

**ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной
медицины и экологии человека»**

**Оценка динамики формирования биопленки
грамположительными и грамотрицательными
бактериями с использованием
спектрофотометрической детекции**



**Ю.И. Ярец, к.м.н., доцент,
заведующий КДЛ**

**Н.И. Шевченко, к.б.н.,
доцент, заведующий ЛКТ**



Актуальность

- В настоящее время признается, что рутинное микробиологическое исследование не всегда позволяет корректно оценить этиологическую значимость бактерий, особенно при хронических инфекциях
- С целью максимально эффективного воздействия на инфекционный процесс лабораторная бактериологическая диагностика все чаще дополняется методами анализа бактериальной биопленки
- Необходимость этого исследования обусловливается особенностями свойств микроорганизмов в биопленке: снижением чувствительности к антибактериальным средствам, возможностью избежать воздействия иммунной системы, различной метаболической активностью клеток



Актуальность

- Бактериальная биопленка, способна глубоко проникать в ткани, индуцируя хроническое воспаление, что приводит к прогрессирующему или осложненному течению заболевания
- Основными компонентами биопленки, которые анализируются при микробиологическом исследовании, являются бактериальная биомасса и основное вещество или экзополисахаридный матрикс. ЭПМ синтезируется самими бактериями после их адгезии к поверхности, и является барьером, который защищает микроорганизмы от внешних воздействий
- Анализ накопления биомассы и основного вещества наиболее важен, так как установлено, что степень адгезии, способность к пленкообразованию, коррелирует со степенью вирулентности бактерии

Актуальность

- Спектрофотометрический метод – распространенный способ детекции образования биомассы и ЭПМ биопленки, что определяется возможностью широкого использования в практике работы микробиологических лабораторий
- Хронические раны - типичная патология, ассоциированная с биопленкой. Доказана трансформация бактерий из планктонной формы в биопленку и ее первостепенная роль в задержке раневого заживления.
- Нежизнеспособные ткани раны – хорошая питательная среда для бактерий, что поддерживает уровень колонизации раны, способствует образованию биопленки и ее сохранению

Актуальность

- Присутствие полимикробной флоры - отличительная особенность хронической раны
- Формирование выраженной биопленки сопровождается слабо выраженным воспалительным ответом, нарушением миграции клеток и роста грануляционной ткани
- Продемонстрирован эффект синергизма различных видов бактерий в полимикробной биопленке, предопределяющий вирулентность и патогенетический эффект в хронизации раневого процесса
- В связи с этим актуальным является характеристика динамики образования биопленки основными представителями Г+ и Г- микрофлоры хронической раны. Полученные данные позволят определить принципиально важных для раневого процесса бактерий-продуцентов биопленки

Цель исследования

- оценить характер динамики накопления основного вещества и биомассы бактериями-продуцентами биопленки с учетом их тинкториальных свойств



Материал и методы

- **Объект исследования** – бактерии, полученные из ХР (срок существования от 4-х недель до 1 года)

Бактерии выделялись из раневого отделяемого в процессе стандартного микробиологического анализа

Способность формировать биопленку определяли по ранее разработанной и внедренной в работу лабораторий ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» методике (Патент Республики Беларусь № 20326)



