

Методы выявления биопленок в медицине: возможности и перспективы

А.В. Лямин, Е.А. Боткин, А.В. Жестков

Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

В обзоре представлены основные методы культивирования и индикации микробных биопленок, распространённые в настоящее время. С методологической точки зрения эти методы можно разделить на две группы: динамические и статические. Каждый метод имеет свои особенности и ограничения, описанные в настоящем обзоре. Кроме распространенных методов выделения, для биопленок имеется ряд спосо-

бов их индикации. Для основных способов выявления биопленок проанализированы области их применения. В работе показана необходимость разработки и стандартизации методов выявления способности формирования биопленок для внедрения в микробиологическую практику.

Ключевые слова: биопленки, динамические методы, статические методы

Methods of Biofilm Evaluation: Opportunities and Perspectives

A.V. Lyamin, E.A. Botkin, A.V. Zhestkov

Samara state medical university, Samara, Russia

The review presents the basic approaches to biofilm evaluation. From a methodological point of view, these methods can be divided into two groups: dynamic and static. Each method has advantages and disadvantages discussed in this review. In addition there are number of

ways to display biofilm. The article shows the need for development of standardized methods of biofilm evaluation for introduction in routine microbiological practices.

Key words: biofilm evaluation, static, dynamic methods.

Вопросы формирования биопленок и изучение их роли в патологических процессах представляют большой интерес в медицине. Проведенный формальный контент-анализ в электронной базе научных изданий ScinceDirect показывает неуклонный рост публикаций статей, в ключевых словах которых используется термин «biofilm» [MeSH Terms]» (рис. 1).

С одной стороны, это обусловлено особенностями свойств микроорганизмов, находящихся в биопленке: снижением чувствительности к антибактериальным химиопрепаратам, возможностью избежать воздействия иммунной системы, различной метаболической активностью клеток в биопленке, способностью передачи информации между клетками, коллективной координацией экспрессии генов. С другой стороны, в научной литературе представлена информация о большом количестве методов изучения, культивирования и индикации биопленок *in vitro* и *in vivo*, однако на практике эти

Контактный адрес:
Артем Викторович Лямин
Эл. почта: avlyamin@rambler.ru

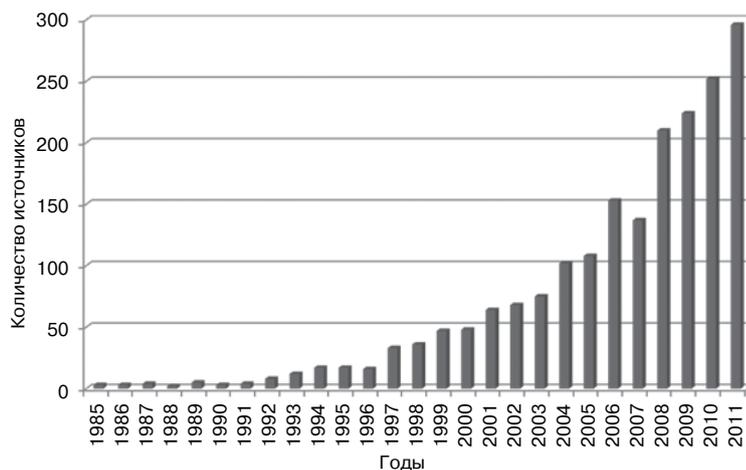


Рис. 1. Графическое представление формального контент-анализа по упоминанию термина «biofilm» в ключевых словах статей научных изданий.

вопросы остаются нерешенными. Основная масса статей посвящена научным аспектам изучения формирования биопленок разными микроорганизмами на различных объектах и разработке методов, препятствующих формированию биопленок, и для их разрушения.

Известно, что биопленки способны образовывать более 90% изученных видов бактерий, а их формирование выявляется более чем при 80% хронических заболеваний микробной этиологии [1]. В связи с этими фактами среди специалистов нет единого мнения о необходимости исследования способности формирования биопленок у клинических штаммов для практического применения.

Целью данного обзора является анализ существующих методов выявления и изучения формирования микробных биопленок.

