

дифтерийных коринебактерий были чувствительны и не проявляли резистентность к цефотаксиму, цефазолину и ванкомицину.

ЛИТЕРАТУРА

1. Краева Л.А., Манина Ж.Н., Ценева Г.Я. и др. Этиологическое значение *Corynebacterium non diphtheriae* у больных с различной патологией. Журн. микробиол. 2007, 5: 3-7.
2. Методические рекомендации 4.2.00.20-11 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Фенотипическая идентификация бактерий рода *Corynebacterium*». М., 2011.
3. Методические указания 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». М., 2004.
4. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А., Миронов А.Ю. и др. Антибиотикочувствительность штаммов *Corynebacterium non diphtheriae*, циркулирующих в г.Ростове-на-Дону и Ростовской области. Клиническая лабораторная диагностика. 2012, 10: 62-64.
5. Bernard K.A. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. J. Clin. Microbiol. 2012, 50 (10): 3152-3158.
6. Burkovski A. Cell envelope of *Corynebacteria*: structure and influence on pathogenicity. ISRN Microbiol. 2013, P. 1-11. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/935736>.
7. EUCAST Definitive document. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Infect. 1998, 4: 291-296.
8. Funke, G., von Graevenitz A., Clarridge J.E. et al. Clinical microbiology of coryneform bacteria. Clin. Microbiol. Rev. 1997, 10 (1): 125-159.
9. NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement M100-S9. 1999, 19 (1).
10. Ortiz-Pérez A., de Hijas N.Z.M., Esteban J. et al. High frequency of macrolide resistance mechanisms in clinical isolates of *Corynebacterium* species. Microb. Drug. Resist. 2010, 16 (4): 273-277.
11. Reddy B.S., Chaudhury A., Kalawat U. et al. Isolation, speciation, and antibiogram of clinically relevant non-diphtherial *Corynebacteria* (Diphtheroids). Indian J. Med. Microbiol. 2012, 30 (1): 52-57.

Поступила 15.07.16

Контактная информация: Харсеева Галина Георгиевна, д.м.н., проф., 344022, Ростов-на-Дону, Нахичеванский пер., 29, р.т. (863)250-41-09

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

Н.А.Селянская, С.В.Титова, С.Н.Головин, Л.А.Егуазарян, Л.М.Веркина, А.В.Тришина

ДЕЙСТВИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА БИОПЛЕНКИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ЭЛЬ ТОР

Ростовский-на-Дону противочумный институт

Цель. Изучение действия антибактериальных препаратов на биопленки холерных вибрионов Эль Тор. *Материалы и методы.* Определяли чувствительность *Vibrio cholerae* El Tor (6 штаммов) к различным концентрациям антибактериальных препаратов (доксисицилин, тетрацилин, левомицетин, рифампицин, гентамицин, цефтазидим) (МУК 4.2.2495-09). Для визуализации действия препаратов на биопленки использовали трансмиссионную электронную микроскопию. *Результаты.* Значения минимальных подавляющих концентраций антибактериальных препаратов в отношении биопленок увеличались в 5 — 100 раз по сравнению с планктонными культурами. При электронно-микроскопическом исследовании при действии антибактериальных препаратов на биопленки наблюдали некоторое сглаживание тяжелой между

бактериальной клеткой и субстратом, изменение формы вибрионов, снижение электронной плотности матрикса с повышением его прозрачности. *Заключение.* Изучение действия антибактериальных препаратов на биопленки может повысить эффективность рациональной антибиотикотерапии инфекций за счет выбора препаратов, нарушающих функционирование микробных сообществ.

Журн. микробиол., 2017, № 2, С. 8—15

Ключевые слова: холерные вибрионы, планктонная и биопленочная культуры, антибактериальные препараты, антибиотикорезистентность, электронно-микроскопическое исследование

N.A.Selyanskaya, S.V.Titova, S.N.Golovin, L.A.Egiazaryan, L.M.Verkina, A.V.Trishina

