

4. Kizhlo L.B., Emel'yanova A.N., Kalinina Ye.N., Sergeeva Ye.I., Shunjaeva E.V., Urbazaeva A.A., Loginova N.Ju., Veselova E.V. Analysis of outbreaks of highly pathogenic influenza A (H1N1) in the Trans-Baikal region in 2009. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2011; 5: 50-2. (in Russian)
5. Petrov A.A., Vitkovskiy Ju.A., Chartorizhskaya N.N., Strambovska-ya N.N., Petrova O.S. Gene polymorphism FII, TF, FV and MTHFR in patients with lethal influenza A/H1N1 in the Trans-Baikal Region. *Moleculyarnaya meditsina*. 2012; 2: 46-9. (in Russian)
6. Petrov A.A., Emel'yanova A.N., Chartorizhskaya N.N., Vitkovskiy Ju.A. A case of severe disease of young woman in the postpartum period caused by a strain of influenza A/H1N1 virus. *Infektsionnye bolezni*. 2012; 2: 90-3. (in Russian)
7. Cizerling A.V., Cizerling V.A. Modern infection. *Pathological anatomy and questions of pathogenesis*. SPb.: SOTIS; 2002. (in Russian)

Поступила 15.05.14

Received 15.05.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616-002.77-078

Малафеева Э.В., Гульнева М.Ю., Носков С.М., Романов В.А.

## ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНК УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ У БОЛЬНЫХ С РЕВМАТИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия» Минздрава России, 150000, Ярославль

*Проведено изучение способности к образованию биопленок у 194 штаммов условно-патогенных микроорганизмов. Установлено, что бактерии, колонизирующие организм больных с ревматическими заболеваниями (P3), обладают способностью к образованию микробных биопленок. Образование ими биопленок проявляется с такой же частотой, как и у возбудителей воспалительных процессов. При этом Escherichia coli, Staphylococcus haemolyticus и бактерии рода Proteus, выделенные при P3, обладают существенно большей способностью к биопленкообразованию, что может иметь значение в развитии коморбидных инфекций.*

**Ключевые слова:** биопленка; условно-патогенные микроорганизмы; ревматические заболевания.

E.V. Malafeeva, E.V. Gulneva, M.Yu. Noskov, V.A. Romanov

### THE FORMATION OF BIO-FILMS BY OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS ISOLATED FROM PATIENTS WITH RHEUMATIC DISEASES

The Yaroslavl state medical academy of Minzdrav of Russia, 150000 Yaroslavl, Russia

*The study was carried out concerning capability of 194 strains of opportunistic microorganisms to form bio-films. It is established that bacteria ecizing organism of patients with rheumatic diseases have capacity to form microbial bio-films. The formation of bio-films is manifested with the same rate as in agents of inflammatory processes. At that, Escherichia coli, Staphylococcus haemolyticus and bacteria of genus Proteus isolated under rheumatic diseases have significantly higher capability to form bio-films that matters for development of comorbide infections.*

**Key words:** biofilm; opportunistic microorganisms; rheumatic diseases.

**Введение.** Формирование бактериальных биопленок представляет собой сложный процесс, включающий клеточную дифференцировку и образование сложной 3D-структуры [1]. Существование бактерий внутри биопленок обеспечивает им много преимуществ по сравнению с изолированными клетками. Бактерии в биопленках обладают повышенной защитой от действия антител, фагоцитов и противомикробных препаратов [2, 3]. Более 65% инфекционных заболеваний обусловлены микроорганизмами, существующими в составе биопленок [4].

При ревматических заболеваниях различные условно-патогенные микроорганизмы могут принимать участие в развитии иммунного воспаления [5, 6]. Клинические штаммы отличаются гетерогенностью по способности к формированию биопленок [7]. Усиленное образование биопленки не всегда наблюдается у *Staphylococcus epidermidis*, выделяемого при стафилококковой инфекции суставов [8].

Представляет интерес изучение способности к образова-

нию биопленок условно-патогенными микроорганизмами, выделенными при ревматических заболеваниях (P3).

