

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ

УДК 614.446.2

Е. М. Гордина^a, Э. С. Горовиц^b, С. В. Поспелова^b

^a Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет, Санкт-Петербург, Россия

^b Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

ФАКТОРЫ ПЕРСИСТЕНЦИИ СТАФИЛОКОККОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ОТ БАКТЕРИОНОСИТЕЛЕЙ

Обследовано 92 практически здоровых человека, со слизистых носа и зева которых выделили 113 штаммов стафилококков, из них *S. aureus* – 27, коагулазоотрицательных стафилококков (КОС) – 86. Оценили устойчивость к лизоциму и биопленкообразующую способность выделенных культур, а также взаимосвязь изученных факторов. Культуры *S. aureus* отличались более выраженной устойчивостью к действию лизоцима по сравнению с КОС. Около половины всех тестируемых культур характеризовались высокой степенью выраженности биопленкообразования (БПО). Штаммы со слабой БПО активностью преимущественно встречались среди КОС. У штаммов с высокой степенью резистентности к лизоциму, как правило, регистрировали низкую степень выраженности БПО. Установлено, что в присутствии лизоцима биопленки в сравнении с контролем были менее выражены, все изученные штаммы характеризуются устойчивостью к лизоциму и способностью образовывать; выявлена обратная корреляционная связь между изученными факторами персистенции, а также показано значение лизоцима как фактора, снижающего БПО стафилококков.

Ключевые слова: стафилококки; бактерионосительство; устойчивость к лизоциму; биопленкообразование.

E. M. Gordina^a, E. S. Horowitz^b, S. V. Pospelova^b

^a Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russian Federation

^b Perm State Medical University named by acad. E.A. Vagner, Perm, Russian Federation

FACTORS PERSISTENCE OF *STAPHYLOCOCCI* ISOLATED FROM BACTERIOCARRIERS

92 healthy subjects were examined on staphylococcal bacteriocarrier. 113 strains of staphylococci, including *S. aureus* - 27, coagulase-negative staphylococci (CNS) - 86 were isolated from the mucous of the nose and throat. Resistance to lysozyme and biofilm formation ability isolates of staphylococcus, and the relationship of the studied factors were estimated. Cultures *S. aureus* differed more pronounced resistance to the action of lysozyme compared with CNS (the differences are statistically significant). About half of all tested cultures were characterized by a high degree of expression of biofilm formation. At the same strains with weak activity biofilm formation mainly occurred among CNS. An analysis of the interdependence of degree of resistance to lysozyme and the intensity of biofilm formation showed that all studied strains of staphylococci, the degree of manifestation of resistance to the action of lysozyme and the intensity of the biofilm formation are inversely related ($r = -0,35$). In other words, in strains with a high degree of resistance to lysozyme usually recorded low degree of biofilm formation. It is found that in the presence of lysozyme biofilms formed by different staphylococcal species, are less pronounced in comparison with the control. The studies found that all studied strains of staphylococci are characterized by resistance to lysozyme and the ability to form a biofilm of varying severity. Also found an inverse correlation between the studied factors of persistence. We also show the value of lysozyme, as a factor in reducing biofilm formation of staphylococcus.

Key words: *Staphylococcus*; bacteriocarrier; stability to lysozyme; biofilm formation.

Стафилококки способны выживать при различных неблагоприятных воздействиях окружающей среды, а также противостоять факторам резистентности макроорганизма. В значительной степени эти свойства связаны с наличием у них ряда факторов

персистенции. К их числу относят устойчивость к действию лизоцима и биопленкообразование, которые являются способом существования бактерий и одним из ведущих механизмов сохранения их жизнеспособности в неблагоприятных условиях [Ильина,

Романова, Гинцбург, 2004; Гостев, Сидоренко, 2010; Archer et al., 2011].

