

## Новый метод исследования антибиотикорезистентности бактериальных биоплёнок

И.В. Чеботарь<sup>1</sup>, Н.А. Маянский<sup>2</sup>, Е.Д. Кончакова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия

<sup>2</sup> Научный центр здоровья детей РАМН, Москва, Россия

Предлагается новый метод оценки чувствительности биоплёночных микроорганизмов к действию противомикробных препаратов. Метод сочетает в себе возможности одновременной оценки выживаемости бактерий в составе биоплёнок при воздействии противомикробного препарата и фильтрующей способности биоплёнки в отношении этого препарата. Метод предполагает применение полимерных мембран (с субмикронными порами), которые используются в качестве подложек для биоплёнок. Перспективность метода продемонстрирована на модели биоплёнок *Staphylococcus aureus*; в ходе апробации метода установлены особенности чувствительности биоплёночных стафи-

лококков к пefлоксацину. *S. aureus* в составе биоплёнок обладает более высокой выживаемостью при обработке пefлоксацином, чем в небиплёночной форме. Диффузия пefлоксацина через биоплёнку выражена слабее, чем диффузия через слой небиплёночных стафилококков. Кроме этого, предлагаемый метод может использоваться в процедуре скрининга биологически активных веществ в процессе поиска препаратов с антибиоплёночной и антибактериальной активностью.

**Ключевые слова:** бактериальные биоплёнки, антибиотикорезистентность, *Staphylococcus aureus*, пefлоксацин.

## A New Method for Evaluation of Antimicrobial Resistance of Bacteria in Biofilms

I.V. Chebotar<sup>1</sup>, N.A. Mayanski<sup>2</sup>, E.D. Konchakova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russia

<sup>2</sup> Scientific Centre for Children's Health of the Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

At the present article we evaluate a relatively new method of the evaluation of activity of antimicrobials against bacterial biofilms. This method combines the possibilities of simultaneous evaluation of bacterial survival in biofilm in the presence of antimicrobial agent and filtration ability of the biofilm for this antimicrobial agent. The perspective of this method was demonstrated in the

model of *Staphylococcus aureus* biofilm. During the study we evaluated peculiarities of the susceptibility of biofilm-forming bacterial cells to pefloxacin. *S. aureus* survival rates in the biofilm were higher than those for non-biofilm cells. Diffusion rate of pefloxacin through the membrane with biofilm was significantly lower than that through the membrane with non-biofilm forming *S. aureus* culture.

**Key words:** bacterial biofilm, antimicrobial resistance, *Staphylococcus aureus*, pefloxacin.

Контактный адрес:

Игорь Викторович Чеботарь

Тел./факс: (831) 465-42-71

Эл. почта: nizarnn@yandex.ru

## Введение

Микробные биоплёнки – это образованные оседлыми микробами сообщества, характеризующиеся тем, что клетки, прикрепленные к субстрату или к поверхности друг друга, погружены в матрикс, образованный внеклеточными полимерными субстанциями [1]. В составе биоплёнок микроорганизмы приобретают качественно новые свойства – устойчивость к иммунным эффекторам и резистентность к противомикробным препаратам [2, 3]. В глубоких слоях биоплёнок микробы выдерживают дозы антибиотиков, которые в десятки и сотни раз превышают терапевтические концентрации [1]. В биоплёнках действуют не только общеизвестные, но и особые биоплёночные механизмы антибиотикорезистентности. К числу последних принадлежат: фильтрующая способность, которая блокирует диффузию антибиотика в глубокие слои биоплёнок; присутствие популяций нечувствительных к антибиотикам микробов-персистеров; повышенная мутабельность биоплёночных микробов, приводящая к быстрой адаптации микроба к противомикробному препарату [4]. Успех в борьбе с биоплёночными инфекциями во многом зависит от эффективности методов оценки биоплёночной антибиотикорезистентности микроба-возбудителя. Рутинные методы, которые базируются на моделях планктонных микробов, не позволяют сделать корректный вывод об антибиотикорезистентности микробов в составе биоплёнок.