Материал и методы



Оценка биомассы

Генцианвиолет



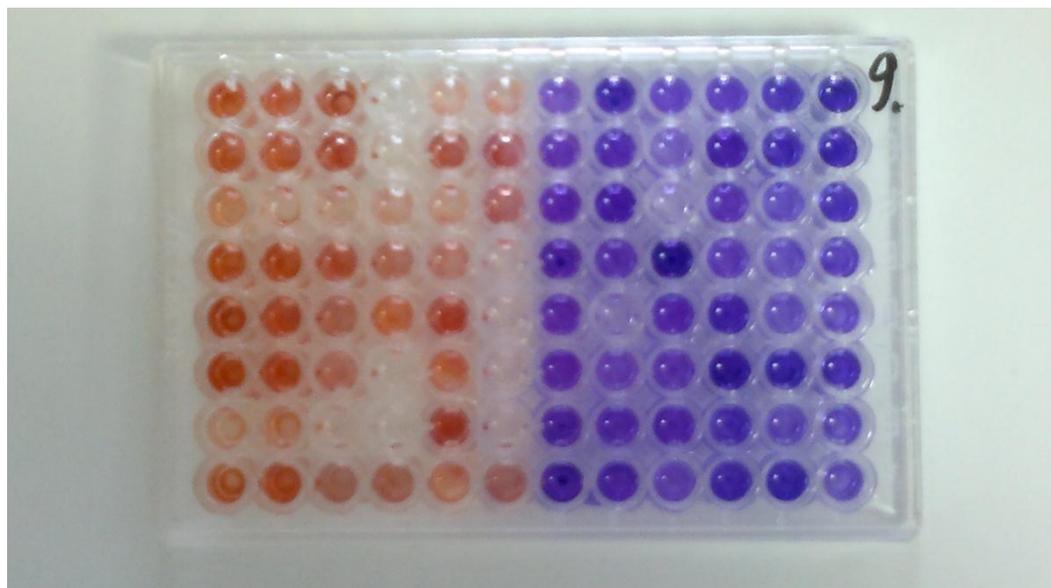
Оценка экзополисахарида

Конго красный



Экстракция этанолом

фотометрическое определение
оптической плотности



➔ **Материал и методы**

- Количественную оценку полученных спиртовых экстрактов осуществляли на микропланшетном спектрофотометре (Sirio, Seac Radium Group, Италия).
- Определение оптической плотности элюатов генцианвиолет/этанол и Конго красный/этанол осуществляли при длине волны 540 и 490 нм, соответственно. Результат выражали в единицах оптической плотности (OD).
- Интерпретацию результатов анализа продукции биопленки выполняли по ранее разработанной методике



Интерпретация результатов определения оптической плотности

Значение оптической плотности	Накопление основного вещества биопленки	Образование биомассы биопленки
$\leq OD_k$	отсутствует	отсутствует
$OD_k < OD_o \leq 2 \times OD_k$	низкая	низкая
$2 \times OD_k < OD_o \leq 4 \times OD_k$	умеренная	умеренная
$> 4 \times OD_k$	выраженная	выраженная

