Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
"Нижегородская государственная медицинская академия"
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

иэ^и'1

На правах рукописи



**Чеботарь Игорь Викторович**

**Биопленки Staphylococcus aureusi
структурно-функциональные характеристики и
взаимоотношения с нейтрофилами**

1. - микробиология

**Диссертация**

на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант: д.м.н., профессор Маянский А.Н.

Нижний Новгород, 2013

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

стр.

**ВВЕДЕНИЕ 5**

**ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ**

**Глава 1. Обзор литературы 22**

1. [Определение понятия биопленки 22](#bookmark5)
2. [Этапы эволюции стафилококковых биопленок 23](#bookmark6)
3. [Структура биопленок Staphylococcus aureus 25](#bookmark7)
4. Влияние факторов внешней среды на

*биопленки Staphylococcus aureus 28*

1. Генетический контроль биопленочного процесса

у золотистого стафилококка 30

1. [Биопленки Staphylococcus aureus и иммунная система 34](#bookmark12)
2. [Антибиотикорезистентность биопленочных стафилококков . 40](#bookmark13)
3. Методы исследования стафилококковых биопленок

и диагностика биопленочного процесса 47

1. Стратегия управления стафилококковым

[биопленочным процессом 55](#bookmark15)

[**Глава 2. Материалы и методы 62**](#bookmark18)

1. [Объем исследований 62](#bookmark19)
2. [Материал для исследований 62](#bookmark20)
3. Моделирование биопленок 64
4. [Люминол-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов .... 65](#bookmark21)
5. [Идентификация видовой принадлежности стафилококков . . 68](#bookmark22)
6. [Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия 69](#bookmark23)
7. [Сканирующая электронная микроскопия 70](#bookmark24)

з

1. [Трансмиссивная электронная микроскопия 70](#bookmark25)
2. Лазерное угловое динамическое светорассеяние в оценке

размера наночастиц 71

1. [Оценка интенсивности биопленкообразования 71](#bookmark28)
2. Идентификация биохимической природы внеклеточного

[биопленочного матрикса 73](#bookmark30)

1. Идентификация биохимической природы везикулярных

структур 74

1. [Определение количества колониеобразующих единиц 75](#bookmark32)
2. [Количественное определение белка по методу Брэдфорд .... 75](#bookmark33)
3. [Водоподготовка 76](#bookmark34)
4. [Статистическая обработка результатов 76](#bookmark35)
5. Программное обеспечение, использованное в

настоящем исследовании 77

[**Глава 3. Собственные исследования 78**](#bookmark38)

1. Методический алгоритм для идентификации и количественной

оценки стафилококковых биопленок 78

1. Структурные изменения биопленок Staphylococcus aureus

в условиях контакта с нейтрофилами человека 97

1. Нейтрофил-стимулирующие свойства биопленок

*Staphylococcus aureus 116*

1. Экспрессия AgrA в условиях нейтрофил-опосредованного

разрушения биопленок Staphylococcus aureus 126

1. Исследование везикулярных наноструктур в системе

«нейтрофил - биопленка Staphylococcus aureus» 135

1. Новый метод исследования биопленочной

антибиотикорезистентности 152

3.7. Формирование биопленок Staphylococcus aureus на

поверхностях синтетических эндопротезов 165

[ЗАКЛЮЧЕНИЕ 172](#bookmark50)

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 198

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 199

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стафилококки, являясь актуальными возбудителями оппортунистических инфекций, способны к формированию биопленок. Прежде всего, это касается S. aureus. Формирование биопленок с участием S. aureus и S. epidermidis может играть решающую роль в патогенезе остеомиелита, синуситов и риносинуситов, эндокардитов, отитов, муковисцидоза, септических артритов, хронической раневой инфекции, имплант-ассоциированных инфекций. Течение стафилококковых биопленочных инфекций отличается склонностью к рецидивированию, а биопленочные стафилококки проявляют слабую чувствительность к традиционной антибиотикотерапии [69, 302]. Эти причины лежат в основе необходимости изучения структурных и физиологических характеристик биопленок, сформированных S. aureus.

