

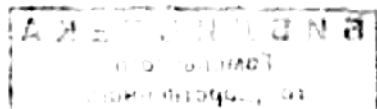
© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

*Л.В.Лагун, Ю.В.Атанасова, Д.В.Танальский*

## **ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК У ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРОГО И ХРОНИЧЕСКОГО ПИЕЛОНЕФРИТА**

Гомельский государственный медицинский университет, Республика Беларусь

**Цель.** Изучение интенсивности формирования микробных биопленок штаммами *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, выделенными при различных формах пиелонефрита. **Материалы и методы.** В исследование включено 150 клинических изолятов микроорганизмов, выделенных из мочи пациентов с острым и хроническим пиелонефритом. Определение интенсивности пленкообразования проводили путем окрашивания сформированных биопленок кристаллическим фиолетовым с последующей экстракцией красителя и измерением его концентрации в отмывочном растворе. **Результаты.** Среди возбудителей пиелонефрита максимальной пленкообразующей способностью обладали изоляты *P. aeruginosa*. Интенсивность формирования биопленок данных изолятов была в 2 — 3 раза выше, чем



у штаммов стафилококков и энтеробактерий. Штаммы, выделенные от больных хроническим пиелонефритом, по способности формирования биопленок значительно превосходили штаммы, выделенные от больных острым пиелонефритом. Отмечена более высокая способность к формированию микробных биопленок для микроорганизмов — возбудителей пиелонефрита, протекающего на фоне мочекаменной болезни. **Заключение.** Способность к формированию биопленки определяется как видом возбудителя, так и характером инфекционного процесса, в котором участвует данный микроорганизм. Интенсивное образование биопленок клиническими изолятами *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* может являться важным фактором хронизации инфекций мочевыделительного тракта.

Журн. микробиол., 2013, № 3, С. 18–23

Ключевые слова: биопленки, энтеробактерии, стафилококки, *Pseudomonas aeruginosa*, острые и хронический пиелонефрит

*L.V.Lagun, Yu.V.Atanasova, D.V.Tapalsky*

## FORMATION OF MICROBIAL BIOFILMS IN CAUSATIVE AGENTS OF ACUTE AND CHRONIC PYELONEPHRITIS

Gomel State Medical University, Republic of Belarus

**Aim.** Study the intensity of formation of microbial biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* strains isolated during various forms of pyelonephritis. **Materials and methods.** 150 clinical isolates of microorganisms isolated from urine of patients with acute and chronic pyelonephritis were included into the study. Determination of intensity of film-formation was carried out by staining of the formed biofilms by crystal violet with consequent extraction of the dye and measurement of its concentration in washout solution. **Results.** Among causative agents of pyelonephritis *P. aeruginosa* isolates had the maximum film-forming ability. The intensity of biofilm formation of these isolates was 2–3 time higher than staphylococcus and enterobacteria strains. Strains isolated from patients with chronic pyelonephritis by ability to form biofilms significantly surpassed strains isolated from acute pyelonephritis patients. A higher ability to form microbial biofilms for microorganisms — causative agents of pyelonephritis progressing against the background of urolithiasis was noted. **Conclusion.** The ability to form biofilms is determined by both causative agent species and character of the infectious process in which this microorganism participates. Intensive formation of biofilms by *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* clinical isolates may be an important factor of chronization of urinary tract infections.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2013, No. 3, P. 18–23

Key words: biofilms, enterobacteria, staphylococci, *Pseudomonas aeruginosa*, acute and chronic pyelonephritis

## ВВЕДЕНИЕ

Считается, что более 65% всех инфекционных заболеваний обусловлено микроорганизмами, существующими в форме биопленок [1, 7]. К числу заболеваний, связанных с присутствием биопленок, относятся и инфекции мочевыводящих путей (пиелонефрит, цистит, мочекаменная болезнь), вызванные *E. coli*, *P. aeruginosa* и другими условно патогенными бактериями [5, 6]. Инфекции мочевыводящих путей относятся к наиболее распространенным заболеваниям как в амбулаторной, так и во внутрибольничной практике. Первое место по частоте среди болезней почек занимает пиелонефрит. Заболевание широко распространено среди взрослого и детского населения. Увеличение заболеваемости пиело-

нефритом связано с возросшей вирулентностью микроорганизмов, повышением их устойчивости к антибактериальным препаратам [2].

Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о том, что хронические инфекции принципиально отличаются от острых, а формирование микробных биопленок при хронических инфекциях требует совершенно иных подходов к их диагностике и лечению. Для практической медицины особенно важно, что бактерии в биопленках обладают повышенной выживаемостью в присутствии агрессивных веществ, факторов иммунной защиты макроорганизма и антибактериальных препаратов [4]. Биопленки могут осложнять течение заболеваний почек. Планктонные бактерии могут достигать почек восходящим путем и способны прикрепляться к уроэпителию и почечным сосочкам. Бактериальная адгезия является ключевым моментом в колонизации тканевых поверхностей организма-хозяина. Мочевыводящие пути человека подчиняются силам гидродинамики, и адгезия микроорганизмов к уроэпителию дает им возможность противостоять удалению потоком мочи. Бактериальная адгезия не только способствует колонизации, но также благоприятствует инвазии микроорганизмов, формированию биопленок и повреждению клеток хозяина с развитием пиелонефрита. Инородные тела в мочевыводящих путях (катетеры, стенты, дренажи, камни) становятся дополнительными очагами инфекции для организма [3, 5].

В генезе камнеобразования при мочекаменной болезни немаловажную роль играет инфекция, локализуемая как в почечной ткани, так и в мочевыводящих путях. Чаще всего это пиелонефрит, который, наслаиваясь на врожденные и приобретенные тубулопатии, играет существенную роль в образовании конкрементов. В соответствии с одной из теорий патогенеза мочекаменной болезни (теория матрицы) процесс камнеобразования начинается с формирования белкового ядра, на котором затем откладываются соли. При этом органическая матрица обычно представлена мукопротеином, который является ядром почечного камня, вокруг которого и происходит кристаллизация мочевых солей. Ядром камнеобразования в ряде случаев может выступать микробная биопленка. Около 30% камней являются инфекционными. Появлению ядер камнеобразования способствует возникновение участков поражения слизистой оболочки мочевых путей под действием бактерий или их токсинов. За счет изменения защитного слоя уроэпителия и формирования на нем микробных биопленок в 5 — 6 раз увеличивается адгезия струвитных кристаллов. Роль уреазопroduцирующих бактерий (*Proteus*, *Providencia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и др.) в генезе нефролитиаза заключается в том, что под воздействием бактериальной уреазы расщепляются молекулы мочевины с образованием аммиака, что приводит к ощелачиванию мочи. При щелочной реакции мочи замедляется растворимость кристаллических элементов и создаются благоприятные условия для выпадения их в осадок. Происходит кристаллизация струвита и апатита, находящихся в экзополимерном матриксе в биопленке. Таким образом, микробные биопленки способствуют кристаллизации конкрементов из мочи [5, 6].

Периодическое высвобождение планктонных форм бактерий из биопленки в поток мочи служит источником поддержания хронического инфекционного и воспалительного процесса в почках.

Цель исследования — изучить интенсивность формирования микробных биопленок штаммами *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, выделенными при различных формах пиелонефрита.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены 150 клинических изолятов (69 — *E. coli*, 56 — *P. aeruginosa*, 15 — *S. aureus*, 10 — *K. pneumoniae*), выделенных из мочи пациентов с острым и хроническим пиелонефритом, госпитализированных в урологическое отделение Гомельской областной клинической больницы. Уровень бактериурии составил  $5 \times 10^5$  —  $10^8$  КОЕ/мл.