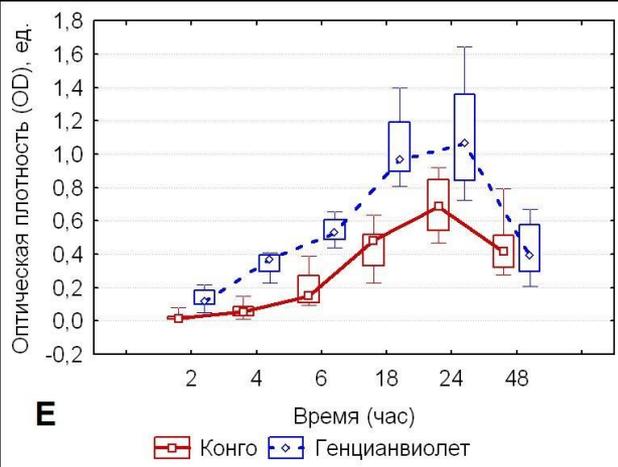
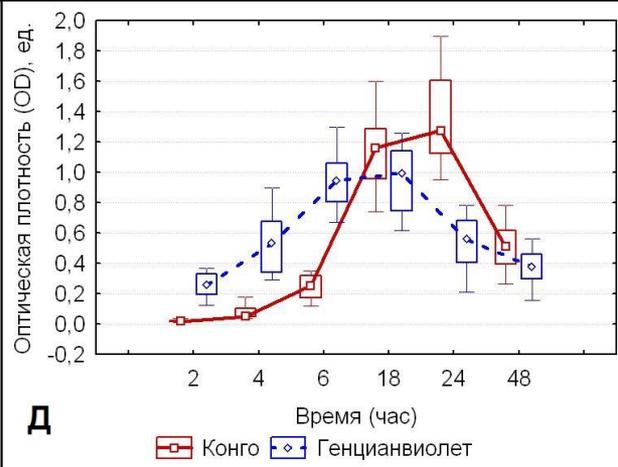
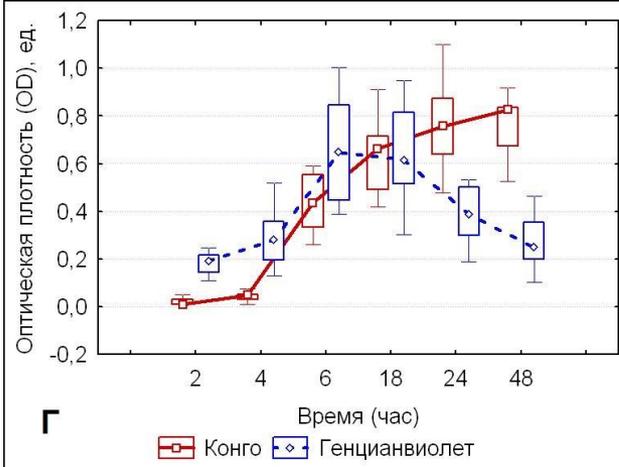
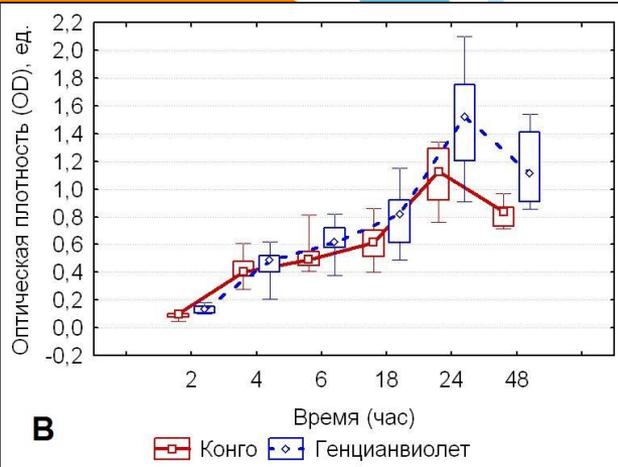
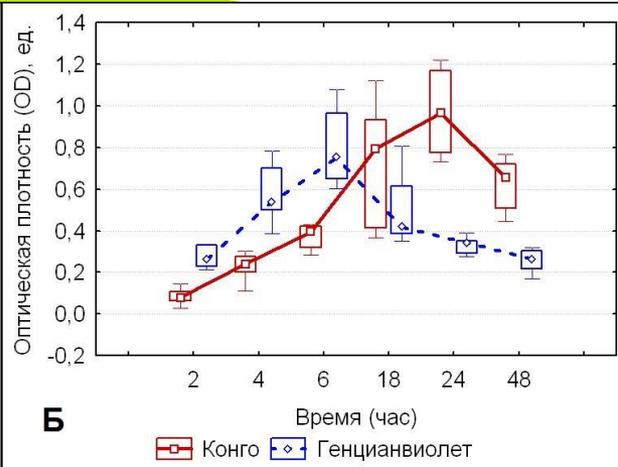
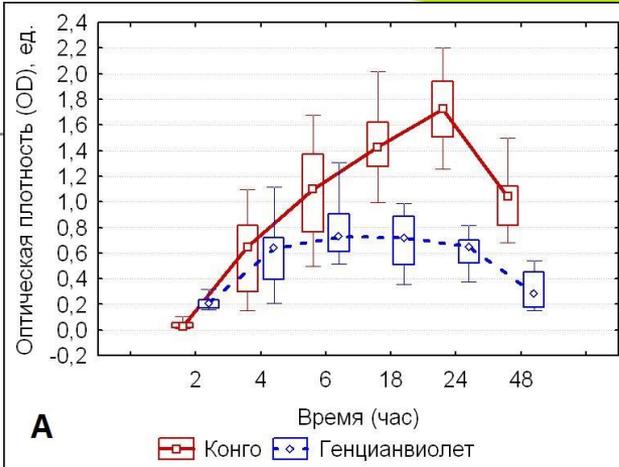
Примечание: OD_k – оптическая плотность контроля (№1 и №2), OD_o – оптическая плотность исследуемого (опытного) образца. Для экстрактов генцианвиолет/этанол, используемых для оценки биомассы биопленки, OD_k рассчитывают по формуле:

$OD_k = OD_{\text{контроля}\#1} + 3 \times SD_{\text{контроля}\#1}$, где SD – стандартное отклонение.