В современной литературе предлагаются новые способы исследования биоплёночной антибиотикорезистентности и даже новые критерии оценки – ВИС (от англ. «biofilm inhibitory concentrations»), ВВС (от англ. «biofilm bactericidal concentration»), МВИС (от англ. «minimum biofilm inhibitory concentrations») [5–7]. Большинство из предложенных методов воспроизводят обычную методику определения *минимальной подавляющей концентрации* (МПК) и *минимальной бактерицидной концентрации* (МБК), изменяя лишь объект исследования. Вместо бульонной или газонной культур они используют биоплёнку с последующей оценкой жизнеспособности высвободившихся биоплёночных бактерий. Жизнеспособность оценивается традиционными методами: по количеству *колониеобразующих единиц* (КОЕ) или по оптическим характеристикам среды, в которой размножаются микробы. Однако исследование биоплёночной антибиотикорезистентности требует более сложных методик, которые должны быть направлены на дифференцированную оценку различных механизмов (персистирование, фильтрация, экспрессия

генов резистентности и т.д.), вносящих вклад в общую биоплёночную антибиотикорезистентность.

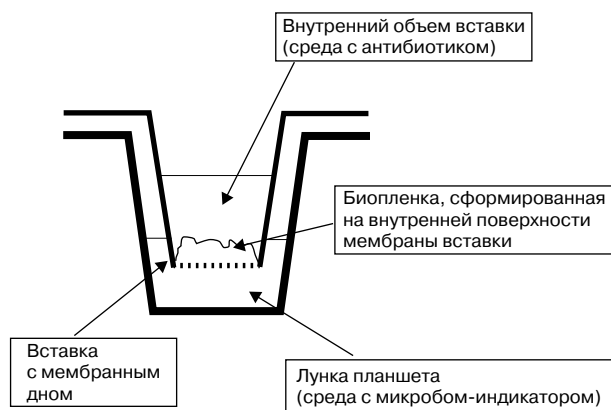
Цель настоящей работы – показать эффективность нового способа, сочетающего возможность одновременного определения чувствительности биоплёночных микробов к антимикробным препаратам и оценку фильтрующей способности биоплёнок в отношении противомикробных агентов. В качестве модели был использован один из самых актуальных для современной медицины возбудителей – золотистый стафилококк, который относится к наиболее мощным биоплёнокообразующим бактериям [8].

## Материал и методы

Чувствительность биоплёночного микроба *Staphylococcus aureus*, штамм 5983/2 к антибиотикам исследовали по их выживаемости в присутствии пefлоксацина. В качестве критерия оценки действия антибиотика использовали количество КОЕ в пробах после обработки пefлоксацином. Фильтрующую способность биоплёнки оценивали по диффузии сквозь биоплёнку пefлоксацина; эффект фиксировали по выживаемости в присутствии диффундировавшего антибиотика микроба-индикатора, в качестве которого использовали тот же штамм стафилококка, что формировал биоплёнку. Критерием служило количество КОЕ микроба-индикатора после воздействия на него диффундирующего сквозь биоплёнку антибиотика.

Бактериальные клетки культивировали в бульоне Tryptic Soy Broth (TSB) (Becton Dickinson and Company), содержащем 1% глюкозы. Через 24 часа инкубации (37 °C) взвесь стафилококков разводили тем же бульоном до показателя мутности 0,5 на спектрофотометре Densi La Meter II (ERBA Lachema); 1 мл содержал  $\sim 10^8$  КОЕ стафилококков. Биоплёнку воспроизводили в системах, состоящих из вставок с мембранным дном (Hanging Cell Culture Insert, поры 0,4 мкм, мембрана PET, Merck Millipore) и соответствующих им 12-луночных планшетов. Общая схема, отражающая основные элементы системы для тестирования биоплёночной антибиотикорезистентности, представлена на рисунке.

Для создания биоплёнок по 1 мл суточной взвеси стафилококков в бульоне TSB, содержащем 1% глюкозы, вносили на внутренние поверхности мембраны вставок. Мембранные вставки помещали в планшеты и инкубировали в течение 48 часов при 37 °C. Формирование биоплёнок контролировали, как было описано ранее [9]. В качестве негативного контроля использовали мембранные вставки, проинкубированные в течение 48 часов со стерильным бульоном TSB, содержащим 1% глюкозы.



Основные элементы системы для тестирования биоплёночной антибиотикорезистентности (система «вставка-планшет» в разрезе).

Антибактериальный препарат, вносимый внутрь инсера, диффундирует в лунку планшета через мембрану с расположенной на ней стафилококковой биоплёнкой. Скорость диффузии зависит как от препарата, так и от свойств биоплёнки.