Одна из первых научных статей, в которой подробно приведен и описан метод культивирования, индикации и изучения способности формирования микроорганизмами биопленок в медицинской практике, была опубликована в 1985 году. В этой работе G. D. Christensen с соавт. описали использование спектрофотометрического метода исследования для индикации выделенной «внеклеточной слизи» коагулазонегативными стафилококками, полученными из разных источников. Микроорганизмы были выбраны в связи с появлением в то время первых работ, в которых обсуждалась их роль в развитии катетер-ассоциированного сепсиса [2]. Многие авторы последующих работ использовали тот же принцип, либо его модификации для получения и индикации биопленок [3–6]. В своем исследовании G.D. Christensen для фотометрического определения образования биопленок применил методи-

ку, описанную M. Fletcher в работах 1976 и 1977 гг., в которых изучалась адгезия морских микроорганизмов на различных гладких поверхностях [2]. Обращает на себя внимание тот факт, что G. D. Christensen еще не использует термин «биопленка» в отношении адгезированных форм коагулазонегативных стафилококков, а говорит о способности выделять внеклеточную слизь.

В период с 1985 по 2010 гг. произошло значительное расширение возможностей изучения формирования биопленок микроорганизмами в медицине. Основное направление последующих исследований было связано с разработкой методов культивирования микроорганизмов в виде биопленок на различных объектах.

Научный филогенез методологии выращивания микробных биопленок уже на ранних этапах разделился на два направления: культивирование в динамических (имитация естественных условий обитания микроорганизмов) и статических условиях (рис. 2).

К динамическим можно отнести методы с использованием лабораторных ферментеров. Общая суть методов заключается в инокулировании микроорганизмов в планктонной фазе развития в жидкие питательные среды, которые циркулируют в закрытой системе. Таким образом, создаются условия для постоянного потока жидкости, содержащей микроорганизмы. Первоначальная адгезия микроорганизмов происходит на поверхности системы фильтров и/или на внутренних частях ферментера. В последующем адгезированные микроорганизмы образуют матрикс биопленки [7, 8].

Другим примером динамического метода можно считать культивирование в аппарате Робинсона и в его различных модификациях. В этом методе используют аппарат сложной конструкции, обеспечивающий ток питательной среды, которая соприкасается с пластинами из искусственного или биологического материала, на поверхности которых находятся адгезированные, физиологически адаптированные клетки микроорганизмов. В результате в условиях постоянного доступа питательных веществ и аэрации образуется биопленка [9].

Проточный метод можно отнести к микроциркуляторным методам. Биопленка микроорганизмов образуется на поверхности силиконовых трубок проточных ячеек (flow cells), через которые с помощью помпы постоянно подается питательная среда. Такой метод позволяет моделировать процессы

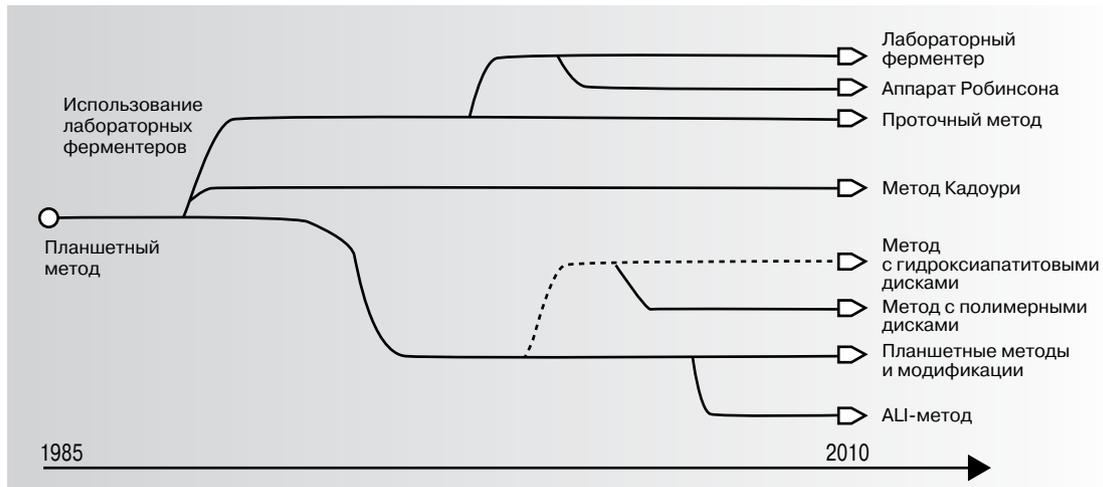


Рис. 2. Методы культивирования микробных биопленок.

