

© ЛЕОНОВ В.В., МИРОНОВ А.Ю., 2016

УДК 612.126:546.72:579.22

Леонов В.В.¹, Миронов А.Ю.²

БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ ОППОРТУНИСТИЧЕСКИХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОДЕРЖАНИЯ ЖЕЛЕЗА

¹БУ ВО ХМАО-Югры «Ханты-Мансийская государственная медицинская академия», 628011, Ханты-Мансийск;²ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва

Изучено биопленкообразование приоритетных оппортунистических патогенов в плазме крови и LB-бульоне. В сравнении с LB-бульоном плазма крови стимулирует биопленкообразование микроорганизмов в последовательности: Staphylococcus aureus > Pseudomonas aeruginosa > Escherichia coli. Методом ИК-спектроскопии биопленок выявлено, что плазма крови способствует образованию наружных экзополисахаридов S. aureus. Культивирование биопленок в плазме в зависимости от содержания железа показало, что исследованные штаммы S. aureus, P. aeruginosa, E. coli лучше образуют биопленки в плазме с нормальным содержанием железа, железodefицитная и нагруженная железом плазма уменьшает их биопленкообразующую активность.

Ключевые слова: биопленки, биопленкообразование, ИК-спектроскопия, плазма крови, сывороточное железо, экзополимерный матрикс, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (1): 52–54.

Leonov V.V.¹, Mironov A.Yu.²

THE FORMATION OF BIOFILM IN OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS IN BLOOD PLASMA DEPENDING ON CONTENT OF IRON

¹The Khanti-Mansiiskaia state medical academy, 628011 Khanti-Mansiisk, Russia; ²G.N. Gabrichevskii Moscow research institute of epidemiology and microbiology of Rospotrebnadzor, 125212 Moscow, Russia

The article considers results of analysis of formation of biofilm of priority opportunistic pathogens in blood plasma and LB-broth. As compared with LB-broth, blood plasma stimulates formation of biofilm of microorganisms in the following sequence: Staphylococcus aureus > Pseudomonas aeruginosa > Escherichia coli. The application of technique of infra-red spectroscopy of bio-films established that blood plasma promotes formation of external exopolysaccharides of S. aureus. The cultivation of bio-films in plasma depending on content of iron demonstrated that the analyzed strains of S. aureus, P. aeruginosa, E. coli form bio-films in a better way in plasma with normal content of iron and iron-deficient and iron-loaded plasma decreases their activity of formation of biofilm.

Keywords: biofilm; formation of biofilm; infra-red spectroscopy; blood plasma; serum iron; exo-polymeric matrix; Staphylococcus aureus; Pseudomonas aeruginosa; Escherichia coli.

Citation: Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2016; 61 (1): 52–54. (in Russ.)

Введение. По данным электронного ресурса PubMed, за последние 3 года опубликовано более 5000 работ по биопленкам [1], из них около 1000 работ посвящены биопленкам, образуемым микроорганизмами на поверхности катетеров, что свидетельствует о высоком интересе медицинского сообщества к этому вопросу. Трудно представить современную медицину без обеспечения сосудистого доступа. Ежегодно только в США устанавливается более 5 млн центральных венозных катетеров [2–4]. Любые инвазивные процедуры неизбежно ведут к нарушению целостности кожи, слизистых оболочек и способствуют попаданию оппортунистических патогенов в кровотоки. Кровь обладает бактерицидными свойствами. Нарушение гомеостаза железа организма хозяина и связанные с ним изменения эффекторных механизмов врожденного иммунитета могут способствовать выживанию патогенов в кровотоке за счет образования биопленок. Сформированные на внутренней поверхности катетеров биопленки являются очагом персистирующей инфекции, ведущей к высокой смертности среди катетеризированных больных. Способность к биопленкообразованию (БПО) зависит от природы материала катетера и белкового состава крови [5, 6], данные по влиянию содержания сывороточного железа на формирование биопленок в литературе отсутствуют.