Из 69 клинических изолятов *E. coli* 27 изолятов были выделены от больных острым пиелонефритом (ОП) и 42 изолята — от больных хроническим пиелонефритом (ХП); из 56 изолятов *P. aeruginosa* — соответственно 15 и 41, из 15 изолятов *S. aureus* — 8 и 7, из 10 изолятов *K. pneumoniae* — 4 и 6. У 55 (36,7%) пациентов пиелонефрит протекал на фоне мочекаменной болезни и был вызван энтеробактериями ( $n=25$ ), синегнойной палочкой ( $n=28$ ) и золотистым стафилококком ( $n=2$ ).

В исследовании использовали суточные культуры, выращенные на агаре Мюллера-Хинтона (HiMedia, Индия). Для количественного учета интенсивности пленкообразования из суточных культур исследуемых штаммов в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия готовили суспензии с оптической плотностью 0,5 МакФарланд. Вносили по 20 мкл бактериальной суспензии в пробирки типа эппендорф с 1 мл питательного бульона (HiMedia, Индия), расчетная начальная концентрация бактерий в бульоне составила  $3 \times 10^6$  клеток/мл. Посевы инкубировали при непрерывном низкоамплитудном встряхивании в шейкере-инкубаторе при 37°C в течение 24 ч, после чего бульонную культуру осторожно удаляли и вносили в пробирки 1 мл 0,1% водного раствора кристаллического фиолетового для окрашивания сформированных биопленок. Окрашивание проводили при 37°C в течение 30 мин. Далее, полностью удалив из пробирок раствор кристаллического фиолетового, проводили экстракцию красителя из биопленки в 1 мл 96% этанола в течении 1 часа при комнатной температуре. Для построения калибровочной кривой готовили контрольные образцы (спиртовые растворы кристаллического фиолетового с концентрацией 2, 10, 25 и 50 мг/л). Контрольные и опытные образцы вносили в объеме 100 мкл в лунки 96-луночного плоскодонного полистиролового планшета, измерение концентрации кристаллического фиолетового проводили на иммуноферментном анализаторе АИФ-М/340 при длине волны 570 нм.

Для количественной оценки толщины сформированных биопленок использовали концентрацию кристаллического фиолетового в отмывочных спиртовых растворах и массу красителя, сорбированного биопленкой. Считали, что биомасса сформированных биопленок прямо пропорциональна концентрации кристаллического фиолетового в отмывочных растворах, массу биопленки представляли как массу красителя, поглощенного биопленкой при окрашивании.

Статистическая обработка полученных результатов выполнена с использованием программы Microsoft Office Excel 2007 и пакета статистического анализа данных Statistica+. Рассчитывали критерий значимости Стьюдента ( $t$ ), статистически значимой считалась 95% вероятность различий ( $p < 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Все клинические изоляты *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* обладали выраженной способностью к образованию биопленок. Результаты определения интенсивности формирования микробных биопленок

Таблица 1. Сравнительная характеристика пленкообразования у возбудителей острого и хронического пиелонефрита

Микроорганизмы Форма болезни	Масса красителя, сорбированного биопленкой, мкг			
	E.coli	K.pneumoniae	P.aeruginosa	S.aureus
ОП (1)	n=27 4,61±0,21	n=4 5,82±0,93	n=15 10,47±1,17	n=8 5,09±0,30
ХП (2)	n=42 7,72±0,45 t <sub>(1-2)</sub> =6,31 p <sub>(1-2)</sub> <0,0001	n=6 11,94±1,88 t <sub>(1-2)</sub> =2,92 p <sub>(1-2)</sub> =0,0222	n=41 21,09±1,25 t <sub>(1-2)</sub> =6,20 p <sub>(1-2)</sub> <0,0001	n=7 6,19±0,32 t <sub>(1-2)</sub> =2,47 p <sub>(1-2)</sub> =0,0279

Таблица 2. Сравнительная характеристика пленкообразования у возбудителей пиелонефрита в зависимости от сопутствующей мочекаменной болезни

Форма болезни Микроорганизмы	Масса красителя, сорбированного биопленкой, мкг	
	Пиелонефрит с МКБ	Пиелонефрит без МКБ
Энтеробактерии	n=25 8,92±0,76	n=54 5,94±0,33
		t=3,58; p=0,0011
P. aeruginosa	n=28 20,43±1,83	n=28 16,06±1,31
		t=1,94; p=0,0579
S. aureus	n=2 5,72±0,55	n=13 5,58±0,29
		t=0,22; p=0,8437

возбудителями острого и хронического пиелонефрита представлены в табл. 1.

