального дерева, раневое отделяемое, жидкость брюшной полости) продемонстрировали наличие биоплёнок в 75,0 % случаев; из локусов мониторинга (зев) – в 66,7 % ($p > 0,05$). Следует отметить, что штаммы, выделенные из трёх клинически значимых локусов, во

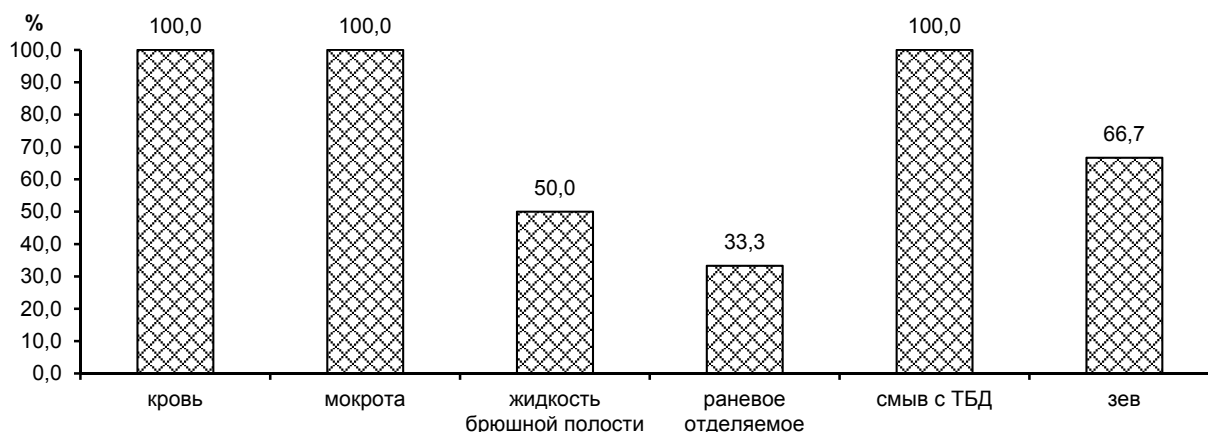


Рис. 2. Биоплёнкообразование бактерий, выделенных из различных локусов (%).

Fig. 2. Biofilm formation of bacteria isolated from various loci (%).

всех случаях обладали способностью к формированию БП (рис. 2).

Оценка активности биоплёнкообразования у исследованных изолятов показала, что средний уровень адсорбции кристаллвиолета этанолом составил $0,272 \pm 0,04$ единиц оптической плотности. При этом среди грамотрицательных микроорганизмов данный показатель был значимо ($p < 0,01$) более высоким по сравнению с грамположительными кокками ($0,302 \pm 0,04$ и $0,134 \pm 0,01$ единиц ОП соответственно). У энтеробактерий степень пленкообразования составила $0,368 \pm 0,06$ единиц ОП, у НГОБ – $0,269 \pm 0,02$ единиц ОП ($p > 0,05$).

В результате сравнения степени биоплёнкообразования у бактерий различных видов установлено, что штаммы *K. pneumoniae*, выделенные от пациентов с сепсисом, характеризовались самой высокой активностью биоплёнкообразования ($0,445 \pm 0,05$ единиц оптической плотности). Минимальная степень активности биоплёнкообразования выявлена у штамма *S. haemolyticus* (рис. 3).

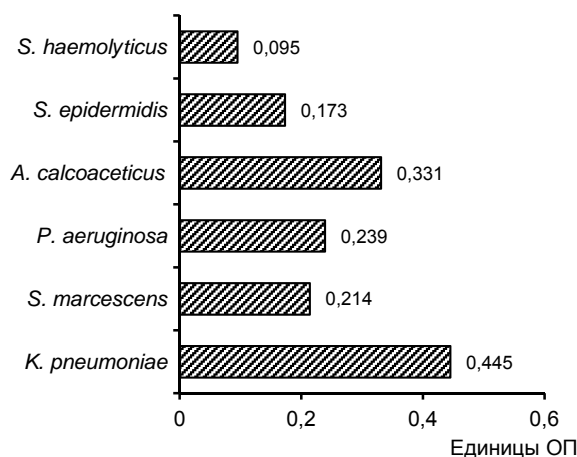


Рис. 3. Сравнительная характеристика активности биоплёнкообразования микроорганизмов разных видов (в единицах ОП).

Fig. 3. Comparative characteristics of the activity of biofilm formation of microorganisms of different species (in units of OD).

