УДК 616-002.3-022.376/.7-053.2 DOI: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35

# Способность к биопленкообразованию у возбудителей инфекций, выделенных от пациентов крупного многопрофильного детского стационара

Е.Д. Савилов<sup>1, 2</sup>, Ю.А. Маркова<sup>3</sup>, У.М. Немченко<sup>1</sup>, О.А. Носкова<sup>1, 4</sup>, Н.Н. Чемезова<sup>1, 2</sup>, Е.А. Кунгурцева<sup>1</sup>, А.В. Духанина<sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия;
- $^2$  Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования, Иркутск, Россия;
- <sup>3</sup> Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия;
- 4 Иркутская государственная областная детская клиническая больница, Иркутск, Россия

**Цель:** анализ образования биопленок у микроорганизмов, выделенных от пациентов детского стационара с тяжелыми гнойно-септическими заболеваниями. **Материал и методы.** Способность к биопленкообразованию изучали у микроорганизмов, выделенных от 32 пациентов 1–15 лет с сепсисом, острым гематогенным остеомиелитом, перитонитом и пневмонией, в отделении реанимации и интенсивной терапии детского многопрофильного стационара регионального уровня. Материалом для исследования служили кровь, мокрота, смывы с трахеобронхиального дерева, зева, раневое отделяемое, жидкость брюшной полости. **Результаты.** Способностью к биопленкообразованию обладали все исследованные штаммы, при этом большая их часть формировала умеренно выраженные биопленки. **Заключение.** Повсеместное распространение биопленочных инфекций можно отнести к важнейшим факторам сохранения и распространения микроорганизмов в медицинских учреждениях, которые существенно ограничивают профилактические и лечебные мероприятия.

**Ключевые слова:** микроорганизмы, биопленки, гнойно-септические инфекции, отделение реанимации и интенсивной терапии

Поступила в редакцию 13.09.2019 г. Принята к печати 25.12.2019 г.

**Для ципирования:** Савилов Е.Д., Маркова Ю.А., Немченко У.М., Носкова О.А., Чемезова Н.Н., Кунгурцева Е.А., Духанина А.В. Способность к биопленкообразованию у возбудителей инфекций, выделенных от пациентов крупного многопрофильного детского стационара. *Тихоокеанский медицинский журнал.* 2020;1:32–5. doi: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35

Для корреспонденции: Чемезова Наталья Николаевна – канд. мед. наук, доцент кафедры эпидемиологии и микробиологии ИГМАПО (664003, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 3), ORCID: 0000-0001-5375-7785; e-mail: chemezova\_nataly@mail.ru

## Ability to biofilm formation in infectious agents isolated from patients of a large general children's hospital

E.D. Savilov<sup>1, 2</sup>, Y.A. Markova<sup>3</sup>, U.M. Nemchenko<sup>1</sup>, O.A. Noskova<sup>1, 4</sup>, N.N. Chemezova<sup>1, 2</sup>, E.A. Kungurtseva<sup>1</sup>, A.V. Dukhanina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Scientific Centre of the Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia; <sup>2</sup> Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education, Irkutsk, Russia; <sup>3</sup> Siberian Institute of Physiology and Biochemistry of Plants, Irkutsk, Russia; <sup>4</sup> Irkutsk State Regional Children's Hospital, Irkutsk, Russia

**Objective:** The study objective is to analyze biofilm formation in microorganisms isolated from patients of children's hospital with severe purulent septic diseases. **Methods:** The ability to biofilm formation was studied in microorganisms isolated from 32 patients aged from 1 to 15 y.o. with sepsis, acute hematogenous osteomyelitis, peritonitis, and pneumonia in intensive care unit of regional general children's hospital. Blood, phlegm, bronchial and oropharyngeal washings, wound fluid, peritoneal fluid served as specimens. **Results:** All tested strains have the ability to biofilm formation; moreover, the majority of them formed moderate biofilms. **Conclusions:** The common spread of biofilm infections can be related to the most important factors of preservation and distribution of microorganisms in health facilities which significantly limit preventive and therapeutic measures.