Цель работы – изучение процесса образования биопленок проблемными оппортунистическими патогенами в плазме крови в зависимости от содержания железа.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования выбраны Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa и Escherichia coli, поскольку они вызывают 80% случаев инфекций мочевыводящих путей, 70% инфекций операционного поля, 77% ангиогенных инфекций, 92% нозокомиальных пневмоний [7]. Исследованы клинические изоляты, выделенные из крови пациентов Окружной клинической больницы г. Ханты-Мансийска, и эталонные штаммы – S. aureus 209, P. aeruginosa ATCC 27853, E. coli ATCC 25922.

Исследовали кровь доноров мужского пола группы 0 (I) Rh (+) с нормальным, пониженным и избыточным содержанием железа, последнее создавалось искусственно путем добавления раствора цитрата железа (II) до конечной концентрации 50,0 мкМ. Кровь забирали с помощью вакуумной системы Vacutainer в пластиковые пробирки с цитратом натрия. Содержание железа определяли феррозиновым способом с использованием набора IRON (Chronolab AG, Швейцария). Биопленки выращивали в плазме крови и LB-бульоне (состав, г/100 мл: триптон – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,5; хлорид натрия – 1,0) при постоянном перемешивании при 37°C в течение 48 ч на поверхности полистирола. Биопленкообразующую активность (БПО-активность, опт. ед.) оценивали по изменению оптической плотности раствора генцианвиолета после его экстракции 70%-ным этанолом из окрашенной биопленки фотоэлектроколориметрическим методом по способу O'Toole [8].

Изменения в составе матрикса биопленки регистрировали методом инфракрасной (ИК) спектроскопии. Для этого микроорганизмы инкубировали при 37°C в течение 48 ч в сыворотках. После подрастворивания микробную биопленку инaktivировали парами хлороформа в течение 3 ч и высушивали.

Для корреспонденции: Миронов Андрей Юрьевич, andy.60@mail.ru

For correspondence: Mironov A.Yu., andy.60@mail.ru

ИК-спектры записывались на спектрометре Spectrum One с Фурье-преобразованием (Perkin Elmer) в интервале частот 400–4000 см⁻¹ в таблетках с бромидом калия (2%-ый раствор микробной биопленки в бромиде калия; таблетки прессовались в пресс-форме под давлением 1000 кг/см²). Для сравнительного анализа ИК-спектров при приготовлении таблеток использовалось одинаковое количество микробной биопленки во всех случаях.

Результаты и обсуждение. Результаты изучения БПО-активности микроорганизмов в ЛВ-бульоне и плазме крови человека при разных концентрациях железа представлены на рис. 1. Способность микроорганизмов к образованию биопленок различается в зависимости от их таксономической принадлежности и условий культивирования. В ЛВ-бульоне лучше образовывали биопленку штаммы *P. aeruginosa* (БПО-активность 0,25–0,27 опт. ед.), что обусловлено синтезом внеклеточного полисахарида альгината. Среднюю способность к БПО продемонстрировали все штаммы *E. coli* (0,17–0,18 опт. ед.). Самые низкие значения БПО-активности (0,10–0,13 опт. ед.) имели штаммы *S. aureus*. Можно выстроить следующий ряд по уменьшению БПО-активности в ЛВ-бульоне: *P. aeruginosa* > *E. coli* > *S. aureus*. Использование в качестве среды культивирования плазмы крови с нормальным содержанием железа (16,5 мкМ) увеличивало БПО всех исследованных культур независимо от таксономической принадлежности. В большей степени плазма стимулировала формирование биопленок *S. aureus*: показатель БПО-активности штамма *S. aureus* 209 увеличивался с 0,30 до 0,36 опт. ед. С нашей точки зрения, это связано с наличием у *S. aureus* плазмокоагуляционной активности, способствующей модификации фибрином поверхностных свойств полистироловой подложки.

Кровь содержит больше половины всего железа организма и играет важную роль в его обмене. Для микроорганизмов железо является важнейшим регулятором патогенности. Изменение гомеостаза железа организма хозяина в сторону уменьшения или увеличения его концентрации может существенно изменять инфекционную чувствительность. Поэтому нами проведено изучение влияния концентрации сывороточного железа на формирование биопленок оппортунистических патогенов.