**Материалы и методы.** В исследование включено 194 штамма условно-патогенных микроорганизмов, из них 77 штаммов, выделенных от больных с P3, и 117 клинических штаммов, изолированных у лиц группы сравнения. Исследованные штаммы получены при бактериологическом обследовании 103 больных с P3: 63 больных ревматоидным артритом (РА) и 40 больных остеоартритом (ОА). Диагноз РА устанавливали согласно критериям Американской ревматологической ассоциации (1987). Преобладали пациенты с I–II рентгенологической стадией (69,8%), и у 30 % больных определялась III рентгенологическая стадия поражения. Большинство пациентов (85,7%) имели II степень функциональной недостаточности суставов. Серопозитивная форма РА установлена у 88,9% больных, у остальных – серонегативная. У больных ОА преобладало поражение коленных (67,5%), у 35% – тазобедренных суставов. II рентгенологическая стадия ОА диагностирована у 65% больных, III–IV стадия у 35% больных, II функциональный класс у 25% и III функциональный класс у 75% обследованных больных. Больных обследовали бактериологическим методом, руководствуясь приказом МЗ №535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях

Для корреспонденции:

Малафеева Эльвира Васильевна, проф. каф. микробиологии  
Адрес: 150003, Ярославль, ул. Советская, 57/215  
E-mail: ch-ma@mail.ru

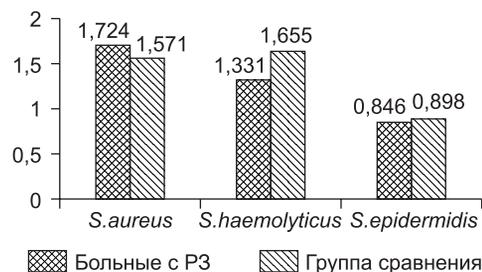


Рис. 1. Сравнительная характеристика пленкообразования у стафилококков.

лечебно-профилактических учреждений» (2006). Исследуемым материалом были моча и отделяемое со слизистых оболочек носа. Выделенные культуры идентифицировали по морфологическим, тинкториальным, культуральным и ферментативным свойствам согласно руководству по систематике бактерий Берги. Выделенные при РЗ штаммы условно-патогенных микроорганизмов отнесены к стафилококкам (*Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*), семейству *Enterobacteriaceae* (родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*) и *Pseudomonas aeruginosa*. Клинические штаммы в группе сравнения, выделенные при бактериологическом исследовании мочи и материала со слизистой оболочки носа у больных ринитом, циститом и здоровых носителей, были идентичны по видовой и родовой принадлежности микроорганизмам, полученным у ревматических больных.

Образование биопленок условно-патогенными микроорганизмами оценивали по степени связывания ими кристаллического фиолетового в стерильных 96-луночных планшетах ("Sarstedt", Германия) [9]. Результаты учитывали на ридере при длине волны 540 нм. Коэффициент биопленкообразования рассчитывали как отношение A540 опыт/A540 контроль, положительными считали значения > 1,1.

Статистический анализ данных выполнен на IBM PC-совместимом компьютере с помощью программы Statistica (Data analysis software system, "StatSoft") версии 7.0. Результаты исследований представлены в виде средней ± стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Сравнение непрерывных величин с нормальным распределением проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Дискретные величины сравнивали с использованием критерия  $\chi^2$ . Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Условно-патогенные микроорганизмы обладали различной способностью к образованию биопленок (см. таблицу). *S. aureus*, выделенные у больных с

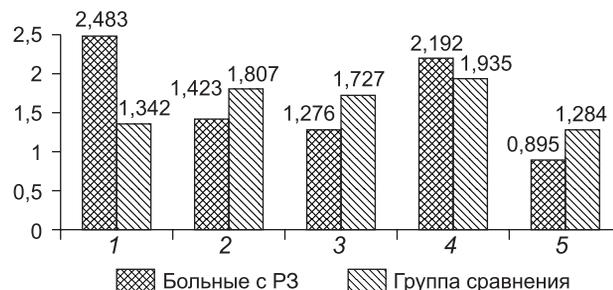


Рис. 2. Сравнительная характеристика пленкообразования у микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae и рода *Pseudomonas*.

1 – *E. coli*; 2 – *Klebsiella spp.*; 3 – *Enterobacter spp.*; 4 – *Proteus spp.*; 5 – *Pseudomonas aeruginosa*.

РЗ и лиц группы сравнения, формировали биопленку с высокой частотой (соответственно в 87,5 и 85,7% случаев). Биопленкообразование выявлено у 50% штаммов *S. epidermidis*, изолированных у больных, и у 75% штаммов в группе сравнения. Наряду с этим биопленку формировали 100% штаммов *S. haemolyticus*, выделенных у больных, и только 55,6% культур *S. haemolyticus*, выделенных у лиц группы сравнения ( $p < 0,05$ ).