Результаты спектрофотометрического исследования показали, что исследованные изоляты распределились

следующим образом: у 26,7 % штаммов способность к образованию биоплёнок не выявлена. Большая часть протестированных микроорганизмов характеризовалась средней степенью активности биоплёнкообразования; пятая часть штаммов – слабой степенью, а высокая активность пленкообразования установлена только у 13,3 % изолятов.

Средняя степень биоплёнкообразования штаммов из локусов мониторинга и клинически значимых локусов составила $0,297 \pm 0,002$ единиц ОП и $0,266 \pm 0,05$ единиц ОП соответственно ($p > 0,05$). Следует отметить, что штаммы, выделенные из зева, характеризовались только средней степенью биоплёнкообразования. В то же время в отношении изолятов из клинически значимых локусов установлена большая вариабельность данного свойства. Так, у третьей части штаммов, полученных из клинически значимых локусов, выявлена средняя степень активности биоплёнкообразования; у четвертой части – слабая. Кроме того, высокая степень биоплёнкообразования была установлена только у изолятов из клинически значимых локусов (кровь и мокрота от пациентов с сепсисом).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, установлено, что большая часть штаммов (энтеробактерий, неферментирующих грамотрицательных бактерий, стафилококков), изолированных от больных с тяжёлыми формами гнойно-септических инфекций, обладали способностью к биоплёнкообразованию ($73,3 \pm 11,4$ %). Частота встречаемости БП у грамотрицательных бактерий составила $69,2 \pm 11,9$ %, у стафилококков была значимо ($p < 0,05$) более высокой ($100,0$ %). В то же время степень активности биоплёнкообразования среди грамотрицательных бактерий значительно ($p < 0,01$) превышала аналогичный показатель среди стафилококков ($0,302 \pm 0,04$ и $0,134 \pm 0,01$ единиц ОП соответственно). Самая высокая активность биоплёнкообразования выявлена у штаммов *K. pneumoniae*, изолированных от пациентов с сепсисом ($0,445 \pm 0,05$ единиц ОП), наименьшая – у *S. haemolyticus* ($0,095 \pm 0,05$ единиц ОП).

Значимых различий в частоте встречаемости БП у штаммов, изолированных из клинически значимых локусов и локусов мониторинга, не выявлено. Однако они характеризовались разной степенью активности биоплёнкообразования. Так, у штаммов, выделенных из локуса мониторинга (зев), активность биоплёнкообразования находилась в пределах от 0,180 до 0,360 единиц ОП. Высокая степень биоплёнкообразования (выше 0,360 единиц ОП) была установлена только у изолятов из клинически значимых локусов (кровь и мокрота от пациентов с сепсисом).

Установленная способность к биоплёнкообразованию большинства микроорганизмов, изолированных от больных с гнойно-септическими инфекциями, свидетельствует о необходимости разработки мер профилактики инфекций, вызванных биоплёнками в медицинских организациях.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биоплёнки и инфекции. *Журнал инфектологии*. 2010; 3(2): 4-15.

2. Глушанова Н.А., Блинова А.И., Алексеева Н.Б. Бактериальные биоплёнки в инфекционной патологии человека. *Медицина в Кузбассе*. 2015; 14(2): 30-35.

3. Петрухина М.И., Ющенко Г.В., Политова Н.Г. Эпидемиологическое значение бактериальных плёнок. *Журнал МедиАль*. 2015; (3): 9-16.

4. Анганова Е.В., Савилов Е.Д., Ушкарева О.А., Аблов А.М., Духанина А.В. Способность патогенных и условно-патогенных энтеробактерий к формированию биоплёнок. *Acta biomedica scientifica*. 2014; (5): 34-37.

5. Лахтин М.В., Лахтин В.М., Афанасьев С.С., Байракова А.Л., Алешкин В.А. Биоплёнкообразование в биотопном микробиоценозе человека: модель для прогностических расчётов межмикробных взаимосвязей. *Acta biomedica scientifica*. 2015; (3): 56-61.

6. Beloin C, Roux A, Ghigo JM. Escherichia coli biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2008; 322: 249-289. doi: 10.1007/978-3-540-75418-3_12

7. O'Toole GA, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.* 2000; (54): 49-79. DOI:10.1146/annurev.micro.54.1.49

8. Taj Y, Essa F, Aziz F, Kazmi SU. Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of Staphylococcus aureus. *J Infect Dev Ctries*. 2012; 6(5): 403-409. doi: 10.3855/jidc.1743

9. Yu W, Hallinen KM, Wood KB. Interplay between antibiotic efficacy and drug-induced lysis underlies enhanced biofilm formation at subinhibitory drug concentrations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(1): e01603-17. doi.org/10.1128/AAC.01603-17

10. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-диагностических учреждений: Приказ № 535 МЗ СССР от 22.04.85. М.: 1985.