Штаммы *S. aureus* обладают генами, кодирующими O-ацетилтрансферазу пептидогликана – фермента, обеспечивающего модификацию пептидогликана клеточной стенки, в результате чего формируется устойчивость к действию лизоцима [Бухарин, 2014]. Штаммы коагулазоотрицательных стафилококков (КОС) способны продуцировать различные вещества, обладающие антилизоцимными свойствами. Однако степень выраженности устойчивости к лизоциму у различных изолятов остается варибельным признаком.

По данным различных авторов, до 60% всех бактериальных инфекций человека связаны с образованием биопленок [Гостев, Сидоренко, 2010]. Под биопленками принято понимать живое, постоянно обновляющееся сообщество одного или нескольких видов бактерий, которые закрепилась на биогенном или абиогенном субстрате и окружены полимерным материалом (матриксом), предохраняющим их от вредных воздействий окружающей среды [Чеботарь, 2012; Поспелова, Горовиц, Лемкина, 2014]. Формирование биопленок в очаге воспаления ведет к хронизации инфекционного процесса и сопровождается неудовлетворительными результатами антибиотикотерапии [Gotz, 2002; Kaplan, 2010].

На процесс биопленкообразования могут оказывать влияние многочисленные факторы иммунной системы, в том числе лизоцим. В соответствии с данными литературы существуют различные точки зрения в отношении его влияния как одного из факторов гуморального врожденного иммунитета на биопленкообразование стафилококков [Archer et al., 2011]. По данным [Чеботарь, 2012], лизоцим усиливает как адгезию *S. aureus* – первый этап биопленкообразования, так и второй – индуцирует их агрегацию. Напротив, [Yuan, Wan, Liang, 2011] считают, что лизоцим угнетает адгезию стафилококков, тем самым снижая уровень биопленкообразования.

Цель исследования – оценить устойчивость к лизоциму и биопленкообразующую способность выделенных от практически здоровых людей культур стафилококков, а также взаимосвязь изученных факторов персистенции.

Материалы и методы

На стафилококковое бактерионосительство обследовано 92 практически здоровых человека. Материал забирали стерильными ватными тампонами со слизистых носа и зева. Посев исследуемого материала проводили параллельно на желточно-солевой и кровяной агары. Способность стафилококков коагулировать плазму изучали традиционным методом с использованием цитратной кроличьей плазмы.

Биопленкообразующую способность стафилококков исследовали в 96-луночных полистироловых

планшетах для иммуноферментного анализа (Медполимер, Россия). В 6 лунок каждого ряда планшета вносили по 100 мкл инокулума определенного штамма стафилококков, содержащего 10^7 КОЕ/мл, после чего планшеты инкубировали в течение 24 ч в термостате (37°C). Через сутки планктонную культуру из всех лунок удаляли, биопленки дважды промывали 10 мМ фосфатным буфером (pH 7.2), затем окрашивали 0.1%-ным раствором генцианвиолета, с последующей спиртовой экстракцией связавшегося красителя для оценки общей биомассы образовавшихся пленок. Детекцию окрашенных экстрактов биопленок осуществляли на ридере BenchmarkPlus (BioRad, США) при длине волны 570 нм. Степень выраженности биопленкообразования стафилококков определяли в соответствии с критериями, разработанными [Stepanovic et al., 2007].