Штаммы *Escherichia coli*, выделенные у больных, в 100% случаев формировали биопленку, что существенно чаще, чем у штаммов в группе сравнения – в пределах 72,7% случаев ( $p < 0,05$ ). Микроорганизмы родов *Klebsiella*, *Proteus* и *Pseudomonas*, выделенные в обеих группах, в 100% случаев имели признак биопленкообразования. Микроорганизмы рода *Enterobacter* формировали биопленку в 66,7% случаев, что существенно не отличалось от показателей в группе сравнения.

Результаты определения интенсивности формирования микробных биопленок условно-патогенными микроорганизмами представлены на рис. 1 и 2. Стафилококки различных видов, выделенные у больных и лиц группы сравнения, существенно не различались по способности формировать биопленку ( $p > 0,05$ ). Значительные различия в интенсивности образования биопленки выявлены у бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Штаммы *E. coli*, выделенные у больных с РЗ, характеризовались гораздо более выраженным пленкообразованием ( $p < 0,00001$ ). Для штаммов *Proteus vulgaris* также характерно более интенсивное пленкообразование при выделении их у больных с РЗ ( $p < 0,05$ ). Культуры *Pseudomonas aeruginosa*, изолированные у больных с РЗ, напротив, имели более низкую способность к биопленкообразованию ( $p < 0,01$ ).

**Частота образования биопленки условно-патогенными микроорганизмами**

Микроорганизмы	Больные с РЗ				Группа сравнения			
	количество штаммов	количество штаммов, образующих биопленку		количество штаммов	количество штаммов, образующих биопленку			
		абс.	%		абс.	%		
<i>S. aureus</i>	16	14	87,5	28	24	85,7		
<i>S. haemolyticus</i>	6	6*	100	18	10	55,6		
<i>S. epidermidis</i>	8	4	50	12	9	75		
<i>E. coli</i>	12	12*	100	22	16	72,7		
<i>Klebsiella spp.</i>	10	10	100	9	9	100		
<i>Enterobacter spp.</i>	9	6	66,7	12	9	75		
<i>Proteus spp.</i>	8	8	100	10	10	100		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	8	100	6	6	100		

Примечание. \* – достоверность различий ( $p < 0,05$  по критерию  $\chi^2$ ).

Условно-патогенные микроорганизмы, колонизирующие организм больных с РЗ, обладают выраженной способностью к образованию микробных биопленок. Формирование биопленок микроорганизмами, выделенными при РЗ, проявляется с такой же частотой, как и у возбудителей воспалительных процессов на слизистых оболочках носа и мочевыводящей системы. При этом *E. coli* и *S. haemolyticus*, выделенные у больных с РЗ, обладают существенно большей способностью к биопленкообразованию. Это может быть связано с изменением поверхностных структур клеток в микробных биоценозах под влиянием активных форм кислорода, продуцируемого представителями доминантной микрофлоры [10, 11]. Можно предположить, что интенсивное образование биопленки бактериями рода *Proteus* может иметь значение в плане участия данных микроорганизмов в развитии РА. Многочисленные данные подтверждают мнение о том, что РА скорее всего обусловлен бессимптомными инфекциями мочевых путей, вызванными бактериями рода *Proteus* [12, 13]. Наряду с этим микроорганизмы (*E. coli*, *S. haemolyticus*, *Proteus spp.*), интенсивно образующие биопленки, могут существенно чаще играть этиологическую роль в развитии коморбидных инфекций при изменении иммунной защиты у больных с РЗ [2, 14].