Для экстрактов Congo red/этанол, используемых для оценки основного вещества биопленки, OD_k рассчитывают по формуле: $OD_k = OD_{\text{контроля}\#2} + 3 \times SD_{\text{контроля}\#2}$.

➔ **Материал и методы**

- В исследование включали представителей Г+ и Г- бактерий, у которых с помощью спектрофотометрии метода устанавливали выраженную способность к формированию биопленки
- За выраженных продуцентов биопленки принимали тех бактерий, для которых оптическая плотность спиртового экстракта Конго красного превышала 0,460 ед. (т.е. более 4хОДк) в сроки инкубации 18 и 24 часа.
- Характер динамики накопления биомассы и основного вещества оценили у 30 штаммов *Staphylococcus spp.* (из них – *S.aureus*=20), 25 штаммов *Enterococcus faecalis*, 21 штамм из рода *Klebsiella* (*K.pneumoniae*=17, *K.oxytoca* – 4), 21 штамм *Proteus mirabilis*, 30 представителей рода *Pseudomonas* (*P.aeruginosa*), 25 штаммов *Acinetobacter*: (*A.baumannii*).



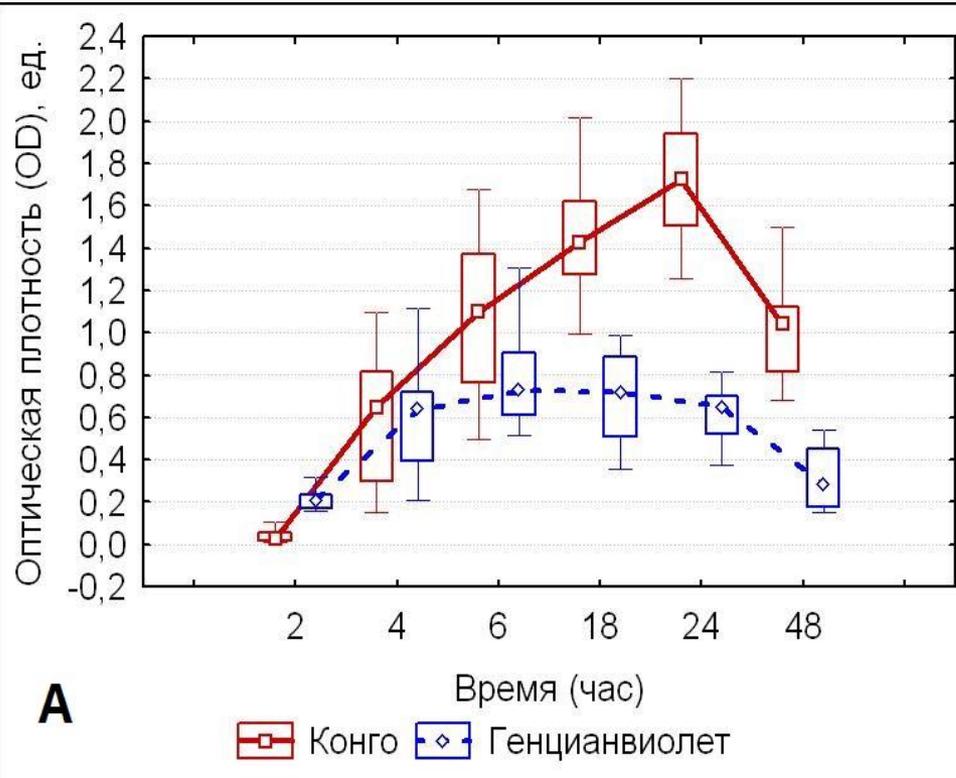
А, Б, В, Г, Д, Е – представлена динамика изменения оптической плотности этанольных экстрактов Конго красного и генцианвиолета для *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella*, *Proteus mirabilis*, *P.aeruginosa*, *Acinetobacter*, соответственно



Г+ (стафилококки)

Среди Г+ бактерий у стафилококков регистрировалась наиболее высокая способность к накоплению основного вещества биопленки.