EFFECT OF ANTIBACTERIAL PREPARATIONS ON *VIBRIO CHOLERAE* EL TOR BIOFILMS

Rostov-on-Don Institute of Plague Control, Russia

Aim. Study the effect of antibacterial preparations on biofilms of *Vibrio cholerae* El Tor. *Materials and methods.* Sensitivity of *V. cholerae* El Tor (6 strains) to various concentrations of antibacterial preparations (doxycycline, tetracycline, levomycetin, rifampicin, gentamycin, ceftazidime) was determined (MD 4.2.2495-09). Transmission electron microscopy was used for visualization of the effect of preparations on biofilms. *Results.* The values of minimal inhibiting concentrations of antibacterial preparations against biofilms have increased by 5—100 times compared with plankton cultures. Certain smoothing of strands between the bacterial cell and substrate, alteration of vibrios' form, reduction of electron density of the matrix with an increase of its transparency were observed during electron-microscopy of the effect of antibacterial preparations on the biofilm. *Conclusion.* Study of the effect of antibacterial preparations on biofilms could increase effectiveness of rational antibiotics therapy of infections by selection of preparations that disrupt functioning of microbial communities.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 2, P. 8—15

Key words: cholera vibrios, plankton and biofilm cultures, antibacterial preparations, antibiotics resistance, electron-microscopy study

ВВЕДЕНИЕ

Использование антибактериальных препаратов для лечения холеры является необходимым дополнением патогенетической терапии, так как способствует сокращению периода диареи, выделения вибрионов, позволяет значительно уменьшить объем внутривенных вливаний солевых растворов и сроки медицинского наблюдения, помогает предотвратить формирование вибрионосительства [15]. В настоящее время в инструктивно-методических документах [3, 6] для лечения холеры рекомендовано использование доксициклина, тетрациклина, фторхинолонов, сульфаметоксазола/ триметоприма, левомицетина, аминогликозидов, а также их комбинаций с рифампицином и фуразолидоном. Несмотря на доказанную эффективность этих препаратов, в ряде случаев после курса терапии ими у больных холерой наблюдались бактериальные рецидивы [12]. В свете современных представлений об организации жизни холерных вибрионов в окружающей среде и в организме человека объяснение причин этого явления кроется в способности бактерий

образовывать биопленки, что повышает их устойчивость к различным неблагоприятным воздействиям, в том числе к антибактериальным препаратам [4, 16].

Отечественными и зарубежными учеными описаны морфологические особенности, механизмы, стадии формирования биопленок холерными вибрионами, а также факторы, влияющие на этот процесс [7, 9, 11, 17 — 19]. Однако не изучено действие на биопленки холерных вибрионов антибактериальных препаратов. Исследование их влияния на развитие и структуру биопленок является важным для разработки современных способов борьбы с холерой.

В связи с этим, целью настоящего исследования было изучение действия антибактериальных препаратов на биопленки холерных вибрионов Эль Тор.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штаммы *Vibrio cholerae* El Tor ctx+tcp+, выделенные от больных (Р-5879, 19667, 18826) и из воды (19241, 19613), полученные из Музея живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института.

Значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибактериальных препаратов для планктонных культур определяли методом двукратных серийных разведений в плотной питательной среде в соответствии с [2].

Формирование биопленки проводили способом, описанным в предыдущих работах [11], во флаконах с 30 мл стерильной водопроводной воды при комнатной температуре, используя в качестве твердого субстрата пластинки из пищевого пластика (0,5x1,5 см). Суспензию холерных вибрионов добавляли в конечной концентрации $n \times 10^4$ м.кл/мл по отраслевому стандарту мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича (ОСО-42-25-59-86 П). Для изучения антибиотико-чувствительности на третьи сутки культивирования пластинки с образовавшимися биопленками после трехкратного промывания в физиологическом растворе переносили в пенициллиновые флаконы с жидкой питательной средой (бульон Мартена, рН 7,7), содержащие антибактериальные препараты в концентрациях, равных значениям МПК для планктонных культур данных штаммов, а также превышающих их в 5, 10, 50, 100 раз. В контрольные пробы с биопленкой антибактериальный препарат не добавляли. Через 24 ч инкубирования в термостате (37°C) делали отпечатки биопленок и высеив 0,1 мл планктона на чашки Петри с агаром Мартена (рН 7,7). Результат учитывали через 24 часа по наличию или отсутствию роста холерных вибрионов.

В работе использовали антибактериальные препараты, рекомендуемые для этиотропной терапии холеры [3, 6].

Визуализацию действия антибактериальных препаратов на биопленки *V.cholerae* El Tor осуществляли просвечивающим электронным микроскопом Jeol JEM-1011, получая изображения при помощи CCD-rfvthsOlympus-SIS Veleta.