Через 48 часов от начала инкубации были смоделированы контрольные системы, позволяющие выявить свойства, качественно отличающие стафилококковые биоплёнки от небиоплёночных стафилококков. В качестве небиоплёночных стафилококков использовали слой адгезированных между собой стафилококков, полученный в результате 10-минутного центрифугирования (1000 g) мембранных вставок со взвесью стафилококков. Взвесь стафилококков получали из надсадочного слоя двухсуточной культуры *S. aureus* 5983 на бульоне TSB, содержащем 1% глюкозы. Планктонные бактерии трижды отмывали раствором Хенкса, ресуспендировали в бульоне Мюллера–Хинтон и вносили по 0,9 мл в чистые мембранные вставки, которые сразу же подвергали центрифугированию, как было описано выше. Количество вносимых в каждую вставку стафилококков было эквивалентным среднему количеству бактерий в одной двухсуточной биоплёнке (концентрацию стафилококков стандартизовали при помощи спектрофотометра Densi La Meter II).

Через 48 часов инкубации из мембранных вставок с биоплёнками и проб негативного контроля аккуратно удаляли супернатант и добавляли в них по 1,0 мл бульона Мюллера–Хинтон, содержащего 0, 10, 20 и 30 мкг/мл пefлоксацина. Дозировки пefлоксацина были выбраны, исходя из его терапевтических концентраций в тканях [10]. В лунки планшетов вносили по 1 мл взвеси микроба-индикатора (*S. aureus* 5983/2) в растворе Хенкса в концентрации  $10^4$  КОЕ в 1 мл. Мембранные вставки помещали в лунки планшетов и инкубировали 4 часа при 37 °С.

После инкубации с целью определения количества выживших во вставках и в лунках стафилококков проводили высеv материала на *мясо-пептонный агар* (МПА). Для этого после 4-часовой инкубации среду внутри инсера подвергали тщательному пипетированию, добиваясь механического разрушения биоплёнки, затем отбирали 0,5 мл супернатанта и разводили его раствором Хенкса до показателя 0,5 на спектрофотометре Densi La Meter II. Полученную взвесь разводили раствором Хенкса в 10000 раз и отбирали 0,01 мл для посева на МПА. Через 24 часа оценивали количество КОЕ на каждой чашке и пересчитывали количество КОЕ на 1 мл исходного объема взвеси из мембранных вставок. После 4-часовой инкубации биоплёнок с пefлоксацином из лунок со взвесью микроба-индикатора отбирали по 0,01 мл жидкости и проводили посев на чашки Петри (диаметр 90 мм) с МПА, через 24 часа оценивали количество КОЕ на каждой чашке и пересчитывали количество КОЕ на 1 мл исходного объема взвеси из лунок планшета. Каждую пробу в каждой серии экспериментов выполняли в трех повторах, каждая серия включала не менее четырех экспериментов.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного пакета SPSS Statistics 16.0. Данные в тексте и таблицах представлены в виде средней величины  $\pm$  стандартная ошибка средней. Различия оценивали с помощью критерия Манна–Уитни и считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Показатели выживаемости бактерий в составе биоплёнки *S. aureus* 5983/2 под воздействием пefлоксацина представлены в табл. 1. Различия в показателях выживаемости между биоплёночными и небиоплёночными (адгезированными) стафилококками оказались статистически значимыми: выживаемость биоплёночных стафилококков при 4-часовой инкубации с пefлоксацином была выше при всех концентрациях пefлоксацина (во всех случаях  $p < 0,05$ ).

Статистически значимое снижение выживаемости стафилококков в биоплёнке по сравнению с контролем (пробы без пefлоксацина) наблюдалось лишь при начальных концентрациях антибиотика в мембранной вставке 20 и 30 мкг/мл (соответственно  $p < 0,05$  и  $p < 0,001$ ). Показатели КОЕ из вставок с биоплёнками без антибиотика и с минимальной (10 мкг/мл) концентрацией пefлоксацина практически не различались между собой ( $p > 0,05$ ).

Чувствительность небиоплёночных стафилококков к пefлоксацину была высокой даже при

минимальной концентрации антибиотика (10 мкг/мл): показатели в этих пробах были статистически значимо ниже, чем показатели в контроле без антибиотика ( $p < 0,05$ ).