Среди возбудителей острого пиелонефрита максимальной пленкообразующей активностью обладали штаммы *P. aeruginosa*, пленкообразующая способность которых в 2 — 3 раза превосходила способность к формированию биопленок у штаммов энтеробактерий и стафилококков. Та же тенденция выявлена и среди возбудителей хронического пиелонефрита.

Для изолятов микроорганизмов, выделенных от больных хроническим пиелонефритом, обнаружено значительное преобладание пленкообразующей активности по сравнению с микроорганизмами, выделенными при остром пиелонефрите. Различия статистически значимы для штаммов *E. coli* ( $p < 0,0001$ ), *P. aeruginosa* ( $p < 0,0001$ ), *K. pneumoniae* ( $p < 0,05$ ), *S. aureus* ( $p < 0,05$ ).

Результаты определения интенсивности формирования микробных биопленок возбудителями пиелонефрита в зависимости от сопутствующей мочекаменной болезни (МКБ) представлены в табл. 2. Возбудители, выделенные от больных пиелонефритом с сопутствующей мочекаменной болезнью, в целом отличались большей способностью к пленкообразованию, по сравнению с возбудителями инфекций, протекающих без уролитиаза; различия статистически значимы для энтеробактерий ( $p = 0,0011$ ), отсутствие статисти-

чески значимых различий для штаммов *P. aeruginosa* и *S. aureus*, возможно, связано с небольшим объемом выборки.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Микроорганизмы, участвующие в патологических процессах, существуют в виде сложных микробных сообществ. В составе биопленок бактерии длительно сохраняются в организме хозяина и становятся устойчивыми к действию различных антибактериальных факторов. Способность к формированию биопленки определяется не только видом возбудителя, но также и характером инфекционного процесса, в котором участвует данный микроорганизм. В настоящем исследовании показано, что среди возбудителей как острого, так и хронического пиелонефрита максимальной пленкообразующей способностью обладали изоляты *P. aeruginosa*, интенсивность формирования биопленок которыми была в 2 — 3 раза выше, чем у штаммов стафилококков и энтеробактерий. Штаммы *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, выделенные от больных хроническим пиелонефритом, по способности формирования биопленок превосходили штаммы, выделенные от больных острым пиелонефритом. Отмечена более высокая способность к формированию микробных биопленок для микроорганизмов — возбудителей пиелонефрита, протекающего на фоне мочекаменной болезни.

Можно предположить, что интенсивное образования биопленок клиническими изолятами *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* является важным фактором хронизации инфекций мочевыделительного тракта и требует пересмотра принципов терапии хронических инфекций мочевыделительной системы с внедрением методов, направленных на предотвращение формирования или разрушение уже сформированной биопленки.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и в организме хозяина. Журн. микробиол. 2011, 3: 99-109.
2. Саркулова М.Н. Характер и этиологическая структура внутрибольничной инфекции у урологических больных. Урология. 2006, 1: 19-22.
3. Choong S., Whitfield H. Biofilms and their role in infections in urology. BJU International. 2000, 86: 935-941.
4. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 2001, 45 (4): 999-1007.
5. Tenke P., Koves B., Nagy K. et al. Update on biofilm infections in the urinary tract. World J. Urol. 2012, 30: 51-57.
6. Tenke P., Koves B., Jackel M. et al. The role of biofilm infection in urology. World J. Urol. 2006, 24: 13-20.
7. Wathick P., Kolter R. Biofilm, city of microbes. J. Bacteriol. 2000, 182: 2675-2679.

*Поступила 23.10.12*

Контактная информация: Лагун Людмила Васильевна,  
246000, Республика Беларусь, Гомель, ул.Ланге, 5