Для обработки образцов на электронном микроскопе был разработан комбинированный метод культивирования биопленок и дальнейшей их пробоподготовки, при котором минимально нарушается структура самой биопленки и максимально возможно визуализируются основные ее компоненты: внеклеточный матрикс и микробные клетки со свойственными им особенностями.

Биопленки выращивали непосредственно на медных сеточках для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) с формаровой пленкой-подложкой, смонтированных на предметных стеклах.

Приготовление пленок-подложек, монтаж опорных сеток и фиксацию их на предметные стекла производили при условиях работы с ПБА I — II группы патогенности в стерильных условиях в боксе микробиологической безопасности 2 класса. Стекло после специальной стерилизации с пленкой под углом 30° погружали в кристаллизатор с налитой до образования выпуклого мениска дистиллированной водой. При этом пленка отделяется от стекла и остается на поверхности воды. На плавающую пленку помещали опорные сеточки в количестве 4 — 5 штук. Таким образом, мы получали субстрат для формирования биопленок.

По достижении необходимой степени зрелости биопленки субстрат переносили в пенициллиновые флаконы с антибактериальными препаратами.

Для окраски полученного образца применяли схему, позволяющую проводить одновременную фиксацию образца с его обеззараживанием (глутаровый альдегид, тетраоксид осмия), контрастирование (тетраоксид осмия) и визуализацию матрикса биопленки (рутениевый красный, тетраоксид осмия). При использовании этого метода на первом этапе образуется связь между катионом рутениевого красного и анионными группами кислых полисахаридов, а при последующей обработке тетраоксидом осмия в окислительно-восстановительной реакции, катализируемой рутениевым красным, низшие окислы осмия осаждаются на окисленном субстрате. После высыхания опорные сетки с образцами отделяли пинцетом от предметного стекла, помещали в держатель и исследовали методом ТЭМ.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение МПК антибактериальных препаратов для планктонных культур показало чувствительность всех исследуемых штаммов к тетрациклину, доксициклину, гентамицину, левомицетину, цефтазидиму, рифампицину. По данным литературы, для достижения бактерицидного эффекта в отношении микроорганизмов, структурированных в биопленку, могут потребоваться концентрации антибактериальных препаратов, в несколько раз превышающие значения МПК для планктонных форм [13], в связи с чем, при изучении антибиотикочувствительности биопленочных культур антибактериальные препараты были использованы в концентрациях, равных их МПК для планктонных культур, а также в 5, 10, 50, 100 раз больше.

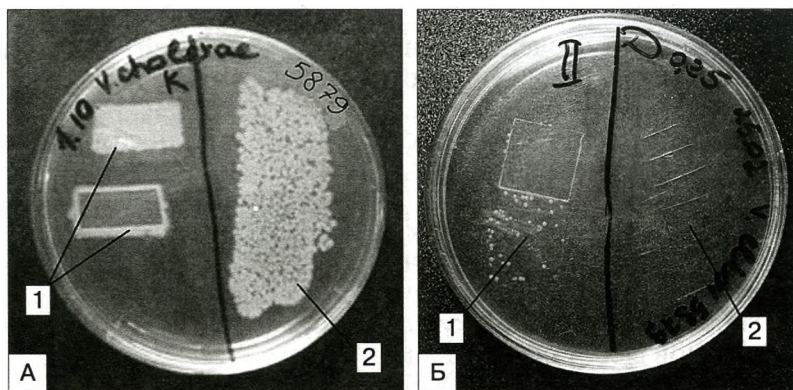


Рис. 1. Оценка жизнеспособности *V.cholerae* El Tor P-5879 в биопленочной (1) и планктонной формах (2).

А — без воздействия антибактериального препарата (контроль); Б — воздействие доксициклином в концентрации 0,25 мг/л (опыт).

Рост биопленок штаммов при воздействии разных концентраций антибактериальных препаратов

Антибактериальный препарат	Кол-во раз, превышающих МПК*	Штамм				
		P-5879	18826	19241	19613	19667
Доксициклин	1	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	-	-	+	-	+
	50	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-
Тетрациклин	1	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+
	50	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-
Левомецетин	1	+	+	+	+	+
	5	+	+	-	+	+
	10	+	+	-	+	+
	50	-	+	-	+	-
	100	-	-	-	-	-
Гентамицин	1	+	+	+	+	+
	5	-	-	-	+	+
	10	-	-	-	-	+
	50	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-
Рифампицин	1	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	-	+
	50	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-
Цефтазидим	1	+	+	+	+	+
	5	-	-	-	-	+
	10	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-

Примечание. * Для планктонных культур; + наличие роста; — отсутствие роста.