Для изучения влияния лизоцима на биопленкообразование изолированных штаммов стафилококков в 4 лунки 96-луночного полистиролового планшета для иммуноферментного анализа вносили по 100 мкл бульона LB с лизоцимом в концентрации 10.0 мкг/мл, затем добавляли по 25 мкл исследуемой культуры стафилококков (10^7 КОЕ/мл). Контроль – 100 мкл бульона LB без лизоцима и 25 мкл этой же культуры стафилококков (2 лунки). Планшеты инкубировали в течение 24 ч при температуре 37°C. Через сутки лунки планшета дважды промывали 10 мМ фосфатным буфером (pH 7.2), окрашивали 0.1%-ным раствором генцианвиолета с последующей спиртовой экстракцией связавшегося красителя для оценки общей биомассы образовавшихся пленок. Далее измеряли оптическую плотность на ридере при длине волны 600 нм и рассчитывали средние значения оптической плотности в опытных и контрольных лунках. Оценку влияния лизоцима на биопленкообразование штаммов стафилококков выполняли по разнице цифровых значений оптической плотности в опыте и контроле. Устойчивость изолятов к лизоциму изучали оригинальным методом (патент № 2567642). В 4 лунки 96-луночного полистиролового планшета для иммуноферментного анализа (Медполимер, Россия) вносили по 100 мкл бульона LB с лизоцимом в концентрации 12.5 мкг/мл, затем добавляли по 25 мкл исследуемой культуры стафилококков (10^7 КОЕ/мл), культивируемой в условиях постоянного встряхивания. В 2 контрольные лунки добавляли 100 мкл бульона LB без лизоцима и 25 мкл культуры. Планшеты инкубировали при температуре 37°C. Через 2 и 4 ч инкубации измеряли оптическую плотность смесей (опыт и контроль) на ридере BenchmarkPlus (BioRad, США) при длине волны 600 нм. Далее рассчитывали коэффициент устойчивости к лизоциму по формуле

$$K = \frac{V_K \times V_D \times C_D \times (M_{O4} - M_{O2})}{M_{K4} - M_{K2}} \times 100,$$

где K – коэффициент устойчивости стафилококков к лизоциму; V_K – объем бульонной культуры исследуемого штамма; V_L – объем раствора лизоцима исходной концентрации; C_L – концентрация лизоцима; M_{O4} , M_{O2} – среднее значение оптической плотности опытных лунок с бульонной культурой исследуемого штамма с лизоцимом через 4 и 2 ч инкубации; M_{K4} , M_{K2} – среднее значение оптической плотности контрольных лунок с бульонной культурой исследуемого штамма без лизоцима через 4 и 2 ч инкубации.

Значение $K < 0.49$ определяли как низкую степень выраженности признака, K в пределах 0.5–2.49 – как среднюю степень, а $K > 2.5$ – как высокую степень выраженности.

Результаты и их обсуждение

Всего со слизистых носа и зева практически здоровых людей выделено 113 штаммов стафилококков, из них *S. aureus* – 27, КОС – 86.

Все культуры стафилококков обладали устойчивостью к лизоциму той или иной степени выраженности, данные представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты изучения степени выраженности устойчивости к лизоциму *S. aureus* и КОС

Виды стафилококков	Количество штаммов (абс/%) с различной степенью устойчивости к лизоциму		
	низкая	средняя	высокая
<i>S. aureus</i> (n=27)	1/ 3.7±0.7	6/ 22.2±4.3	20/ 74.1±14.3
КОС (n=86)	43/ 50.0±5.4	28/ 32.6±3.7	15/ 17.4±1.9
<i>p</i>	0.0001	0.32	0.0001

Примечание. *p* – статистическая значимость различий степени выраженности устойчивости к лизоциму между штаммами *S. aureus* и КОС (расчет для абсолютных показателей).

Из представленных в таблице данных следует, что изоляты *S. aureus* и КОС отличались между собой по степени выраженности данного признака (различия статистически значимы). Так, штаммы *S. aureus* чаще обладали высокой степенью резистентности к лизоциму. Напротив, у культур КОС чаще регистрировали низкую степень выраженности этого признака. Что касается средней степени, то она в большей мере была характерна для изолятов КОС, но статистически значимых различий не выявлено. Таким образом, культуры *S. aureus* отличались более выраженной устойчивостью к действию лизоцима.

В последующем проведено изучение биоупленкообразования (БЮ) изолятов. Результаты представлены в табл. 2.

Из представленных в табл. 2 данных следует, что практически половина тестируемых культур характеризовались высокой степенью выраженности БЮ. При этом штаммы КОС чаще обладали слабой степенью выраженности БЮ в сравнении с культурами *S. aureus* (различия статистически значимые). Для средней и сильной степени таких закономерностей не выявлено.