- Через 4 часа у 73 % штаммов (n=22) определялась OD элюата Конго красного, превышающая 0,460 ед.
- К 18 и 24 часам все стафилококки имели сформированную биопленку, при этом величины абсорбции были наиболее значительными среди всех видов бактерий ($p < 0,001$), составляя 1,365 (1,07; 1,622) ед.
- OD элюата генцианвиолета были ниже значений OD раствора Конго красного в сроки исследования от 4 до 48 часов ($p < 0,01$).

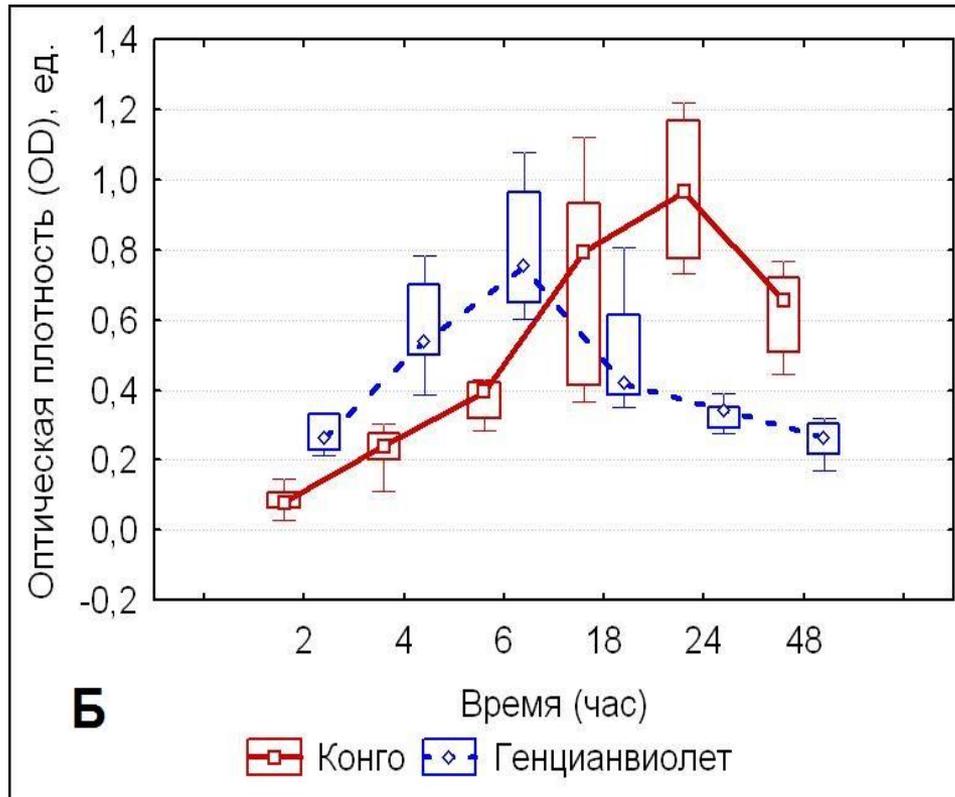


➔ Г+ (стафилококки)

- *Staphylococcus spp.*, обладают высоким колонизационным потенциалом и выживаемостью за счет наличия широкого спектра факторов колонизации, адгезинов, прочной клеточной стенки, факторов персистенции.
- Высокая интенсивность накопления основного вещества, может объяснять высокий уровень антагонистической активности стафилококков, а также причину преобладания стафилококков в составе бактериальных ассоциаций