Антибиотикочувствительность биопленочных культур *V. cholerae* оказалась ниже, чем планктонных. Воздействие на биопленки изученных штаммов антибактериальных препаратов в концентрациях, равных МПК для планктонных клеток, не приводило к их гибели. На рис. 1 представлена оценка жизнеспособности *V. cholerae* El Tor P-5879 в биопленочной и планктонной формах без воздействия антибактериального препарата (контроль) и в присутствии доксициклина в концентрации 0,25 мг/л (МПК). В контроле наблюдали рост на агаре Мартена в отпечатках пластинок с биопленками в виде сплошного слива колоний. При высеве из планктона концентрация холерных вибрионов составляла 1×10^5 — 1×10^6 КОЕ/мл (рис. 1 А). Воздействие доксициклином приводило к гибели планктонной культуры штамма с сохранением жизнеспособности вибрионов в составе биопленки (1×10^2 — 1×10^3 КОЕ/мл) (рис. 1 Б).

Доксициклин вызывал гибель *V. cholerae* El Tor P-5879, 18826 и 19613 в концентрациях, превышающих МПК для планктонных культур этих штаммов в 5 раз, а *V. cholerae* El Tor 19241 и 19667 — в 50 раз (табл.). Биопленки изученных штаммов оказались в 50 раз менее чувствительными к тетрациклину и рифампицину, за исключением *V. cholerae* El Tor 19613, биопленки которого

утрачивали жизнеспособность при концентрациях, равных 10 МПК для планктонной культуры. К левомецетину наибольшую чувствительность продемонстрировали биопленки штамма 19241. Больше всего вызывающие гибель вибрионов в составе биопленок концентрации левомецетина (в 100 раз) увеличились в отношении штаммов *V.cholerae* El Tor 18826 и 19613. Концентрации гентамицина и цефтазидима, подавляющие рост биопленок, колебались от 5 МПК (для штаммов Р-5879, 18826, 19241) до 10 — 50 МПК (штамм 19667). Необходимо подчеркнуть, что в контрольных высевах планктонных культур и в отпечатках биопленок всех изученных штаммов, не подвергшихся воздействию антибактериальных препаратов, наблюдали стабильный рост холерных вибрионов.

ТЭМ позволила визуализировать результат воздействия антибактериальных препаратов на биопленки холерных вибрионов и показала, что в отсутствии антибактериальных препаратов биопленки имеют сложную структурную организацию и состоят из групп бактерий, адгезированных к поверхности и