Наиболее выраженную железозависимость БПО в плазме продемонстрировали все тестируемые штаммы *S. aureus*, *P. aeruginosa*: данный показатель для *S. aureus* 209 и *P. aeruginosa* 27853 уменьшился в 1,3 и 1,4 раза соответственно при увеличении концентрации сывороточного железа с 16,5 до 50,0 мкМ. Культивирование *S. aureus* и *P. aeruginosa* в железodefицитной плазме уменьшало их БПО-активность в 1,2 раза. Наименее железозависимыми оказались штаммы *E. coli*, для которых увеличение концентрации железа до 50 мкМ и уменьшение до 8,8 мкМ вело к снижению БПО в 1,2 раза. Культивирование бактерий в железodefицитной плазме и плазме с избыточной концентрацией железа уменьшало БПО-активность всех исследованных штаммов микроорганизмов. Добавление ионов железа в ЛВ-бульон увеличивает показатель гидрофобности, влияет на величину заряда микробной клетки и уменьшает БПО [9]. Железо в крови не присутствует в свободном состоянии и вряд ли может способствовать изменению поверхностного заряда и показателя гидрофобности микробной клетки.

Для объяснения влияния плазмы на БПО проведен сравнительный анализ ИК-спектров биопленок *S. aureus*, выращенных в плазме, в зависимости от содержания железа (рис. 2). ИК-спектроскопия позволяет быстро и надежно получить информацию о качественном составе экзополимерного матрикса биопленок.

ИК-спектр биопленки представляет собой не просто сумму полос поглощения ее отдельных компонентов, он включает полосы, характеризующие связи между макромолекулами полимеров матрикса. Несмотря на сложность интерпретации ИК-спектров биопленок, можно выделить несколько харак-

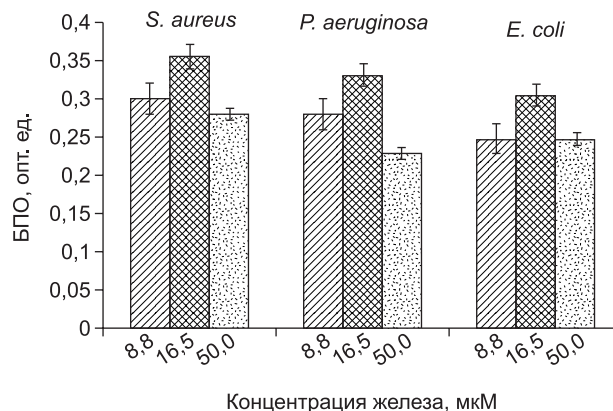


Рис. 1. Показатель БПО эталонных штаммов *S. aureus* 209, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 в ЛВ-бульоне (пунктирная линия) и цельной крови в зависимости от содержания железа.

терных областей поглощения. В области между 1800–1500 см⁻¹ преобладают колебания амидных связей в белках. Как видно из представленных на рис. 2 спектров, интенсивность полос поглощения в этой области практически не отличается. Наиболее информативными для сравнительного анализа состава биопленок являются область 1242–1080 см⁻¹-полосы поглощения асимметричных и симметричных колебаний фосфоэфирных связей Р=О в нуклеиновых кислотах (ДНК и РНК) и область 1200–900 см⁻¹-валентные колебания связей С–О–С и С–О в бактериальных полисахаридах [10, 11]. Сравнительный анализ ИК-спектров биопленок в этих областях показал, что плазма с нормальным содержанием железа способствует увеличению интенсивности полос поглощения валентных колебаний связей С–О–С и С–О в полисахаридах, тогда как интенсивность полос поглощения колебания связей Р=О в нуклеиновых кислотах снижается.

ИК-спектры позволяют понять, что плазма стимулирует образование наружных экзополисахаридов, что и объясняет увеличение показателя БПО в плазме. Микробные полисахариды, как правило, содержат большое количество ионогенных групп, увеличивающих отрицательный заряд микробной клетки. Использование материалов с отрицательно заряженной поверхностью для изготовления катетеров уменьшает их микробную колонизацию [12]. Проведенное исследование подтверждает и объясняет механизм этого явления.