Таблица 2

Результаты изучения степени выраженности биоупленкообразования *S. aureus* и КОС

Виды стафилококков	Количество штаммов (абс/%) с различной степенью выраженности БЮ		
	слабая	средняя	сильная
<i>S. aureus</i> (n=27)	1/ 5.9±1.4	12/ 44.4±11.4	14/ 54.9±20.0
КОС (n=86)	20/ 23.4±2.9	26/ 30.2±3.7	40/ 46.5±5.7
<i>p</i>	0.0001	0.12	0.43

Примечание. *p* – статистическая значимость различий степени выраженности биоупленкообразования между штаммами *S. aureus* и КОС (расчет для абсолютных показателей).

Проведен анализ взаимозависимости изученных факторов персистенции стафилококков – степени выраженности устойчивости к лизоциму и интенсивности биоупленкообразования. Для всех изученных штаммов стафилококков, независимо от способности коагулировать плазму, степень проявления устойчивости к действию лизоцима и интенсивность БЮ находятся в обратной зависимости ($r = -0.35$). Иными словами, у штаммов с высокой степенью резистентности к лизоциму, как правило, регистрировали низкую степень выраженности биоупленкообразования. Учитывая однонаправленность этих факторов, можно полагать, что они «компенсируют» друг друга.

В серии специальных экспериментов изучено влияние лизоцима на биоупленкообразование изолированных штаммов стафилококков. Установлено, что в присутствии лизоцима биоупленки, образованные различными видами стафилококков, были менее выражены, в сравнении с контролем. Так, среднее значение оптической плотности толщины биоупленки в лунках с лизоцимом составило 0.486±0.046, в контроле – 0.792±0.074 ($p = 0.00007$). Данный факт показал значение лизоцима, как фактора, снижающего БЮ, при воздействии непосредственно на стафилококки.

Заклучение

В результате проведенных исследований установлено, что все изученные штаммы стафилококков характеризуются устойчивостью к лизоциму и

способностью образовывать биопленки различной степени выраженности. Кроме того, выявлена обратная корреляционная связь между изученными факторами персистенции. Показано также значение лизоцима как фактора, снижающего биопленкообразование стафилококков.

Выражаем глубокую признательность Лемкиной Ларисе Марковне, старшему научному сотруднику лаборатории биохимии развития микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, за проведение исследований.

Библиографический список

- Бухарин О.В. Микросимбиоз. Екатеринбург, 2014. 260 с.
- Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биопленки и инфекции // Журнал инфектологии. 2010. Т. 2, № 3. С. 4–15.
- Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. 2004. Т. 40, № 11. С. 1445–1456.
- Поспелова С.В., Горовиц Э.С., Лемкина Л.М. Влияние техногенной нагрузки на видовой состав и особенности биопленкообразования стафилококков, изолированных от бактерионосителей // Экология человека. 2014. № 5. С. 48–52.
- Чеботарь И.В. Механизмы антибиопленочного иммунитета // Вестник РАМН. 2012. № 12. С. 22–29.
- Archer N.K. et al. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation and roles in human disease // *Virulence*. 2011. Vol. 2, № 5. P. 445–459.
- Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms // *Mol. Microb.* 2002. Vol. 43, № 6. P. 1367–1378
- Kaplan J.B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses // *J. Dent. Res.* 2010. Vol. 89, № 3. P. 205–218.
- Stepanovic S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci // *APMIS*. 2007. Vol. 115, № 8. P. 891–899.
- Yuan S., Wan D., Liang B. Lysozyme-coupled poly(poly(ethylene glycol) methacrylate)-stainless steel hybrids and their antifouling and antibacterial surfaces // *Langmuir*. 2011. Vol. 27, № 6. P. 2761–2774.