Современные рекомендации по лечению бактериальных инфекций требуют учитывать факт наличия биопленочной инфекции и корректировать проводимую терапию в зависимости от ее присутствия [72, 325, 338]. Это означает, что оптимальная микробиологическая диагностика должна включать в себя не только видовую идентификацию микроба-возбудителя, но и определять наличие биопленкообразования в каждом конкретном клиническом случае. Такая необходимость связана с тем, что не все штаммы условно­патогенных бактерий, являются биопленкообразующими. Например, среди клинических изолятов золотистого стафилококка биопленкообразующими являются от 21 % до 45 % штаммов [205, 309].

Поэтому логично, что первый этап настоящего исследования вместил в себя комплекс работ in vitro, нацеленных на доказательство факта биопленкообразования у исследуемого изолята стафилококка и количественную оценку интенсивности биопленкообразования.

Объектом исследования был придонный слой бульонной культуры клинического изолята коагулазопозитивного стафилококка. Видовая идентификация стафилококка производилась по рутинной методике с

использованием тест-систем STAPHYtest-24 (ErbaLaChema) и API-Staph (BioMerieux), а также с использованием способа масс-спектрометрии на основе технологии MALDI-TOF MS методом прямого профилирования [30].

Для того чтобы доказать факт формирования биопленки использовали способы, направленные на обнаружение двух обязательных биопленочных атрибутов - бактериальных клеток и внеклеточного биопленочного матрикса [51, 57]. В качестве таких способов были успешно использованы лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (с предварительной витальной окраской биопленочных стафилококков) и сканирующая электронная микроскопия.

Для оценки интенсивности биопленкообразования использовали два способа. Первый основан на традиционной окраске биопленок анилиновыми красителями и количественно отражал объем исследуемой биопленки. Второй способ оценки интенсивности биопленкообразования был разработан в ходе выполнения настоящей работы и основан на микроскопическом исследовании биопленок с последующим компьютерным документированием и статистическим анализом количественных показателей стафилококков в изучаемой биопленке.

Результаты видовой идентификации биопленочных бактерий при помощи тестов API Staph, STAPHYtest-24 и технологии MALDI-TOF MS подтвердили их достоверную принадлежность к виду S. aureus (штамм был зарегистрирован под номером 5983/2).

Визуализация биопленки с помощью конфокальной микроскопии выявила трехмерную организацию бактериальных клеток (толщина - от 20 до 47 мкм), характерную для стафилококковых биопленок. Микроскопическое наблюдение за живой биопленкой в режиме реального времени позволило обнаружить косвенные признаки биопленочного матрикса. Хаотические колебания стафилококков не подчинялись законам классического броуновского движения и совершались внутри ограниченного объема. Это является подтверждением существования необходимого атрибута любой



биопленки - внеклеточного матрикса, связывающего биопленочные микробы в единую систему.

Исследование при помощи СЭМ позволило непосредственно визуализировать биопленочный матрикс. Между стафилококками в составе биопленки наблюдалось два типа контактов. Первый из них представлял собой непосредственное взаимодействие, с помощью которого были сформированы стафилококковые кластеры, состоящие 9 - 55 клеток. Второй тип был организован за счет матрикс-опосредованных связей между стафилококками. Они обнаруживались при увеличении в 3000-15000 раз и выше. Между отдельными стафилококками существовали необычные «перемычки» - структуры биопленочного матрикса, связывающие бактерии друг с другом.

Таким образом, были обнаружены два атрибута, обязательные для биопленок - бактерии (5. aureus) и внеклеточный матрикс. Это доказывает, что объект изучения являлся биопленкой.

