

Л. В. Лагун¹, Д. В. Тапальский¹, С. В. Жаворонок²

ИНТЕНСИВНОСТЬ ОБРАЗОВАНИЯ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК МИКРООРГАНИЗМАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ПРИ ПИЕЛОНЕФРИТАХ И МОЧЕКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ

УО «Гомельский государственный медицинский университет»¹,

УО «Белорусский государственный медицинский университет»²

Свойством микроорганизмов-возбудителей пиелонефритов является способность к формированию биопленки, структура и физиологические свойства которой обеспечивают повышение устойчивости к антибиотикам, антисептикам и влиянию со стороны иммунной системы макроорганизма.

Изучена способность к формированию биопленок у возбудителей острых и хронических пиелонефритов. Штаммы *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, выделенные от больных хроническим пиелонефритом, по способности формирования биопленок значительно превосходили штаммы, выделенные от больных острым пиелонефритом. Максимальной пленкообразующей способностью обладали isolates *P. aeruginosa*. Интенсивность формирования биопленок была выше у штаммов микроорганизмов, выделенных от больных пиелонефритами с сопутствующей мочекаменной болезнью.

Ключевые слова: биопленки, энтеробактерии, *Pseudomonas aeruginosa*, стафилококки, пиелонефриты, мочекаменная болезнь.

L. V. Lagun¹, D. V. Tapalski¹, S. V. Zhavoronok²

INTENSITY OF FORMATION OF MICROBIAL BIOFILMS BY MICROORGANISMS ISOLATED AT PYELONEPHRITISES AND UROLITHIASIS

The characteristics of etiologic agents of pyelonephritises are ability to form biofilm, the structure and physiological nature of which provide decreased susceptibility to antibiotics, antiseptics, and to immune system.

The article presents the estimation of ability to form of biofilms of etiologic agents of acute and chronic pyelonephritises. The bacterial strains *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, isolated from patients with chronic pyelonephritis by ability to form biofilms have surpassed than the strains isolated from patients with acute pyelonephritis. The maximum film-forming ability *P. aeruginosa* isolates are possessed. Intensity of formation of biofilms was above by strains of microorganisms isolated from patients with pyelonephritises with accompanying of urolithiasis.

Key words: biofilms, enterobacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, staphylococci, pyelonephritises, urolithiasis.

Открытие и изучение биопленок является одним из наиболее важных достижений медицинской и клинической микробиологии последних лет. В настоящее время

считается, что более 65% всех инфекционных заболеваний обусловлены микроорганизмами, существующими в форме биопленок [1, 9]. Концепция биопленок затра-

поставляет инфекционные поражения большинства органов (верхних дыхательных путей, легких, сердца, почек, кожи, костей, системы пищеварения) и практически всех искусственных имплантатов. К числу заболеваний, связанных с присутствием биопленок, относятся и инфекции мочевыводящих путей (пиелонефрит, цистит, мочекаменная болезнь) [4, 7]. 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 пиелонефритом связано не только с улучшением диагностики этого заболевания, но и с возросшей вирулентностью микроорганизмов, повышением их устойчивости к антибактериальным препаратам [2]. При инфекциях мочевыводящих путей отмечается высокий уровень рецидивов инфекции, которая принимает хронический характер с частыми обострениями.

Образование биопленок – один из факторов патогенности микроорганизмов. Биопленка – сообщество микроорганизмов, которые прикреплены к поверхности или друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, имеют измененный фенотип, проявляющийся другими параметрами роста и экспрессии специфических генов. Бактериальные биопленки могут быть образованы бактериями одного или нескольких видов и состоять как из активно функционирующих клеток, так и из покоящихся или некультивируемых форм. Биопленка как сообщество микроорганизмов формирует единую генетическую систему в виде плазмид – мобильных кольцевых низкомолекулярных ДНК, несущих поведенческий код для членов биопленки, определяющих их трофические, энергетические и другие связи между собой и окружающей средой – в частности, иммунокомпетентным организмом. Последнее получило специальное определение как социальное поведение микроорганизмов – так называемый «quorum sensing». Этот механизм позволяет бактериям действовать коллективно, подобно клеткам в многоклеточном организме. Считается доказанным, что социальное поведение микробов биопленки повышает вирулентность и патогенность всех возбудителей [1, 5, 9].