Г+ энтерококки



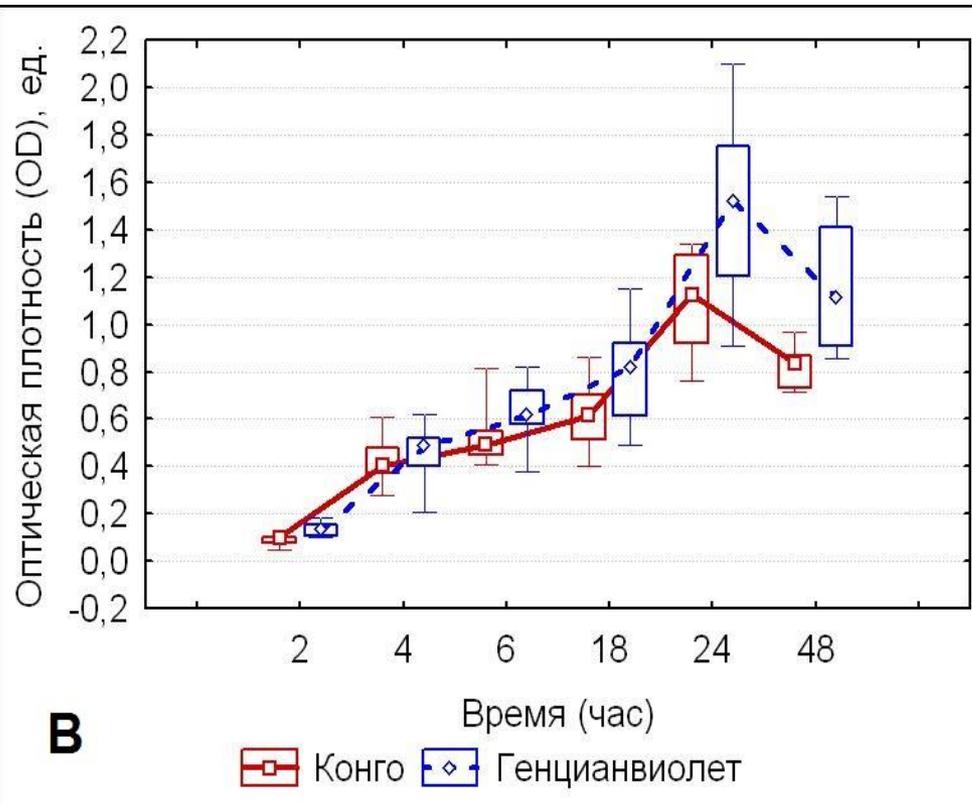
- *E. faecalis*, формировали биопленку в более поздние сроки – начиная с 6 часов инкубации, интенсивность накопления основного вещества достигала величин, определяющих выраженную биопленку не ранее, чем через 24 часа инкубации, составляя 0,964 (0,777; 1,167) ед.
- В сроки от 2 до 6 часов инкубации у *E. faecalis* происходила наиболее активная адгезия и пролиферация, после чего биомасса снижалась и к 48 часам достигала минимума значений OD.

Г+ энтерококки

- Несмотря на то, что энтерококки являются представителями нормальной микрофлоры, они обладают высокой адгезивной способностью, продуцируют воспалительные белки и токсины, что обуславливает их вирулентность и клиническую значимость