Многие механизмы врожденного иммунитета зависят от гомеостаза железа: его нарушение как в сторону увеличения, так и уменьшения концентрации сывороточного железа ведет

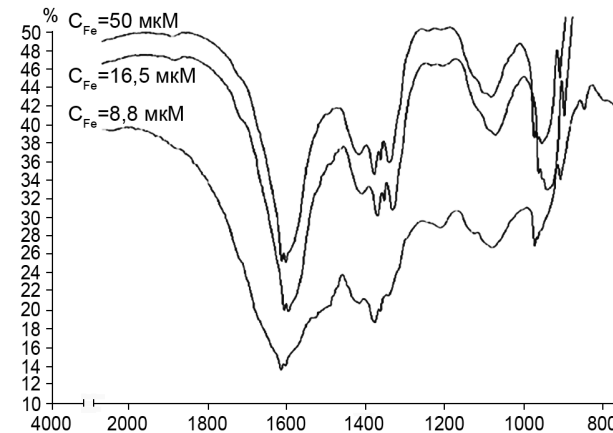


Рис. 2. ИК-спектры биопленок *S. aureus* 209 в плазме крови в зависимости от содержания железа.

к развитию иммунодефицитных состояний [13]. В норме гомеостаз железа сбалансирован и оно связано с железосвязывающими белками, что делает его недоступным для патогенов. Это важный фактор, сдерживающий развитие патогенов в крови. Полученные результаты вполне логичны, если рассматривать биопленки как механизм выживания микроорганизмов в организме хозяина. При железодефицитных состояниях железа в крови недостаточно для роста и экспрессии факторов патогенности микроорганизмов, и образование биопленок подавлено. В условиях избыточного содержания железа его концентрация достаточна для оптимального существования патогенов, и их переход от планктонного к «оседлому» образу жизни не является необходимым. Избыток железа в сыворотке может приводить к развитию оксидативного стресса, что также будет подавлять адгезию возбудителя. При нормальном содержании сывороточного железа его концентрация достаточна для оптимального размножения патогена, однако антимикробные механизмы иммунитета стимулируют переход патогена от планктонной формы существования к биопленочной.

Выводы. 1. Плазма крови стимулирует БПО *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* в последовательности *S. aureus* > *P. aeruginosa* > *E. coli* и способствует продукции отрицательно заряженных внеклеточных экзополисахаридов.

2. Как избыток, так и недостаток железа в плазме уменьшает БПО оппортунистических патогенов в последовательности: *P. aeruginosa* > *S. aureus* > *E. coli*.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3–6, 8, 10–12 см. REFERENCES)

- Харсеева Г.Г., Миронов А.Ю., Фролова Я.Н., Лабушкина А.В. Способность к формированию биопленки возбудителем дифтерии. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2013; 2: 36–8.
- Сидоренко С.В. Катетер-ассоциированные инфекции. *Современная онкология*. 2001; 3: 96–7.
- Козлов В.К. *Сепсис: этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии*. СПб.: Диалект; 2006.
- Леонов В.В., Курлович Н.А., Соколова Т.Н. Связь показателя гидрофобности микробных клеток с биопленкообразующей способностью. *Биофизика*. 2014; 59 (6): 1131–4.
- Миронов А.Ю., Харсеева Г.Г., Ключкина Т.В. *Основы клинической микробиологии и иммунологии: учебное пособие*. Ростов-на-Дону: ГОУ ВПО РостГМУ; 2011.