Оказалось, что применение методов количественной оценки интенсивности биопленкообразования имеет определенные ограничения в зависимости от «возраста» стафилококковой биопленки. Оценка по степени окраски анилиновыми красителями (кристаллическим фиолетовым) не позволила дифференцировать разницу между ранними биопленками со сроками культивирования 8 и 12 часов: показатели 8- и 12-часовых биопленок не имели статистически значимых отличий от контроля и между собой. На более поздних сроках (24 и 48 часов) метод окраски был более эффективен. Показатели окраски 24-часой биопленки и 48-часовой биопленки достоверно отличались как от контрольных результатов, так и показателей 8-часовых и 12­часовых биопленок. При этом показатели 48-часовой биопленки имели значимые отличия от показателей 24-часовой биопленки. Следует отметить, что способ на основе оценки интегральной окраски биопленок стал традиционным [67, 101]. Однако, полученные в настоящем исследовании данные доказывают, что он неэффективен для оценки ранних этапов биопленкообразования, когда на поверхности фиксировано малое количество биопленочной массы (клеток и матрикса). Метод информативен лишь для оценки биопленок, накопивших достаточную массу.

Применение разработанного в ходе настоящего исследования нового способа и компьютерной программы «Подсчет микробов в кластерах» позволяет более детально охарактеризовать биопленкообразование на ранних (8 и 12 часов) этапах. Статистически значимые отличия в количествах закрепившихся на единице поверхности (в поле зрения) стафилококков обнаружены между контролем и 8-часовыми биопленками, между контролем и 12-часовыми биопленками, между 8-часовыми и 12-часовыми биопленками, между контролем и биопленками на более поздних сроках (24 и 48 часов) культивирования, между ранними биопленками (8 и 12 часов) и биопленками на более поздних сроках (24 и 48 часов) культивирования. Между образцами со сроками культивирования 24 часа и 48 часов не наблюдалось статистически значимых различий. Таким образом, проведенные исследования подтвердили, что вновь разработанный способ позволяет подсчитывать абсолютное количество микробных клеток на цифровом изображении микроскопического препарата, оценивать количество кластеров с определением количества микробных клеток, из которых они состоят, учитывать распределение микроб/кластер. Однако, способ оказался неэффективным для оценки зрелых биопленок. Дело в том, что зрелая биопленка (24 и 48 часов) из-за своей значительной толщины не прозрачна для световых лучей при трансмиссивной микроскопии, поэтому отдельные клетки и кластеры не могут быть обнаружены и подсчитаны.

Существует две основных причины актуальности метода оценки ранних биопленок. Во-первых, выявление биопленочного процесса в первые часы контаминации поверхности инвазированных в организм медицинских устройств может быть важным в борьбе с инфекционным процессом. Это связано с тем, что первые часы развития биопленок являются критическими в патогенезе биопленочного процесса, потому что на этом этапе биопленка не имеет развитого матрикса и является более чувствительной к антимикробным препаратам, чем в более зрелом состоянии. Это означает, что своевременно начатые антибиопленочные мероприятия являются более эффективными. Во- вторых, количественная оценка ранней биопленки является важной для теоретических исследований при стандартизации исходных условий и при оценке результатов эксперимента, когда необходимо проанализировать изменения в биопленке в ответ на какое-либо воздействие. Следует отметить, что способы оценки адгезии микробов предлагались и ранее. В частности, более 25 лет назад был разработан способ, из-за своей сложности так и не реализованный в повседневной клинической практике. Этот метод включал оценку адгезии бактерий на поверхности катетров по их метке радиоактивными изотопами водорода (Н) с последующим измерением радиоактивности катетера [239]. Ранняя биопленка изучалась также при помощи сканирующей электронной микроскопии и микроскопии в темном поле [94, 174, 276]. Однако перечисленные методы не позволяют произвести учет адгезированных микробов поклеточно.

Таким образом, использованные методики составили оптимальный алгоритм, который позволяет ответить на главные вопросы, которые должны возникать при исследовании биопленочного процесса. Был идентифицирован вид стафилококка, формирующего биопленку (S. aureus). Была обнаружена трехмерная организация бактериальных клеток, характерная для биопленки. Было доказано наличие внеклеточного матрикса, объединяющего

стафилококки в единую структуру. Для количественной оценки зрелых стафилококковых биопленок оптимальным оказался метод оценки

интегральной окраски биопленки, для ранних биопленок оптимальным был метод, основанный на подсчете адгезированных на поверхности стафилококков (и/или стафилококковых кластеров.).