References

- Buharin O.V. *Mikrobosimbioz* [Microsymbiosis]. Ekaterinburg, 2014, 260 p. (In Russ.).
- Gostev V.V., Sidorenko S.V. [Bacterial biofilms and infections]. *Žurnal infektologii*, V. 2, N 3 (2010): pp. 4-15. (In Russ.).
- Il'ina T.S., Romanova Ju.M., Gincburg A.L. [Biofilms as a way of existence of bacteria in the environment and the host organism: the phenomenon, genetic control and the systems of regulation of their development]. *Genetika*, V. 40, N 11 (2004): pp. 1445-1456. (In Russ.).
- Pospelova S.V., Horowitz E.S., Lemkina L.M. Influence of anthropogenic load on species composition and peculiarities of biofilm formation of staphylococci isolated from bacterial carriers. *Ėkologija čeloveka*, N 5 (2014): pp. 48-52. (In Russ.).
- Chebotar' I.V. [Mechanisms of antibiofilm immunity]. *Vestnik RAMN*, N 12 (2012): pp. 22-29. (In Russ.).
- Archer N.K., Mazaitis M.J., Costerton J.W., Leid J.G., Powers M.E., Shirtliff M.E. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation and roles in human disease. *Virulence*, V. 2, N 5 (2011): pp. 445-459.
- Gotz F. *Staphylococcus* and biofilms. *Mol. Microb.* V. 43, N 6 (2002): pp. 1367-1378.
- Kaplan J.B. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J. Dent. Res.* V. 89, N 3 (2010): pp. 205-218.
- Stepanovic S., Vukovic D., Hola V., Di Bonaventura G., Djukic S., Cirkovic I. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. V. 115, N 8 (2007): pp. 891-899.
- Yuan, S. Wan D., Liang B. Lysozyme-coupled poly(poly(ethylene glycol) methacrylate)-stainless steel hybrids and their antifouling and antibacterial surfaces. *Langmuir*, V. 27, N 6 (2011): pp. 2761-2774.

Поступила в редакцию 04.04.2017

Об авторах

Гордина Екатерина Михайловна, кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

About the authors

Gordina Ekaterina M., MD, PhD, Senior Lecturer Department of Microbiology, Virology and Immunology St. Petersburg State Pediatric Medical University
ORCID: 0000-0003-2326-7413

ORCID: 0000-0003-2326-7413
194100, г. Санкт-Петербург, ул. Литовская, 2;
kate_alex.07@mail.ru

Горовиц Эдуард Семенович, доктор медицинских наук, профессор, зав.кафедрой микробиологии, вирусологии с курсом клинической лабораторной диагностики

ФГБОУВО «Пермский государственный медицинский университет им. ак. Е.А. Вагнера»

ORCID: 0000-0003-4320-8672
614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26;
eduard.gorovitz@mail.ru; (342)2364485

Поспелова Светлана Валерьевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии с курсом клинической лабораторной диагностики
ФГБОУВО «Пермский государственный медицинский университет им. ак. Е.А. Вагнера»

ORCID: 0000-0002-5610-3346
614000, г. Пермь, ул. Петропавловская, 26;
pospelova_svetlana@mail.ru; (342)2364485

Lithuanian Street, 2, St. Petersburg, Russia,
194100; kate_alex.07@mail.ru

Horowitz Edward S., PhD in medicine, professor, head department of microbiology, virology with the course of clinical laboratory diagnostic

Perm Medical State University named by acad.

E.A. Vagner

ORCID: 0000-0003-4320-8672
26, Petropavlovskaya Str., Perm, Russia, 614000;
eduard.gorovitz@mail.ru; (342)2364485

Pospelova Svetlana V., PhD in medicine, assistant professor of microbiology, virology with the course of clinical laboratory diagnostic

Perm Medical State University named by acad. E.A. Vagner

ORCID: 0000-0002-5610-3346
26, Petropavlovskaya Str., Perm, Russia, 614000;
pospelova_svetlana@mail.ru; (342)2364485