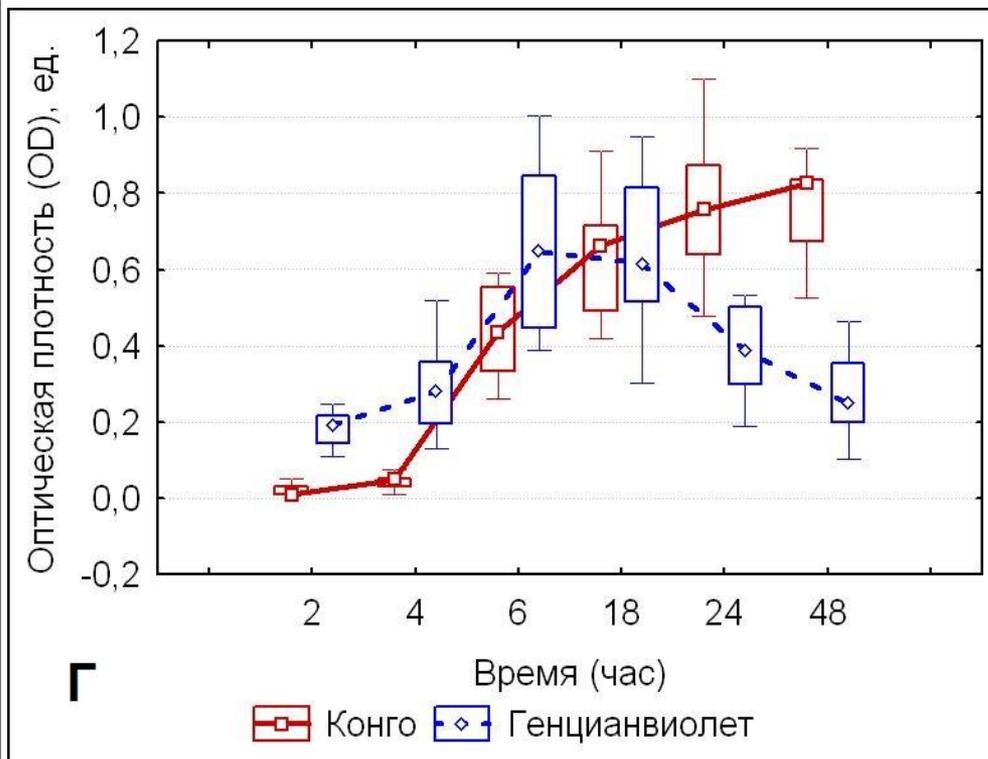


Г- (*Klebsiella*)



- Среди грамотрицательных энтеробактерий наиболее интенсивно и в более ранние сроки образовывали биопленку штаммы *Klebsiella*
- Характерно одновременное постепенное нарастание значений OD элюатов Конго красный/этанол и генцианвиолет/этанол, что отличало динамику образования биопленки *Klebsiella* от таковой у стафилококков.
- К 24 часам во всех случаях у *K.pneumoniae* и *K.oxytoca* показатели синтеза основного вещества превышал 0,460 ед., составляя 1,125 (0,919; 1,29) ед.
- Через 24 часа инкубации регистрировались самые высокие значения биомассы – 1,520 (1,205; 1,750) ед.

➔ Г- (*Proteus mirabilis*)



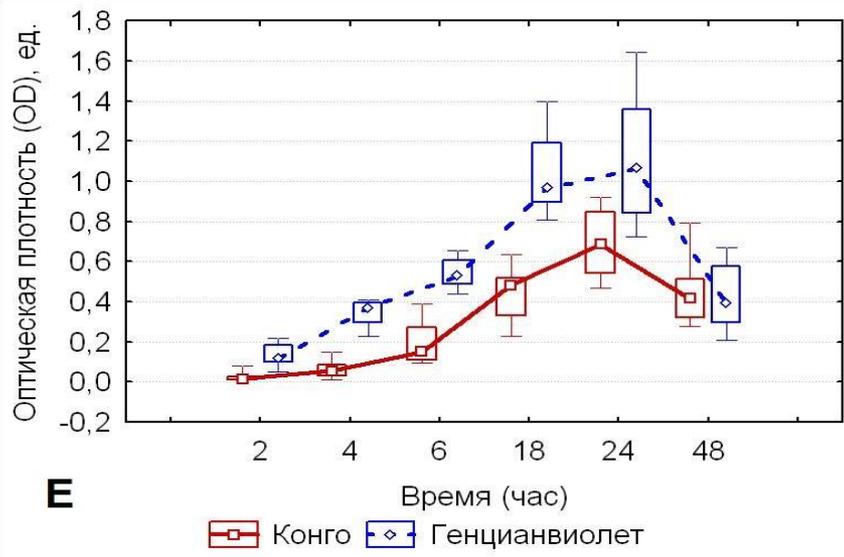
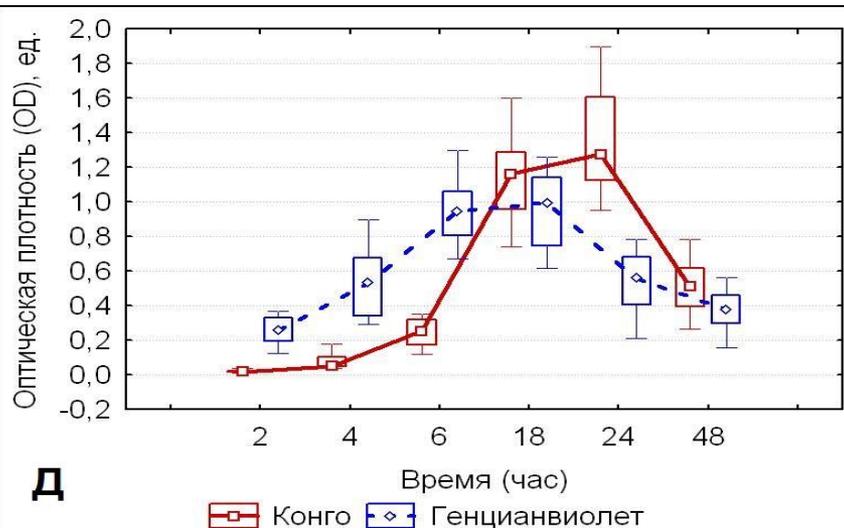
У штаммов *Proteus mirabilis* значения OD экстракта Конго красного на 48 часах инкубации сохранялись высокими – на уровне 0,827 (0,547; 0,837) ед.