Результаты исследования диффузии пefлоксацина через биоплёнку на основе *S. aureus* 5983/2 отражены в табл. 2. Напомним, что показатели, выраженные в количестве КОЕ микроба-индикатора на 1 мл среды, отражают количество бактерий, сохранивших жизнеспособность при воздействии пefлоксацина, диффундировавшего через биоплёнку. Диффузия через биоплёнку в течение 4 часов проявлялась лишь при начальных концентрациях антибиотика 20 и 30 мкг/мл: только при таких концентрациях выживаемость микроба-индикатора статистически значимо снижалась (соответственно  $p < 0,05$  и  $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольными пробами (система без антибиотика). Подобные результаты были получены и в системе с небиоплёночными бактериями: только при начальных концентрациях пefлоксацина 20 и 30 мкг/мл наблюдалось статистически значимое снижение КОЕ по сравнению с контролем без антибиотика (соответственно  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ ). На чистых мембранах при всех концентрациях антибиотика наблюдалось значительное подавление роста микроба-индикатора, значения были статистически значимо ниже, чем в контрольных пробах без антибиотика (во всех случаях  $p < 0,05$ ).

Важные результаты были выявлены при сравнении показателей подавления роста микроба-индикатора при диффузии антибиотика через биоплёнку и через слой адгезированных бактерий: при концентрации 20 мкг/мл диффузия через биоплёнку значительно «отставала» от диффузии через слой адгезированных бактерий. Об этом свидетельствует статистически значимое уменьшение числа КОЕ ( $p < 0,05$ ) микроба-индикатора в системе с небиоплёночными микробами по сравнению с результатами из проб с биоплёнками. При начальной концентрации пefлоксацина 30 мкг/мл различия между показателями диффузии через биоплёнку и через слой небиоплёночных бактерий были статистически незначимы ( $p > 0,05$ ).

Повышенная выживаемость клеток *S. aureus* в биоплёнках по сравнению с небиоплёночными бактериями говорит о существовании специфических для биоплёнок механизмов устойчивости. Это явление может быть связано с двумя важнейшими путями приобретения биоплёночной резистентности. Во-первых, в биоплёнках существует относительно большое количество (от 1 до 10%) метаболически заторможенных бактерий-персистеров, нечувствительных к антибиотикам [4, 11]. Во-вторых, устойчивость может быть связана с фильтрующей способностью матрикса, затрудняющей доставку антибиотика во внутренние слои биоплёнки. Матрикс не только связывает клетки в

Таблица 1. Выживаемость бактерий в составе биоплёнки *S. aureus* 5983/2 под воздействием пefлоксацина

Начальная концентрация пefлоксацина в мембранной вставке, мкг/мл	Выживаемость стафилококков в биоплёнке		Выживаемость небиоплёночных стафилококков	
	КОЕ × 10 <sup>9</sup> на 1 мл среды			
Контроль (без пefлоксацина)	3,2±0,1		3,1±0,2	
10	3,1±0,1		2,5±0,1	
20	2,6±0,1		1,8±0,1	
30	1,4±0,1		0,6±0,2	

**Примечание.** Показатели отражают количество жизнеспособных стафилококков.

Таблица 2. Диффузия пefлоксацина через биоплёнку *S. aureus* 5983/2

Концентрация пefлоксацина в мембранной вставке, мкг/мл	Система с биоплёнкой	Система с небиоплёночными бактериями	Мембранные вставки без бактерий
	КОЕ × 10 <sup>8</sup> на 1 мл среды		
Контроль (без пefлоксацина)	2,8±0,3	2,7±0,2	2,8±0,1
10	2,8±0,4	2,2±0,4	1,4±0,2
20	1,0±0,3	0,2±0,1	0,2±0,1
30	0,2±0,1	0,1±0,1	0±0,1

**Примечание.** Показатели обратно пропорциональны количеству пefлоксацина, диффундировавшего через биоплёнку.

единую структуру, но и заполняет межклеточные пространства, образуя трехмерную фильтрующую систему. Это позволило назвать биоплёнку «молекулярным фильтром» и считать фильтрацию одной из важнейших функций биоплёнки [12]. Элементы матрикса являются не только пассивным барьером. Например, глицерол-фосфорилированные бета-глобулины *Pseudomonas aeruginosa* не просто замедляют диффузию аминогликозидов (канамицина) сквозь биоплёнку, но и активно связывают антибиотик [13].

Вероятно, что в наших экспериментах повышенная выживаемость биоплёночных стафилококков была связана с фильтрующей способностью биоплёнок. Косвенным подтверждением этого служат результаты, иллюстрирующие способность биоплёнок *S. aureus* задерживать диффузию пefлоксацина. Пefлоксацин, внесенный в мембранную вставку с биоплёнкой в концентрации 20 мкг/мл, которая превышает терапевтические концентрации примерно в 3 раза, подавлял жизнеспособность микроба-индикатора лишь на 65%, хотя такая же концентрация антибиотика в системе с небиоплёночными (адгезированными) стафилококками приводила к практически полному подавлению микроба-индикатора. Такие различия логичнее всего объяснить за счет матрикс-зависимой фильтрации, которая не только задерживает транспорт пefлоксацина сквозь биоплёнку, но и препятствует поступлению антибиотика в глубокие слои биоплёнки. У небиоплёночных стафилококков, которые не ассоциированы с матриксом, подобный механизм отсутствовал.