образования биопленки на абиотических объектах, например на внутрисосудистых катетерах [10].

Основным преимуществом динамических методов формирования биопленок является максимальное приближение к условиям живых систем. Постоянное поступление питательных веществ и удаление продуктов жизнедеятельности микроорганизмов позволяет значительно интенсифицировать процесс формирования биопленки. Условия, обеспечивающие жизнедеятельность микроорганизмов в биопленке, полученной такими методами, стандартизованы, а влияние посторонних факторов минимизировано. В модификациях метода Робинсона и в проточном методе возможно изучение процесса образования или подавления биопленок в реальном времени с использованием световой микроскопии. К недостаткам данной группы методов можно отнести их ограниченное использование в связи с большими объемами потребления питательных сред, сложной конструкцией оборудования, затруднением стерилизации внутренних поверхностей аппаратов, низкой производительностью методов, высокой стоимостью эксплуатации.

Вторая группа методов основана на создании статических условий культивирования микроорганизмов. Наиболее часто используемой техникой, среди данной группы, является метод с применением 96-луночных пластиковых планшетов в различных модификациях. Популярность этого метода стала расти с середины 90-х годов прошлого столетия, что было обусловлено его удобством, высокой производительностью и наглядностью. Суть метода можно охарактеризовать следующим образом: суспензия бактерий вносится в лунки планшета, после инкубации в оптимальных условиях

планктонная фаза популяции бактерий удаляется вместе с питательной средой, образовавшиеся биопленки выявляются различными способами.

Этот метод до сих пор не потерял своей значимости, однако научный интерес отечественных исследователей к нему в последнее время значительно снизился, а практическое значение так и не получило должной оценки в нашей стране. В первую очередь, это связано с тем, что для этого метода не разработаны стандарты, позволяющие унифицировать его в разных лабораториях. Уже в ранних работах была отмечена разная адгезивная способность одних и тех же штаммов микроорганизмов к различным поверхностям. Данный факт связан с тем, что все микроорганизмы обладают способностью прикрепляться к органическим и неорганическим поверхностям, а адгезия является пусковым механизмом в развитии инфекционного процесса.

Некоторые авторы разделяют прикрепление бактерий к поверхностям на неспецифическое и специфическое. Первое обусловлено физико-химическими процессами взаимодействия бактерий с поверхностью: электростатические и гидрофобные взаимодействия, броуновское движение. Неспецифическое прикрепление осуществляется к биотическим и абиотическим объектам и в большей степени обратимо. Специфическое прикрепление происходит после молекулярных взаимодействий между молекулами-адгезинами и рецепторами клеток хозяина. Немаловажную роль в адгезии микроорганизмов к различным поверхностям играют также электрические заряды. Бактериальная поверхность заряжена отрицательно, причем у грамположительных микроорганизмов это обу-

словлено наличием в клеточной стенке тейхоевых и липотейхоевых кислот, а у грамотрицательных – присутствием кислых липополисахаридов и белков [11].

Таким образом, использование планшетов даже одного производителя может приводить к получению значительно различающихся результатов, что обусловлено их физико-химическими особенностями (рис. 3). Так, например, некоторые производители выпускают планшеты со специфическим связыванием углеводов, аминов, ДНК, сульфгидрильных групп; со специальной обработкой поверхности для клеточной адгезии, в том числе и покрытые полилизинном для белковой кристаллизации. Необходимо учитывать тот факт, что к поверхности лунок планшетов микроорганизмы прикрепляются за счет неспецифических факторов. Помимо особенностей поверхности планшета, на формирование биопленок в данной группе методов влияют состав питательных сред (микронутриентный и электролитный) и степень аэрации.