Существование бактерий внутри биопленок обеспечивает им много преимуществ по сравнению с изолированными клетками. Для практической медицины особенно важно, что бактерии в биопленках обладают повышенной выживаемостью в присутствии агрессивных веществ, факторов иммунной защиты макроорганизма и антибактериальных препаратов [6]. Биопленки могут осложнять течение заболеваний почек. Планктонные бактерии могут достигать почек восходящим путем и способны прикрепляться к уроэпителию и почечным сосочкам в почечных собирательных системах. Бактериальная адгезия является основным моментом в колонизации тканевых поверхностей организма-хозяина. Мочевые 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. Биопленки на поверхности уроэпителия легче поддаются эрадикации антимикробными агентами по сравнению с биопленками, которые образуются на чужеродных объектах, находящихся в мочевыводительной системе. Инородное

тело в мочевых путях (катетеры, стенты, дренажи, камни) становится очагом инфекции для организма, что приводит к развитию осложненных инфекций мочевыводительной системы [4, 7]. Периодическое высвобождение планктонных форм бактерий из биопленки в поток мочи служит источником поддержания хронического инфекционного и воспалительного процесса в почках.

Бактерии, инфицирующие мочевыводящие пути, не только поддерживают хроническую инфекцию за счет повышенной устойчивости биопленок к терапии, но и способствуют камнеобразованию. Инфекция, локализуясь как в почечной ткани, так и в мочевых путях, является важным патогенетическим звеном в генезе камнеобразования при мочекаменной болезни. 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 камня в ряде случаев может быть и микробная биопленка. Около 30% камней являются инфекционными. Появлению микробных ядер камнеобразования способствует возникновение под воздействием бактериальной инфекции или ее токсинов участков поражения слизистой оболочки мочевых путей. За счет изменения защитного слоя уроэпителия и формирования на нем микробных биопленок в 5–6 раз увеличивается адгезия струвитных кристаллов. Роль уреазопродуцирующих бактерий (*Proteus spp.*, *Ureaplasma urealyticum*, *Providencia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* и др.) в генезе нефролитиаза заключается в том, что под воздействием бактериальной уреазы расщепляются молекулы мочевины с образованием аммиака. Это приводит к изменению кислой реакции мочи на щелочную, то есть происходит ощелачивание мочи. Реакция мочи имеет существенное значение в образовании камней. При щелочной реакции мочи замедляется растворимость кристаллических элементов и создаются благоприятные условия для выпадения их в осадок. При этом происходит оседание струвита и апатита, заключенных в экзополимерном матриксе в биопленке. Таким образом, микробные биопленки способствуют кристаллизации конкрементов из мочи [3, 8].

Цель исследования – изучить интенсивность формирования микробных биопленок штаммами *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, выделенными при острых и хронических пиелонефритах.

Материалы и методы

В исследование включено 150 клинических изолятов (69 – *Escherichia coli*, 56 – *Pseudomonas aeruginosa*, 15 – *Staphylococcus aureus*, 10 – *Klebsiella pneumoniae*), выделенных из мочи пациентов с острым и хроническим пиелонефритом, госпитализированных в урологическое отделение Гомельской областной клинической больницы. Уровень бактериурии составил $5 \cdot 10^5$ – 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 ($n = 2$).

Оригинальные научные публикации

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 3×10^6 клеток/мл. Посевы инкубировали 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 концентраций кристаллического фиолетового проводили на иммуноферментном анализаторе АИФ-М/340, длина волны 570 нм.

Для количественной оценки толщины сформированных биопленок использовали концентрации 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 статистического модуля программы Microsoft Office Excel 2007. Применялись методы описательной статистики – вычислялись среднее арифметическое значение (M) и стандартная ошибка среднего арифметического значения (m). Рассчитывали критерий значимости Стьюдента (t), статистически значимой считалась 95% вероятность различий ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Все клинические изоляты *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *S. aureus* обладали выраженной способностью к образованию биопленок. Для изолятов *E. coli* концентрации кристаллического фиолетового в отмывочных растворах находились в диапазоне 3,35–17,11 мг/л, для изолятов *K. pneumoniae* – 4,45–18,79 мг/л, *P. aeruginosa* – 3,36–56,0 мг/л, *S. aureus* – 4,21–7,74 мг/л. Результаты определения интенсивности формирования микробных биопленок возбудителями острых и хронических пиелонефритов представлены на рисунке 1.