- Однако уровень накопления биомассы биопленки через 48 часов снижался, приближаясь к значениям начальных сроков инкубации, и составлял 0,249 (0,200; 0,355) ед. (Вилкоксона $p < 0,01$).
- Сохранение способности синтезировать основное вещество биопленки на поздних сроках инкубации даже при низких значениях биомассы можно рассматривать как отличительное свойство *Proteus mirabilis*.

➔ Г- энтеробактерии

- *Klebsiella* и *P. mirabilis* проявляли выраженную продукцию основного вещества биопленки в более ранние сроки, чем Г- неферментирующие бактерии – *P. aeruginosa*, *A. baumannii*.
- Через 6 часов инкубации OD спиртового элюата Конго красного у *Klebsiella* составляли 0,493 (0,449; 0,550) ед. (значимость по тесту Шеффе $p=0,042$; $p=0,018$, относительно значений *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, соответственно).
- У *P. mirabilis* показатель составил 0,436 (0,335; 0,555) (значимость по тесту Шеффе $p=0,028$; $p=0,04$, относительно значений *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, соответственно).

➔ Г-НФБ



- У НФБ установлена одинаковая направленность динамики показателей абсорбции экстрактов генцианвиолета и Конго красного.
- Детальный анализ показал, что *P. aeruginosa* обладает более высокой способностью к синтезу основного вещества, превышающей в 1,5 раза таковую для *A. baumannii* через 18 и 24 часов инкубации ($p < 0,001$).
- Для *A. baumannii* было характерно более интенсивное накопление биомассы биопленки, чем основного вещества, через 24 часа значения OD элюата генцианвиолета превышали таковые для *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *Staphylococcus spp.*, *E. faecalis* ($p < 0,001$), уступая только показателям *Klebsiella*.

➔ Г- НФБ

- Неферментирующие бактерии – *Pseudomonas*, *Acinetobacter* являются вторыми по частоте встречаемости представителем микрофлоры хронических ран, при этом в острых ранах они обнаруживаются редко, что объясняют биопленкообразованием и нарушением местных иммунных реакций

Заключение

- Выраженные продуценты биопленки, выделенные из хронических ран, характеризовались постепенным накоплением основного вещества с достижением максимума через 24 часа инкубации (значимость по тесту Вилкоксона $p < 0,01$).
- Стафилококки образовывали основное вещество биопленки через 18–24 часа, при этом при этом величины абсорбции были наиболее значительными среди всех видов бактерий (значимость по тесту Шеффе $p < 0,001$).

➔ Заключение

- К особенностям продукции биопленки штаммами *Klebsiella* относилось одновременное постепенное нарастание значений оптической плотности, определяющих синтез биомассы и ЭПМ. Через 24 часа инкубации у *Klebsiella* регистрировались самые высокие значения биомассы (значимость по тесту Шеффе $p < 0,001$).

➔ Заключение

- Среди неферментирующих бактерий *P. aeruginosa* обладали более высокой способностью к синтезу основного вещества, превышающей в 1,5 раза таковую для *A. baumannii* через 18 и 24 часов инкубации (значимость по тесту Манн-Уитни $Z=3,9$; $p<0,001$). Для *A. baumannii* было характерно более интенсивное накопление биомассы биопленки, чем основного вещества, через 24 часа спектрофотометрические показатели превышали таковые для *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *Staphylococcus spp.*, *E. faecalis* (значимость по тесту Шеффе, $p<0,001$)

Исследование выполнено в рамках НИР БРФФИ «Жизнеспособность и функциональная активность фибробластов при взаимодействии с матриксом бактериальных биопленок» (договор №М19-007 от 02.05.2019), № госрегистрации 20191399 от 19.06.2019.

Спасибо за
внимание!



Photo: Contipro

P.aeruginosa, S.aureus, S.epidermidis