#### ЛИТЕРАТУРА

- DePas W.H., Hufnagel D.A., Lee J.S., Blanco L.P., Bernstein H.C., Fisher S.T. et al. Iron induces bimodal population development by *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013, 12; 110(7): 2629-34.
- Lasa I., Del Pozo J.L., Penadés J.R., Leiva J. Bacterial biofilms and infection. *An. Sist. Sanit. Navar*. 2005; 28(2): 163-75.
- Mah T.F. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2012; 7(9): 1061-72.
- Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и в организме хозяина. *Журнал микробиологии*. 2011; 3: 99-109.
- Marie I., Hachulla E., Cherin P. et al. Opportunistic infections in polymyositis and dermatomyositis. *Arthr. Rheum.* 2005; 53 (2): 155-65.
- Newkirk M.M., Zbar A., Baron M., Manges A.R. Distinct bacterial colonization patterns of *Escherichia coli* subtypes associate with rheumatoid factor status in early inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; 49(7): 1311-6.
- Sanchez C.J.Jr, Mende K., Beckius M.L. et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13(29): 47.
- Maduka-Ezeh A.N., Greenwood-Quaintance K.E., Karau M.J., Barbari E.F., Osmon D.R., Hanssen A.D. et al. Diagn Microbiol Antimicrobial susceptibility and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* small colony variants associated with prosthetic joint infection. *Infect. Dis.* 2012; 74(3): 224-9.
- Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and analyzing static biofilms. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2005; 1: 1002.
- Бухарин О.В., Сгибнев А.В. Влияние активных форм кислорода на адгезивные характеристики и продукцию биопленок бактериями. *Журнал микробиологии*. 2012; 3: 70-3.
- Hillier S.L., Krohn M.A., Klebanoff S.J., Eschenbach D.A. The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women. *Obstet. Gynecol.* 1992; 79(3): 369-73.
- Ebringer A., Rashid T., Wilson C. Rheumatoid arthritis, *Proteus*, anti-CCP antibodies and Karl Popper. *Autoimmun. Rev.* 2010; 9(4): 216-23.
- Rashid T., Ebringer A. Autoimmunity in Rheumatic Diseases Is Induced by Microbial Infections via Crossreactivity or Molecular Mimicry. *Autoimmune Dis.* 2012: 539282.
- Boll E.J., Struve C., Boisen N., Olesen B., Stahlhut S.G., Krogfelt K.A. Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. *Infect. Immun.* 2013; 81(4): 1164-71.

#### REFERENCES

- DePas W.H., Hufnagel D.A., Lee J.S., Blanco L.P., Bernstein H.C., Fisher S.T. et al. Iron induces bimodal population development by *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013, 12; 110(7): 2629-34.
- Lasa I., Del Pozo J.L., Penadés J.R., Leiva J. Bacterial biofilms and infection. *An. Sist. Sanit. Navar*. 2005; 28(2): 163-75.
- Mah T.F. Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2012; 7(9): 1061-72.
- Romanova Yu.M., Gintsburg A.L. Bacterial biofilms as a natural form of existence of bacteria in environment and in an organism of the owner. *Zhurnal microbiologii*. 2011; 3: 99-109. (in Russian)
- Marie I., Hachulla E., Cherin P. et al. Opportunistic infections in polymyositis and dermatomyositis. *Arthr. Rheum.* 2005; 53 (2): 155-65.
- Newkirk M.M., Zbar A., Baron M., Manges A.R. Distinct bacterial colonization patterns of *Escherichia coli* subtypes associate with rheumatoid factor status in early inflammatory arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; 49(7): 1311-6.
- Sanchez C.J.Jr, Mende K., Beckius M.L. et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13(29): 47.
- Maduka-Ezeh A.N., Greenwood-Quaintance K.E., Karau M.J., Barbari E.F., Osmon D.R., Hanssen A.D. et al. Diagn Microbiol Antimicrobial susceptibility and biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis* small colony variants associated with prosthetic joint infection. *Infect. Dis.* 2012; 74(3): 224-9.
- Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and analyzing static biofilms. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2005; 1: 1002.
- Bukharin O.V., Sgibnev A.V. Influence of active forms of oxygen on adhesive characteristics and production of biofilms bacteria. *Zhurnal microbiologii*. 2012; 3: 70-3. (in Russian)
- Hillier S.L., Krohn M.A., Klebanoff S.J., Eschenbach D.A. The relationship of hydrogen peroxide-producing lactobacilli to bacterial vaginosis and genital microflora in pregnant women. *Obstet. Gynecol.* 1992; 79(3): 369-73.
- Ebringer A., Rashid T., Wilson C. Rheumatoid arthritis, *Proteus*, anti-CCP antibodies and Karl Popper. *Autoimmun. Rev.* 2010; 9(4): 216-23.
- Rashid T., Ebringer A. Autoimmunity in Rheumatic Diseases Is Induced by Microbial Infections via Crossreactivity or Molecular Mimicry. *Autoimmune Dis.* 2012: 539282.
- Boll E.J., Struve C., Boisen N., Olesen B., Stahlhut S.G., Krogfelt K.A. Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. *Infect. Immun.* 2013; 81(4): 1164-71.

Поступила 16.01.14

Received 16.01.14