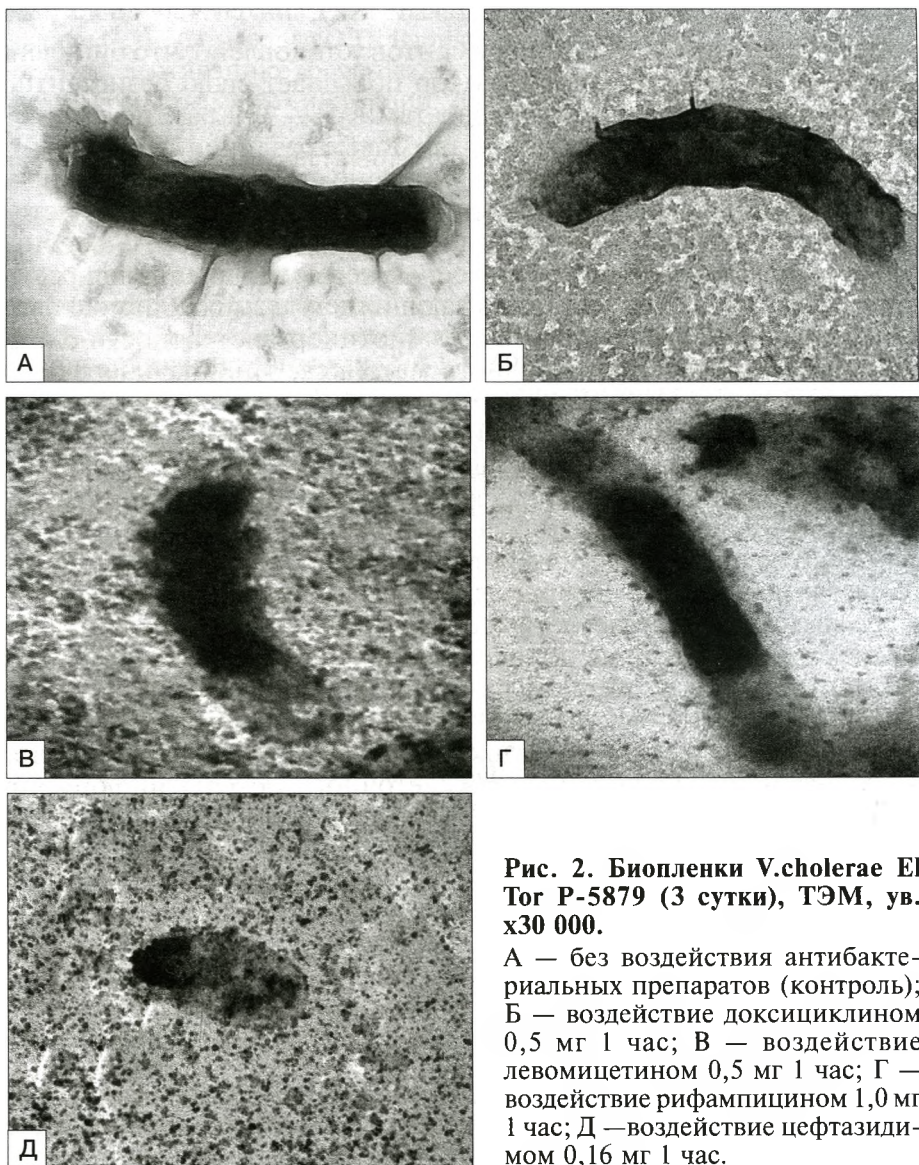


Рис. 2. Биопленки *V.cholerae* El Tor Р-5879 (3 сутки), ТЭМ, ув. х30 000.

А — без воздействия антибактериальных препаратов (контроль); Б — воздействие доксициклином 0,5 мг 1 час; В — воздействие левомецетином 0,5 мг 1 час; Г — воздействие рифампицином 1,0 мг 1 час; Д — воздействие цефтазидимом 0,16 мг 1 час.

окруженных густым аморфным веществом с многочисленными тяжами — внеклеточным матриксом (рис. 2).

Воздействие антибактериальных препаратов в течение 1 часа в концентрациях, соответствующих МПК для планктонных культур, не изменяло морфологию вибрионов в составе биопленок, а также не повреждало структуру матрикса. Однако наблюдали некоторое сглаживание тяжей между бактериальной клеткой и субстратом, особенно выраженное при воздействии левомицетином, рифампицином и цефтазидимом (рис. 2). При воздействии цефтазидимом также можно заметить некоторое округление формы вибрионов, снижение электронной плотности матрикса, повышение его прозрачности, как бы «истончение». Механизмом действия этого препарата является повреждение клеточной стенки бактерий, что, возможно, и вызвало изменение формы. В литературе описана способность препаратов с аналогичным механизмом действия частично подавлять образование биопленки [5].

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов установлено, что биопленочная популяция холерных вибрионов Эль Тор повышает свою резистентность к изученным антибактериальным препаратам в 5 — 100 раз, по сравнению с планктонными культурами, и имеет штаммовые различия. По данным литературы, сниженная чувствительность биопленок к антибактериальным препаратам связана с различием в метаболической активности и скорости роста отдельных клеток бактерий, наличием в популяциях клеток, способных выживать в стрессовых условиях, экспрессией невыявленных генов резистентности, образованием ферментов, вызывающих деградацию или модификацию антибиотиков [8]. Одной из причин антибиотикорезистентности биопленок является наличие экзополисахаридного матрикса, защищающего бактерии. Способность проникать через этот барьер или разрушать его является важным показателем эффективности того или иного антибактериального препарата [10]. Некоторые антибиотики, влияющие на синтез белка, имитируют действие стрессовых факторов, вызывающих формирование биопленки, стимулируют образование внеклеточного матрикса и биопленок [9, 14].