Keywords: microorganisms, biofilms, purulent septic infections, intensive care unit

Received: 13 September 2019; Accepted: 25 December 2019

*For citation:* Savilov ED, Markova YA, Nemchenko U.M., Noskova OA, Chemezova NN, Kungurtseva EA, Dukhanina AV. Ability to biofilm formation in infectious agents isolated from patients of a large general children's hospital. *Pacific Medical Journal*. 2010;1:32–5. doi: 10.34215/1609-1175-2020-1-32-35

Corresponding author: Natalya N. Chemezova, MD, PhD, associate professor, Epidemiology and Microbiology Department, Irkutsk State Medical Academy of Continuing Education (3 Karl Marks St., Irkutsk, 664003, Russian Federation); ORCID: 0000-0001-5375-7785; e-mail: chemezova\_nataly@mail.ru

Среди задач здравоохранения важное место занимают прогнозирование и предотвращение инфекций, которые влияют на качество медицинской помощи населению и приводят к значительному экономическому ущербу [1, 2]. Несмотря на то, что изучением характеристик штаммов, циркулирующих во внутрибольничной среде, активно занимаются во всем мире, в том числе и в Российской Федерации, работ по оценке способности этих микроорганизмов образовывать биопленки явно недостаточно. Между тем данная характеристика имеет особое значение, так как в составе биопленок микробные клетки выживают при стандартной обработке дезинфектантами, что способствует их сохранению во внутрибольничной среде.

Цель настоящего исследования состояла в анализе образования биопленок у микроорганизмов, выделенных от пациентов детского стационара с тяжелыми гнойно-септическими заболеваниями.

#### Материал и методы

Обследовано 32 пациента в возрасте от 1 года до 15 лет с тяжелыми инфекционными заболеваниями (сепсис, острый гематогенный остеомиелит, перитонит, пневмония), находившихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии детского многопрофильного стационара регионального уровня (г. Иркутск) с января 2018 г. по апрель 2019 г. Материалом для исследования служили кровь, мокрота, смывы из трахеобронхиального дерева и зева, раневое отделяемое, жидкость из брюшной полости. Идентификацию 36 выделенных штаммов осуществляли бактериологическим методом с учетом морфологических, культуральных и биохимических свойств.

Биопленкообразование изучали путем определения способности микроорганизмов к адгезии на поверхности 96-луночного стерильного плоскодонного пластикового иммунологического планшета (производство фирмы Greiner Bio-One). Использовали суточную культуру бактерий в планктонной фазе, суспендированную в мясо-пептонном бульоне. Стартовая концентрация культур доводилась до одной единицы оптической плотности (ОП). Тестируемые штаммы инокулировали по 150 мкл в лунку. Контролем фона служил стерильный бульон. Планшеты культивировали во влажной камере в термостате в течение 48 часов. По окончании инкубации измеряли ОП бактериальной суспензии, затем планктонные клетки удаляли из лунок пипетированием, планшет трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой. После этого проводили окраску биопленок: в лунки добавляли 150 мкл дистиллированной воды и 20 мкл 1 % генцианвиолета и инкубировали в течение 45 мин. при комнатной температуре. Несвязавшийся краситель удаляли путем трехкратной отмывки дистиллированной водой. После этого в лунку добавляли 200 мкл 95% этанола для экстракции связавшегося с биомассой красителя

и измеряли ОП раствора при длине волны 492 нм (интенсивность окрашивания соответствовала степени пленкообразования). Все действия для контрольных лунок были аналогичны таковым для опытных образцов. Количественным выражением активности образования биопленок служили значения ОП, измеряемые на спектрофотометре Multiscan Plus [3].

Для определения контрольного значения оптической плотности (ОПк) и установления исходного уровня, превышение которого можно интерпретировать как способность формировать биопленку, взяли следующую формулу [4, 5]:

$$O\Pi \kappa = X_{cp}O\Pi \kappa + 3 \cdot S\Pi \kappa$$

где  $X_{cp}$ ОПк – среднее арифметическое значение оптической плотности, измеренной для контрольных лунок, SПк – среднеквадратичное (стандартное) отклонение контрольных значений.

Интерпретация оценки степени биопленкообразования: ОП≤ОПк – отсутствует; ОПк<ОП≤2ОПк – низкая; 2ОПк<ОП≤4ОПк – умеренная; ОП>4ОПк – значительная.

Интенсивность прироста (ИП) бактериальной суспензии определяли по формуле:

ИП=
$$O\Pi_{48}$$
: $O\Pi_{0}$ ,

где О $\Pi_{48}$  – оптическая плотность суспензии бактерий через 48 часов культивирования, О $\Pi_0$  – исходная оптическая плотность.

Если показатель был равен 1, прирост отсутствовал, от 1 до 2 – был слабым, больше 2 – значительным.