Поступила 01.09.15

REFERENCES

- Kharseeva G.G., Mironov A.Yu., Frolova Ya.N., Labushkina A.V. The ability of diphtheria causative agent to form biofilm. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2013; 2: 36–8. (in Russian)
- Sidorenko S.V. Catheter-related infections. *Sovremennaya onkologiya*. 2001; 3: 96–7. (in Russian)
- Pittet D., Tarara D., Wenzel R.P. Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients: excess length of stay, extra costs and attributable mortality. *JAMA*. 1994; 271 (20): 1598–601.
- Orsi G.B., Di Stefano L., Noah N. Hospital-acquired, laboratory-confirmed bloodstream infection: increased hospital stay and direct costs. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2002; 23 (4): 190–7.
- John R. Mehall, Daniel A. Saltzman, Richard J. Jackson, Samuel D. Smith Fibrin sheath enhances central venous catheter infection. *Crit. Care Med.* 2002; 30 (4): 908–12.
- Treter J., Macedo A.J. Catheters: a suitable surface for biofilm formation. In: A. Méndez-Vilas, ed. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Badajoz, Spain: FORMATEX; 2011: 835–42.
- Kozlov V.K. *Sepsis: Etiologic, Immunopathogenesis, Conception Modern Immunotherapy. [Sepsis: etiologiya, immunopatogenez, kontsepsiya sovremennoy immunoterapii]*. St. Petersburg: Dialekt; 2006. (in Russian)
- O'Toole G.A., Kaplan H.B., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 2000; 54: 49–79.
- Leonov V.V., Kurlovich N.A., Sokolova T.N. Relation of hydrophobicity index of microbial cells to their bio-film-forming ability. *Biofizika*. 2014; 59 (6): 1131–4. (in Russian)
- Al-Qadiri H.M., Al-Holy M.A., Lin M., Alami N.I., Cavinato A.G., Rasco B.A. Rapid detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as pure and mixed cultures in bottled drinking water using fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *J. Agric. Food Chem.* 2006; 54 (16): 5749–54.
- D'Souza L., Devi P., Kamat T., Naik C.G. Diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopic (DRIFTS) investigation of *E. coli*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*. 2009; 38 (1): 45–51.
- Elliot T., Tebbes S. Prevention of central venous catheter related infection. *J. Hosp. Infect.* 1998; 40 (3): 193–201.
- Mironov A.Yu., Kharseeva G.G., Klyukina T.V. *Basics of Clinical Microbiology and Immunology: Study Guide. [Osnovy klinicheskoy mikrobiologii i immunologii: Uchebnoe posobie]*. Rostov-na-Donu: GOU VPO RostGMU; 2011. (in Russian)

Received 01.09.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.314.17-002-02:616.98:578.828.6]-092:612.017.1.064]:577.21.08

Царев В.Н., Николаева Е.Н., Ягодина Е.В., Трефилова Ю.А., Ипполитов Е.В.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ГИНГИВИТА И ПАРОДОНТИТА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова» Минздрава России, 127473, Москва

Проведено обследование 102 пациентов Клинической инфекционной больницы № 2 г. Москвы с верифицированным диагнозом ВИЧ-инфекция, являвшихся серопозитивными по результатам обнаружения анти-ВИЧ-АТ в сыворотке крови. Цель исследования – изучить частоту колонизации десен вирулентными анаэробными бактериями у ВИЧ-инфицированных (ПЦР) и АТ к ВИЧ в десневой жидкости (ИФА). Установлено, что в соскобе десневой борозды у ВИЧ-инфицированных доминируют анаэробные бактерии *P. gingivalis* и *A. actinomycesetcomitans*, а при пародонтите – *P. gingivalis* и *T. forsythia*. Полученные данные позволяют рекомендовать тест-систему «Мультидент-5» для ПЦР-диагностики, а набор реагентов Saluryte® HIV-1/2 – для ИФА с целью выявления АТ к ВИЧ в десневой жидкости. На результаты ПЦР и ИФА не оказывают влияния сопутствующая стоматологическая (пародонтит, гингивит) и соматическая патология.

Ключевые слова: ВИЧ-инфицированные; анаэробные бактерии; ИФА; ПЦР; маркерная ДНК; гингивит; пародонтит.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (1): 54–59.

Для корреспонденции: Царев Виктор Николаевич, nikola777@rambler.ru

For correspondence: Tsarev V.N. nikola777@rambler.ru