Современные представления о роли биопленок в патогенезе инфекционных заболеваний требуют новых подходов к их диагностике и лечению. В настоящее время ведется разработка новых антибиотиков, изменение тактики антибиотикотерапии, а также поиск ингибиторов межклеточной сигнализации, ферментов и других методов разрушения биопленок. Терапевтическое действие на биопленки может быть направлено на механизмы первичной адгезии бактерий к поверхности, блокирование синтеза или разрушения полимерного матрикса, нарушение межклеточного обмена информацией, а также оно может сочетаться с собственно бактерицидными агентами [1]. Изучение действия антибактериальных препаратов на биопленки может повысить эффективность рациональной антибиотикотерапии инфекций за счет выбора препаратов, нарушающих функционирование микробных сообществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Голуб А.В. Бактериальные биопленки — новая цель терапии? *Клин.микробиол. и антимикроб. химиотер.* 2012, 1:23-29.
2. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. МУ 4.2.2495-09. М., 2009.

3. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.1.2521-09. М., Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2009.
4. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина. Журн. микробиол. 2011, 3: 99-109.
5. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Орлова О.Г. и др. Избирательное действие ингибиторзащищенных аминопенициллинов на бактериальные биопленки эшерихий, стафилококков и лактобацилл. Лечение и профилактика. 2013, 4 (8): 29-33.
6. Санитарная охрана территории. Организация, обеспечение и оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий в случае завоза или возникновения особо опасных инфекций, контагиозных вирусных геморрагических лихорадок, инфекционных болезней неясной этиологии, представляющих опасность для населения РФ и международного сообщения. МУ 3.4.1030. М., 2001.
7. Сизова Ю.В., Черепяхина И.Я., Балахнова В.В., Бурлакова О.С., Сизова Е.В., Помухина О.И., Фецайлова О.П. Вариабельность свойств, характеризующих способность к выживанию холерных вибрионов, в биопленочных сообществах. Проблемы особо опасных инфекций. 2012, 3: 54-57.
8. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбекян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок. Микробиология. 2010, 4: 1-12.
9. Татаренко О.А., Алексеева Л.П., Телесманич Н.Р., Шестиалтынова И.С., Чемисова О.С., Маркина О.В., Непомнящая Н.Б., Ускова Н.Н. Влияние некоторых факторов на формирование биопленки токсигенными и атоксигенными холерными вибрионами эль-тор. Эпидемиол. и инф. болезни. 2012, 5: 36-40.
10. Тец В.В., Тец Г.В. Микробные биопленки и проблемы антибиотикотерапии. Пульмонология и аллергология. 2013, 4: 60-64.
11. Титова С.В., Кушнарёва Е.В. Оценка способности холерных вибрионов к образованию биопленок *in vitro* с помощью нового методического подхода. Фундаментальные исследования. 2014, 10: 375-379.
12. Турьянов М.Х., Царегородцев А.Д., Петров В.А. и др. Организация медицинских мероприятий по ликвидации крупного очага холеры в Дагестане. Эпидемиол. и инф. болезни. 1996, 3: 15-17.
13. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012, 14 (1):51-58.
14. Kaplan J.B. Antibiotic-induced biofilm formation. Int. J. Artif. Organs. 2011, 34: 737-751.
15. Leibovici-Weissman Y., Neuberger A., Bitterman R. et al. Antimicrobial drugs for treating cholera. Cochrane Database Syst. Rev. 2014, 6:8625.
16. Sadvskaya I., Vinogradov E., Li J. et al. High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the *ndvB* gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated β -(1-3)-glucans, which bind aminoglycosides. Glycobiology. 2010, 20: 895-904.
17. Sun S., Tay Q.X.M., Kjelleberg S. et al. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. ISME J. 2015, 9 (8): 1812-1820.
18. Tamayo R., Patimalla B., Camilli A. Growth in biofilm induces a hyperinfectious phenotype in *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. 2010, 78 (8): 3560-3569.
19. Townsley L., Yildiz F.H. Temperature affects c-di-GMP signalling and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. Environ. Microbiol. 2015, 17 (11): 4290-305.

Поступила 05.10.16

Контактная информация: Селянская Надежда Александровна, к.м.н., 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40, р.т. (863)234-23-11