#### Результаты исследований

Большая часть выделенных микроорганизмов относилась к клебсиеллам и ацинетобактерам (табл. 1). Большинство штаммов обладало значительной скоростью роста, то есть за 48 часов культивирования ОП увеличивалась более чем в два раза по сравнению с начальной. Способностью к биопленкообразованию обладали все исследуемые микроорганизмы, при этом

**Таблица** Виды микроорганизмов, выделенных из биоматериала

Вид	Кол-во штаммов, абс.
Klebsiella pneumoniae	12
Acinetobacter baumannii	9
Stenotrophomonas maltophilia	5
Pseudomonas aeruginosa	3
Enterobacter cloacae	2
Acinetobacter lwoffii	1
Escherichia coli	1
Serratia marcescens	1
Staphylococcus epidermidis	1
Staphylococcus haemolyticus	1

Таблица 2 Характеристика исследуемых штаммов бактерий по скорости роста и степени биопленкообразования

Показатель	Градация	Кол-во штаммов, %
	Отсутствует	5
Интенсивность	Слабая	17
прироста	Значительная	78
	Отсутствует	0
Биопленко-	Слабое	17
образование	Умеренное	64
	Значительное	19

большая их часть формировала умеренно выраженные пленки (табл. 2).

Наглядным примером выраженного разнообразия по исследуемым показателям стала К. pneumoniae, преобладавшая в данной выборке. Большая часть штаммов этого вида (75%) продемонстрировала значительную скорость роста, однако, встречались штаммы, как со слабым ростом, так и с его отсутствием. Аналогичный разброс данных отмечался и в отношении биопленкообразования. Данный вид образовывал преимущественно умеренные биопленки, но некоторые его штаммы характеризовались слабым биопленкообразованием. Подобным же разнообразием обладал еще один важный представитель госпитальных инфекций – А. baumannii, большинство штаммов которого (78%) имело значительную скорость роста и преимущественно повышенную и умеренную степени биопленкообразования (табл. 3).

Предварительный анализ взаимосвязи между локусом выделения микроорганизма и его способностью к биопленкообразованию, проведенный на небольшой выборке (36 штаммов), позволил отметить, что 75% культур, выделенных из крови, характеризовались преимущественно низкой и умеренной способностью к формированию биопленок, тогда как культуры, выделенные из верхних дыхательных путей, чаще (92%) демонстрировали среднюю способность к биопленкообразованию.

#### Обсуждение полученных данных

Биопленка – особая форма существования бактерий, соединенных между собой и фиксированных на различных поверхностях (имплантатах, искусственных сердечных клапанах, катетерах, шунтах и т.д.), характеризующаяся физиологической и функциональной стабильностью [6, 7]. Бактерии, циркулирующие во внутрибольничной среде, такие как *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* и другие, отличаются повышенной способностью к формированию биопленок, которая стимулируется неадекватной антибиотикотерапией и использованием дезинфектантов [8–10]. Повышенная антибиотикорезистентность госпитальных штаммов, способных формировать пленчатые

Таблица 3 Скорость роста и степень биопленкообразования штаммов возбудителей госпитальных инфекций

Показатель		Вид микроорганизма	Кол-во штаммов, абс.	
енсивность прироста	Отсутствует	E. coli	1	
		K. pneumoniae	1	
	Слабая	K. pneumoniae	2	
		A. baumannii	2	
		E. cloacae	2	
	Значительная	K. pneumoniae	9	
		A. baumannii	7	
		S. maltophilia	5	
		P. aeruginosa	3	
		S. marcescens	1	
		S. epidermidis	1	
		S. haemolyticus	1	
		A. lwoffii	1	
Слабая Ораз ораз ораз ораз ораз ораз ораз ораз о	Слабая	K. pneumoniae	3	
		A. baumannii	1	
		S. epidermidis	1	
		S. haemolyticus	1	
		K. pneumoniae	8	
		A. baumannii	4	
		S. maltophilia	4	
нкос	¥	P. aeruginosa	2	
Степень биопленкообразования	Умеренная	E. cloacae	2	
		E. coli	1	
		S. marcescens	1	
		A. lwoffii	1	
	Значительная	A. baumannii	4	
		K. pneumoniae	1	
		S. maltophilia	1	
		P. aeruginosa	1	

структуры, значительно затрудняет лечение и может приводить к серьезным последствиям для пациентов [11–13]. Из представленного материала становится очевидным, что территориями наиболее высокого риска возникновения инфекционных осложнений в стационарах становятся отделения реанимации и интенсивной терапии, где из-за наличия наиболее тяжелых, иммунокомпрометированных пациентов подобные процессы адаптации микробных сообществ проявляются наиболее активно.

Оценка биопленкообразования среди микроорганизмов, выделенных из разных локусов пациентов, находившихся на лечении в отделении реанимации и интенсивной терапии детского многопрофильного стационара, свидетельствует, что этой способностью обладали все госпитальные штаммы. Так, клебсиеллы демонстрировали значительную скорость роста

и умеренное биопленкообразование, а представители вида *А. baumannii* при значительной скорости роста – умеренное и выраженное биопленкообразование. Близкими количественными показателями характеризовались и другие госпитальные штаммы. Таким образом, микроорганизмам, имеющим более выраженную природную резистентность, свойственны и более высокие показатели скорости роста и биопленкообразования.