Полученные нами результаты не противоречат известным данным. Так, слизистые полисахариды, выделенные из матрикса биоплёнок *Staphylococcus epidermidis*, снижали антибактериальный эффект ванкомицина и тейкопланина за счет прямого свя-

зывания этих антибиотиков [14]. Аналогичное подавление активности гликопептидов (ванкомицина, тейкопланина) и бета-лактамов (оксациллина, цефотаксима) было получено в опытах со слизью разных штаммов эпидермального и золотистого стафилококков [15, 16].

Учитывая актуальность медицинских проблем, связанных с биоплёнками, можно утверждать, что современная медицина остро нуждается в разработке и внедрении стандартных способов исследования антибиотикочувствительности биоплёночных микробов. Такие способы станут основой для создания глобальной системы мониторинга биоплёночной антибиотикорезистентности. Авторы выражают надежду, что предлагаемый метод может стать одним из инструментов в решении этой проблемы.

### Заключение

Результаты, полученные в работе, позволяют сделать два важных вывода. Во-первых, *S. aureus* в составе биоплёнок обладает более высокой выживаемостью при обработке пefлоксацином, чем в небиоплёночной форме. Во-вторых, диффузия пefлоксацина через биоплёнку выражена слабее, чем через слой небиоплёночных стафилококков. Полученные данные говорят о перспективности предлагаемого метода для определения чувствительности биоплёночных микробов к антимикробным препаратам. Метод сочетает в себе возможности одновременной оценки выживаемости бактерий в составе биоплёнок при воздействии противомикробного препарата и фильтрующей способности биоплёнки в отношении этого препарата. Дополнительной областью применения предлагаемого метода может стать скрининг биологически активных веществ с целью поиска препаратов с антибиоплёночной и антибактериальной активностью.

### Литература

1. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15(2):167-93.
2. Бехало В.А., Бондаренко В.М., Сысолятина Е.В., Нагурская Е.В. Иммунобиологические особенности бактериальных клеток медицинских биопленок. Журн Микробиол 2010; (4):97-105.
3. Peeters E., Nelis H. J., Coenye T. Evaluation of the efficacy of disinfection procedures against *Burkholderia cepacia* biofilms. J Hosp Infect 2008; 70:361-8.
4. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д., Лазарева А.В., Чистякова В.П. Антибиотикорезистентность биоплёночных бактерий. Клин микробиол антимикроб химиотер 2012; 14:51-8.
5. Moskowitz S.M., Foster J.M., Emerson J., Burns J.L. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2004; 42:1915-22.
6. Frank K.L., Reichert E.J., Piper K.E., Patel R. *In vitro* effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:888-95.
7. Sepandj F., Ceri H., Gibb A., Read R., Olson M. Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of gram-negative bacilli causing peritonitis. Perit Dial Int 2004; 24:65-7.
8. Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение. Журн микробиол 2011; (1):101-8.

9. Чеботарь И.В., Кончакова Е.Д., Евтеева Н.И. Нейтрофилзависимое разрушение биоплёнок, образованных *Staphylococcus aureus*. Журн микробиол 2012; (1):10-1.
10. Антибактериальные лекарственные средства. Методы стандартизации препаратов. Под редакцией Хабриева Р.У. - М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2004. - 944 с.
11. Льюис К. Персистирующие клетки и загадка выживания биоплёнок. Биохимия 2005; 70(2):327-36.
12. Dunne W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? Clin Microbiol Rev 2002; 15(2):155-66.
13. Sadvskaya I., Vinogradov E., Li J., Nachani A., Kowalska K., Filloux A. High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the ndvB gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-glucans, which bind aminoglycosides. Glycobiology 2010; 20(7):895-904.
14. Farber, B. F., Kaplan M. H., Clogston A. G. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptides antibiotics. J Infect Dis 1990; 161: 37-40.
15. Mathur T., Singhal S, Khan S, Upadhyay D, Fatma T, Rattan A. Adverse effect of staphylococci slime on *in vitro* activity of glycopeptides. Jpn J Infect Dis 2005; 58(6): 353-7.
16. Singh R., Ray P., Das A., Sharma M. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. J Antimicrob Chemother 2010; 65:1955-8.