Одной из модификаций планшетного метода исследования формирования биопленок является ALI-метод (air-liquid interface). Его суть заключается в культивировании микроорганизмов в планшете, который находится под углом 30° – 50° таким образом, чтобы мениск жидкой питательной среды соприкасался с серединой дна лунки. Середина лунки является наиболее оптически чистой зоной планшета. В месте соприкосновения жидкой питательной среды с этой зоной формируются максимально благоприятные условия для формирования биопленки. Этот метод позволяет визуализировать биопленки без необходимости использования кра-

сителей с помощью фазово-контрастной микроскопии, а мониторинг можно проводить в режиме реального времени. Его недостатком является возможное уменьшение объема питательной среды в лунке и, как следствие, высыхание места контакта адгезированных микроорганизмов со средой. По этой причине, возникает необходимость постоянного внесения питательной среды в лунки, либо уменьшения времени инкубации [12].

В связи с возрастающим интересом стоматологов к проблеме биопленок был разработан метод их формирования на гидроксиапатитовых дисках. Материал дисков был выбран из-за высокой пористости и схожести его строения с тканями зуба. В дальнейшем метод был стандартизирован и в нем стали использовать поликарбонатные диски. Суть метода заключается в следующем: на поверхность плотной питательной среды помещают диск, на который наносят суспензию исследуемой культуры. Питательные вещества поступают к клеткам путем диффузии через поры поликарбонатного диска. Таким образом, это единственный из разработанных статических методов, при котором к биопленке питательные вещества поступают из плотной среды. Этот метод рекомендуется авторами исследований как основной для выявления влияния антимикробных веществ на формирование биопленок [12].

Отдельно следует указать на метод, разработанный D.E. Kadouri с соавт., который занимает промежуточное положение между статическими и динамическими методами. В методе используются 6-луночные планшеты, к каждой лунке которых подведена система подачи и отвода питательной

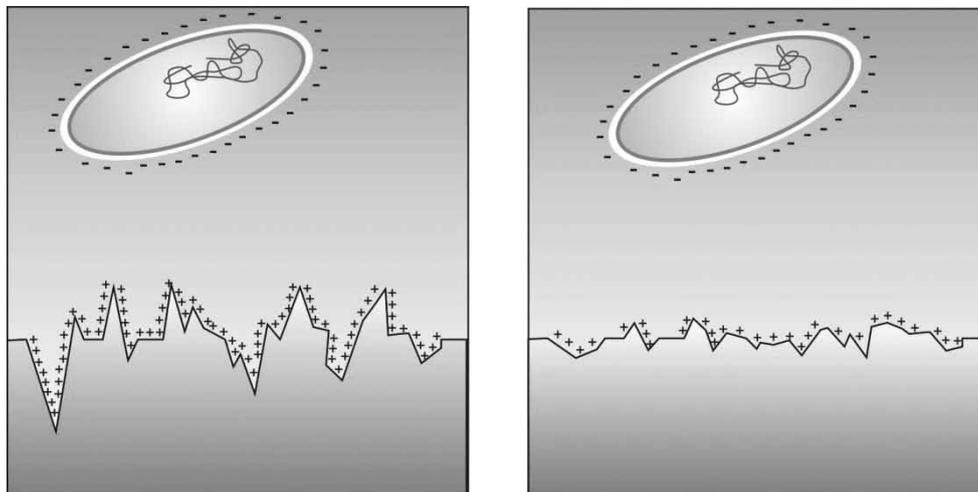


Рис. 3. Влияние структуры абиотической поверхности на адгезию микроорганизмов. На первой части рисунка представлена поверхность с большим положительным зарядом, что обеспечивает более интенсивную неспецифическую адгезию.

среды. После определенного времени инкубации, достаточного для адгезии бактерий на поверхности лунки, подключается система микроциркуляции, которая обеспечивает оптимальное поступление питательных веществ к формирующейся биопленке [12].