11. Лабинская А.С., Костюкова Н.Н. (ред.) *Руководство по медицинской микробиологии*. М.: БИНОМ; 2013.

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

REFERENCES

1. Gostev VV, Sidorenko SV. Biofilms bacteria and infections. *Zhurnal infektologii*. 2010; 2(3): 4-15. (In Russ.)

2. Glushanova NA, Blinova AI, Alekseeva NB. Bacterial biofilms in infectious pathology of human. *Meditina v Kuzbasse*, 2015; 14(2): 30-35. (In Russ.)

3. Petrukhina MI, Yushchenko GV, Politova NG. Epidemiological significance of bacterial films. *Zhurnal MediAl*. 2015; (3): 9-16. (In Russ.)

4. Anganova EV, Savilov ED, Ushkareva OA, Ablov AM, Dukhanina AV. Ability of pathogenic and opportunistic pathogenic Enterobacteriaceae to the formation of biofilms. *Acta biomedica scientifica*. 2014; (5): 34-37. (In Russ.)

5. Lakhtin MV, Lakhtin VM, Afanasjev SS, Bayrakova AL, Aleshkin VA. Formation of biofilms in human biotope microbiocenosis: model for prognostic calculations of intermicrobial relationships. *Acta biomedica scientifica*. 2015; (3): 56-61. (In Russ.)

6. Beloin C, Roux A, Ghigo JM. Escherichia coli biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2008; 322: 249-289. doi: 10.1007/978-3-540-75418-3_12

7. O'Toole GA, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Ann Rev Microbiol*. 2000; (54): 49-79. doi:10.1146/annurev.micro.54.1.49

8. Taj Y, Essa F, Aziz F, Kazmi SU. Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of Staphylococcus aureus. *J Infect Dev Ctries*. 2012; 6(5): 403-409. doi: 10.3855/jidc.1743

9. Yu W, Hallinen KM, Wood KB. Interplay between antibiotic efficacy and drug-induced lysis underlies enhanced biofilm formation at subinhibitory drug concentrations. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62 (1): e01603-17. doi.org/10.1128/AAC.01603-17

10. *About unification of microbiological (bacteriological) methods of research used in clinical diagnostic laboratories of medical-diagnostical institutions. Order of the Ministry of Health, SSSR from 22.04.1985. Moscow; 1985. (In Russ.)*

11. Labinskaya AS, Kostyukova NN. (eds.) *Manual of Medical Microbiology*. Moscow: BINOM; 2013. (In Russ.)

12. Savilov ED, Astafev VA, Zhdanova SN, Zarudnev EV. *Epidemiological analysis: methods of statistical treatment of the material*. Novosibirsk: Nauka-Centr; 2011. (In Russ.)

Сведения об авторах

Савилов Евгений Дмитриевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой эпидемиологии и микробиологии, Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава РФ; главный научный сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально-значимых инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: savilov47@gmail.com

Анганова Елена Витальевна – доктор биологических наук, лаборатория эпидемиологически и социально-значимых инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: eva.irk@mail.ru

Носкова Ольга Александровна – заместитель главного врача по санитарно-эпидемиологической работе, ГБУЗ «Иркутская государственная областная детская клиническая больница»; младший научный сотрудник лаборатории эпидемиологически и социально-значимых инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: noskovaepid@yandex.ru

Духанина Алла Владимировна – кандидат биологических наук, профессор, инженер лаборатории эпидемиологически и социально-значимых инфекций, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: duhanina.alla@yandex.ru

Information about the authors:

Evgeny D. Savilov – Dr. Sc. (Med.), Professor, Head of the Department of Epidemiology and Microbiology, Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education – Branch of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; Chief Research Officer at the Laboratory of Epidemiologically and Socially Important Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: savilov47@gmail.com

Elena V. Anganova – Dr. Sc. (Biol.), Laboratory of Epidemiologically and Socially Important Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: eva.irk@mail.ru

Olga A. Noskova – Deputy Chief Physician for Sanitary and Epidemiological Work, Irkutsk State Regional Children's Clinical Hospital; Junior Research Officer at the Laboratory of Epidemiologically and Socially Important Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: noskovaepid@yandex.ru

Alla V. Dukhanina – Cand. Sc. (Biol.), Professor, Engineer at the Laboratory of Epidemiologically and Socially Important Infections, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, e-mail: duhanina.alla@yandex.ru

Статья получена: 09.07.2019. Статья принята: 23.09.2019. Статья опубликована: 26.10.2019.

Received: 09.07.2019. Accepted: 23.09.2019. Published: 26.10.2019.