Среди возбудителей острых пиелонефритов максимальной пленкообразующей способностью 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 хронических пиелонефритов – максимальной способностью к пленкообразованию обладали штаммы *P. aeruginosa*. Для изолятов микроорганизмов, выделенных от больных хроническими пиелонефритами, обнаружено значительное преобладание пленкообразующей активности по сравнению

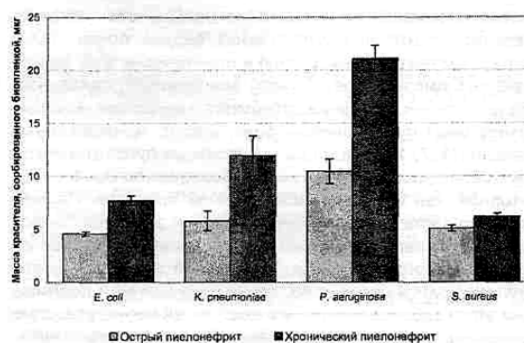


Рисунок 1. Сравнительная характеристика пленкообразующей способности микроорганизмов-возбудителей острых и хронических пиелонефритов

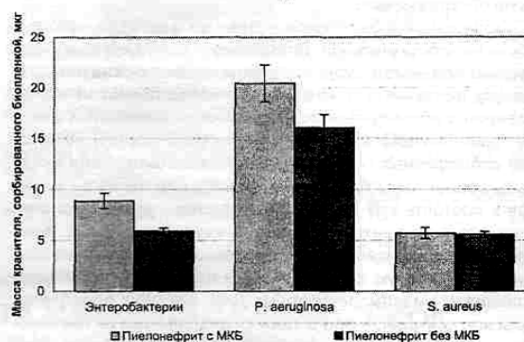


Рисунок 2. Сравнительная характеристика пленкообразующей способности микроорганизмов-возбудителей пиелонефритов в зависимости от сопутствующей мочекаменной болезни

с микроорганизмами, выделенными при острых пиелонефритах. Различия статистически значимы для штаммов *E. coli* ($p < 0,0001$), *P. aeruginosa* ($p < 0,0001$), *K. pneumoniae* ($0,0222$), *S. aureus* ($= 0,0279$).

Результаты определения интенсивности формирования микробных биопленок возбудителями пиелонефритов в зависимости от сопутствующей мочекаменной болезни (МКБ) представлены на рисунке 2.

Возбудители, выделенные от больных пиелонефритами 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 статистически значимых различий для штаммов *P. aeruginosa* и *S. aureus* возможно связано с небольшим объемом выборки.

Таким образом, 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 исследовании показано, что среди возбудителей как острых, так и хронических пиелонефритов максимальной пленкообразующей способностью обладали изоляты *P. aeruginosa*.

Штабмы *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, выделенные от больных хроническим пиелонефритом, по способности формирования биопленок превосходили штаммы, выделенные от больных острым пиелонефритом. Можно предположить, что интенсивное образования биопленок клиническими изолятами *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* является важным фактором хронизации инфекций мочевыделительного тракта. Образование биопленок относится к факторам персистенции, которые играют значительную роль в этиологии и патогенезе хронических инфекционных процессов. Персистенция – стратегия выживания патогенных и условно-патогенных микроорганизмов в организме хозяина. Интенсивность формирования биопленок также была наиболее выражена у микроорганизмов, выделенных от больных пиелонефритами, протекавшими на фоне сопутствующей мочекаменной болезни.

Таким образом, можем предположить, что почечные камни как инородные тела могут содействовать образованию микробной биопленки. Следствием защищенности микроорганизмов, находящихся в биопленке, является их устойчивость к антимикробным препаратам, что значительно усложняет терапию хронических и рецидивирующих инфекций. Осмысление этих процессов заставляет пересмотреть принципы лечения хронических инфекций мочевыделительной системы.

Литература

1. Романова, Ю. М., Гинцбург А. Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и в организме хозяина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 3. – С. 99–109.
2. Саркулова, М. Н. Характер и этиологическая структура внутрибольничной инфекции у урологических больных / М. Н. Саркулова // Урология. – 2006. – № 1. – С. 19–22.
3. Толордава, Э. Р., Тиганова И. Г. и др. Микрофлора почечных камней при мочекаменной болезни и поиск средств борьбы с биопленками уропатогенных бактерий // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2012. – № 4. – С. 56–62.
4. Choong, S., Whitfield H. Biofilms and their role in infections in urology // BJU International. – 2000. – Vol. 86. – P. 935–941.
5. Donlan, R. M., Costerton J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // Clin Microbiol Rev. – 2002. – Vol. 15. – P. 167–193.
6. Lewis, K. Riddle of biofilm resistance // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2001. – Vol. 45 (4). – P. 999–1007.
7. Tenke, P., Koves B., Nagy K. et al. Update on biofilm infections in the urinary tract // World Journal of Urology. – 2012. – Vol. 30. – P. 51–57.
8. Tenke, P., Kovacs B., Jackel M. et al. The role of biofilm infection in urology // World Journal of Urology. – 2006. – Vol. 24. – P. 13–20.
9. Wathick, P., Kolter R. Biofilm, city of microbes // Journal of Bacteriology. – 2000. – Vol. 182. – P. 2675–79.

Поступила 1.10.2012 г.