Таким образом, в современной микробиологии существует целый ряд методов, позволяющих выращивать микроорганизмы, имеющие медицинское значение, в виде биопленок. Эти методы позволяют изучать особенности жизнедеятельности микробных биопленок, скорость и условия их формирования, визуальное наблюдение в режиме реального времени, изучать адгезивную способность микроорганизмов к абиотическим и биотическим объектам, влияние химических и физических факторов на формирование и разрушение биопленок; выявлять в популяции микроорганизмов штаммы, обладающие повышенной способностью к образованию биопленок. Несмотря на все вышперечисленное, большинство методов, позволяющих культивировать микроорганизмы в виде биопленок, используются в основном в научных исследованиях и не находят применения в клинической практике.

Многие клиницисты требуют от микробиологов наглядное подтверждение наличия биопленок в клиническом материале или на поверхности медицинского оборудования, не учитывая тот факт, что микроорганизмы в естественных условиях практически всегда образуют биопленки, а любой патологический процесс с участием микроорганизмов начинается с их адгезии на клетках и тканях. В связи с этим выявление биопленок в клиническом материале сегодня играет роль лишь в научно-исследовательских целях. Существует достаточно большое количество методов, позволяющих провести визуализацию сформировавшихся бактериальных пленок.

К методам, которые визуализируют ультраструктуру микробных сообществ, можно отнести электронную микроскопию и *конфокальную лазерную сканирующую микроскопию (CLSM)*. Другие методы основаны на сорбции молекул красителя на структурах биопленки, с последующей их отмывкой (десорбцией) в органические растворители. Такой способ индикации биопленок наиболее часто используется в статических методах культивирования микробных биопленок и позволяет дать условную количественную характеристику образовавшимся микробным сообществам, т.е. чем больше образуется матрикс биопленки, тем больше красителя сорбируется на его поверхности и тем выше оптическая плотность образца [13, 14].

Измерение *биолюминесценции (BPI)* – достаточно новый метод изучения и детекции биопленок, который можно использовать как *in vitro*, так и *in vivo*. При искусственном введении в бактерии плазмид, ответственных за синтез люминесцирующего белка, можно проводить визуализацию как адгезированных бактерий, так и матрикс биопленки [15].

Метод *флуоресцентной гибридизации in situ (FISH)* также стал сравнительно недавно использоваться для изучения биопленок в медицине (этот метод часто совмещается с методом CLSM). Метод гибридизации применяют для детекции и определения расположения специфических мРНК в клетках, образующих биопленки, что позволяет установить пространственно-временные особенности экспрессии генов в бактериях. С помощью этого метода была определена неоднородность бактерий в биопленке и выявлены клетки-персистеры, ответственные за выживание популяции во время воздействия летальных для основной массы клеток факторов [1,16].

Заключение

Неоспоримым является тот факт, что микроорганизмы, участвующие в патологических процессах, существуют в виде сложных микробных сообществ. Накопленные данные позволяют с уверенностью говорить о значительной роли факторов персистенции, к которым относится и образование биопленок, в этиологии хронических инфекций. Осмысление этих процессов заставляет пересмотреть принципы терапии инфекционных заболеваний, являясь побудительной причиной к разработке средств и методов, влияющих на формирование либо разрушение биопленок.

На сегодняшний день существует достаточное количество методов, позволяющих культивировать микробные биопленки и визуализировать их как *in vivo*, так и *in vitro*. Большинство из них разрабатывалось с научной целью для подтверждения существования биопленок и выявления их значения в патогенезе инфекционных заболеваний. Однако до настоящего времени эти методы не адаптированы для практического использования. В первую очередь, это связано с тем, что доказана способность формировать биопленки у подавляющего большинства клинически значимых микроорганизмов. Обращает на себя внимание тот факт, что при этом не учитывается то, что образование биопленок – один из факторов патогенности микроорганизмов, а степень его проявления зависит от экспрессии соответствующих генов. Уже в первых работах, посвященных изучению

образования биопленок, было показано, что степень адгезии и способность к пленкообразованию среди микроорганизмов одного вида, выделенных из разных источников, коррелирует со степенью вирулентности [2].