#### Заключение

Повсеместное распространение биопленочных инфекций можно отнести к важнейшим факторам сохранения и распространения микроорганизмов в медицинских учреждениях, которые существенно ограничивают профилактические и лечебные мероприятия. Результаты исследования показали, что большинство госпитальных штаммов обладает способностью продуцировать биопленки. Это может способствовать их повышенной устойчивости и сопровождаться увеличением заболеваемости внутрибольничными инфекциями.

**Конфликт интересов:** авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Источник финансирования:** авторы заявляют о финансировании проведенного исследования из собственных средств.

#### Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования – ЕДС, ЮАМ Сбор и обработка материала – АВД, ЕАК, УМН,ОАН Статистическая обработка – ЕДС, ЮАМ, ОАН,УМН Написание текста – ЕДС, ЮАМ, ННЧ, УМН, ОАН Редактирование — ЕДС, ННЧ

### Литература / References

- 1. Ковалишена О.В., Благонравова А.С., Воробьева О.Н., Ермольева С.А., Послова Л.Ю., Шпрыкова О.Н. Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за госпитальными инфекциями. *Ремедиум Приволжье*. 2008;1:49–51 [Kovalishena OV, Blagonravova AS, Vorobyeva ON, Ermolyeva SA, Poslova LYu, Shprykova ON. Topical issues of epidemiological surveillance behind hospital infections. *Remedium Privolzhye*. 2008;1:49–51 (In Russ).]
- 2. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, 2011. [The national

- concept of prevention of the infections connected with delivery of health care, 2011. (In Russ).] URL: http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70000121/ (Accessed Apr 24, 2019).
- 3. Анганова Е.В., Савилов Е.Д., Ушкарева О.А., Аблов А.М., Духанина А.В. Способность патогенных и условно-патогенных энтеробактерий к формированию биопленок. *Acta Biomedica Scientifica*. 2014;5:34–7. [Anganova EV, Savilov ED, Ushkareva OA, Ablov AM, Duhanina AV. Ability of pathogenic and opportunistic enterobakteriya to formation of biofilms. *Acta Biomedica Scientifica*. 2014;5:34–7 (In Russ).]
- 4. Ярец Ю.И, Шевченко Н.И. Новый метод анализа бактериальной биопленки. *Наука и инновации*. 2016;10:64–68. [Yarets Yu, Shauchenka N. A new method for the bacterial biofilms analysis in medicine. *Science and Innovations*. 2016;10: 64–68 (In Russ).]
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 1985;22(6):996–1006.
- 6. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биопленки и инфекции. *Журнал инфектологии*. 2010;3(2):4–15. [Gostev VV, Sidorenko SV. Bacterial biofilms and infections. *Magazine of an Infectology*. 2010;3(2):4–15 (In Russ).]
- 7. Kirov SM, Webb JS, O'May CY, Reid DW, Woo JK, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilm differentiation and dispersal in mucoid Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiology.* 2007; 153:3264–74.
- 8. Eze EC, Chenia HY, El Zowalaty ME. Acinetobacter baumannii biofilms: Effects of physicochemical factors, virulence, anti-biotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infection and Drug Resistance*. 2018; 11:2277–99.
- 9. Gupta TT, Karki SB, Matson JS, Gehling DJ, Ayan H. Sterilization of biofilm on a titanium surface using a combination of nonthermal plasma and chlorhexidine digluconate. *BioMed Research International*. 2017; doi: 10.1155/2017/6085741
- 10. Yu W, Hallinen KM, Wood KB. Interplay between antibiotic efficacy and drug-induced lysis underlies enhanced biofilm formation at subinhibitory drug concentrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2018;62(1):16–7.
- 11. Johani K, Abualsaud D, Costa DM, Hu H, Whiteeley G, Deva A, Vickery K. Characterization of microbial community composition, antimicrobial resistance and biofilm on intensive care surfaces. *J Infect Public Health.* 2018;11(3):418–24.
- 12. Kamaruzzaman N, Tan LP, Mat Yazid KA, Saeed SI, Hamdan RH, Choong SS, et al.. Targeting the bacterial protective armour; Challenges and novel strategies in the treatment of microbial biofilm. *Materials (Basel)*. 2018;11(9); doi: 10.3390ma11091705
- 13. Mohamed SH, Salem D, Azmy M, Fam NS. Antibacterial and antibiofilm activity of cinnamaldehyde against carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in Egypt: In vitro study. *J App Pharm Sci.* 2018;8(11):151–6.