Позже было продемонстрировано, что чувствительность к антибактериальным химиопрепаратам микроорганизмов в планктонной форме и в виде биопленки значительно различается. Это открытие побудило к введению дополнительного параметра для оценки эффективности антибиотиков в виде минимальной концентрации, подавляющей рост биопленки (ВЕС) [17]. В практике клинических микробиологов активно используются стандартизированные методы изучения антибиотикорезистентности, определяющие минимальную подавляющую концентрацию – МПК, и отсутствуют

методы определения минимальных концентраций, подавляющих рост биопленки – ВЕС.

Следует указать также на еще одну проблему, возникающую при изучении биопленок. В зарубежной практике разработаны и стандартизированы методы выявления биопленок лишь для небольшого числа клинически значимых микроорганизмов. Разработка и стандартизация таких методов для других микроорганизмов позволит использовать их в микробиологической практике, например с целью выявления циркуляции в стационарах штаммов микроорганизмов с повышенной способностью к формированию биопленок и адгезии на медицинском оборудовании. Результаты этих исследований могут применяться также в клинической практике для выбора рациональной антимикробной химиотерапии и для оценки ее эффективности.

Литература

1. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биопленки и инфекции. Журнал инфектологии 2010; 2(3):4-15.
2. Christensen G.D, Simpson W.A., Younger J.J., et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiology 1985; 22(6):996-1006.
3. Nedelmann M., Krokotsch A., Schwarzkopf A., Heesemann J., Laufs R. Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: Genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intracellular adhesion. Infect. Immun 1994; 62:3244-53.
4. O'Toole G., Pratt L., Watnick P., et al. Genetic approaches to study of biofilms. Methods Enzymol 1999; 310:91-109.
5. Stepanovic S., Vuković D., Jezek P., Pavlović M., Svabic-Vlahović M. Influence of dynamic conditions on biofilm formation by staphylococci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20:502-4.
6. Danhorn R., Hentzer M., Givskov M., Parsek M.R., Fuqua C. Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. J Bacteriol 2004; 186:4492-501.
7. Seker S., et al. The effects of biofilm thickness on biofilm density and substrate consumption rate in a differential fluidized bed biofilm reactor (DFBBR). J Biotech 1995; 41:39-47.
8. Coenye T., Nelis H.J. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. J Microbiol Meth 2010; 83:89-105.
9. Hall-Stoodley L., Rayner J., Stoodley P., Lappin-Scott H. Establishment of experimental biofilms using the modified robbins device and flow cells. Meth Biotechn 1999; 12:307-18.
10. Jakobsen T.H. et al. Qualitative and quantitative determination of quorum sensing inhibition *in vitro*. Quorum sensing: methods and protocols. Methods in Molecular Biology 2011; 692:253-63.
11. Серегина Н.В. и соавт. Обзор биофизических особенностей микробной адгезии. Вестник новых медицинских технологий 2008; XV(3):175-7.
12. Merritt J.H., et al. Growing and analyzing static biofilms. Current Protocols in Microbiology 2011; 1B.1.1-1B.1.18.
13. Camargo, A.C. Pizzolitto, E.L. Biofilm formation on catheters used after cesarean section as observed by scanning electron microscopy. Intern J Gynecol Obst 2005; 90:148-9.
14. Yerly J., et al. A two-step procedure for automatic and accurate segmentation of volumetric CLSM biofilm images. J Microb Meth 2007; 70:424-33.
15. Jagath L., et al. Bioluminescent imaging of bacterial biofilm infections *in vivo*. Meth Mol Biol 2008; 431:225-39.
16. Nistico L. et al. Fluorescence «in situ» hybridization for the detection of biofilm in the middle ear and upper respiratory tract mucosa. Auditory and Vestibular Research: Methods and Protocols 2008; 493:191-213.
17. Struthers J. K. The Use of a continuous culture system to study the antimicrobial susceptibility of bacteria in biofilm. Meth Molecular Med 2000; 48:215-25.