

УДК 532.61.042:616-022.7

Динаміка біоплівкового оброщення катетерів *Enterococcus faecalis*

Е.О. Синетар, О.І. Брич

ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України", Київ, Україна

Охарактеризовано динаміку біоплівкового росту *Enterococcus faecalis* на фрагментах силіконового катетера. Дослідження проводили із застосуванням бактеріологічних та електронномікроскопічних методів. Наведено результати дослідження динаміки біоплівкового росту *E. faecalis* на поверхні силіконового катетера протягом трьох діб. Запропонована нами вертикальна орієнтація фрагментів катетера у суспензії бульйонної культури ентерококів, дає змогу уникнути домішок седиментованих бактерій і зумовлює справжню адгезію з подальшим утворенням мікроколоній протягом 24 годин інкубації. Формування агломератів спостерігали на 48-му годину інкубації. На третю добу інкубації виявлено сформовану виражену біоплівку *E. faecalis* на поверхні силіконового катетера. Отримані дані свідчать, що біоплівка – спосіб щільного оброщення бактеріями поверхні досліджуваного катетера. Біоплівковий ріст бактерій *E. faecalis* відбувається з розширенням площі оброщення катетерів з 51,5 мкм² до 1 922,8 мкм² протягом 24–72 годин інкубації.

Ключові слова: катетер-асоційовані інфекції; силіконовий катетер; бактерії; адгезія

The dynamics of biofilm overgrowth of *Enterococcus faecalis*

E.A. Synetar, O.I. Brych

State Institution "L.V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

The nature of microorganisms can exist in two physiological forms that allow microbes to preserve livelihoods and continue their life cycle. The first is the population of planktonic forms of microorganisms which live freely in the environment with the developed systems of active and passive mobility, contributing to the rapid spread of a liquid medium. The second forms are those expressing specific mechanisms of adhesion, and able to aggregate on biogenic and abiogenic surfaces. Even in the deep sea vast number of species of bacteria live in their inherent horizons. Thus, the study of biofilms tube life support systems, diagnostic, laparoscopic devices during prolonged catheterization of the urinary system is of great practical, theoretical and biological significance in medicine and biology. For almost 20% of catheter-associated infections antibiotic therapy is ineffective, particularly through the formation of microbial biofilms on the surface of urinary catheters. We characterized the dynamics of biofilm growth of *Enterococcus faecalis* on fragments of silicone catheter. The study was conducted using bacteriological and electron microscopic techniques. Study of the dynamics of biofilm formation was performed using *E. faecalis* strain 49, which is isolated from the urine of persons who are not the patients of the urological department of resuscitation and intensive therapy. Using scanning electron microscopy we have established dynamics and phase attachment of *E. faecalis* bacteria and subsequent overgrowth of silicone catheter surface. After calculations, index of adhesion on the turbulent wall amounted to 0,49 microbial cells. That is, every other cell of the monolayer adhered on the catheter. Area of biofilm growth of *E. faecalis* after 24 hour incubation was equal to 51.5 μm², in 48 hours it increased to 231.5 μm². After 72 hours of incubation we recorded the increase in biofilm growth of *E. faecalis* to 1922,8 μm². The results were obtained on fragments of catheters, immersed in broth in vertical position. This orientation has excluded the deposition of germs by sedimentation, i.e. by gravity. It is known that after the logarithmic phase and achieving M-concentration for a few hours microbes start to die and their possible deposition may occur. Therefore, our results confirm the formation of biofilm, instead of sedimentation of dead microbes. Our study shows that biofilm is "the way of overgrowth on artificial and natural surfaces by microorganisms that are kept on them by exopolymer membranes".

Keywords: catheter-associated infections; silicone catheter; bacteria; adhesion

ДУ "Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України", вул. М. Амосова, 5, Київ, 03680, Україна

State Institution "L.V. Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of NAMS of Ukraine", N. Amosov Str., 5, Kyiv, 03680, Ukraine

Tel.: +38-096-197-37-47. E-mail: editsinetar@rambler.ru

Вступ

Різні види мікроорганізмів колонізують абіогенні та біогенні поверхні. Навіть у морських глибинах бактерії живуть у притаманних їм горизонтах. Кількість бактерій обчислюють на одиницю площі. У мікробіології це вперше врахував д. мед. н. Валентин Жалко-Титаренко, обчислюючи адгезію мікробів до слизової оболонки людського кишківника (Zhalko-Tytarenko, 1981).

У цій статті уведено поняття про поверхневу концентрацію – кількість мікробів на 1 см^2 і висоту пристінного шару збудників. Ріст мікробів на поверхнях, або оброщення мікробами поверхонь відоме під назвою біоплівки. Вивчення біоплівок має певне практичне, теоретичне, біологічне значення, оскільки стосується проблем оброщення занурених поверхонь суден, різних систем трубопроводів, каналізації (Dobrohotskyu et al., 2009), у медицині – оброщення мікробами трубчастих систем життєзабезпечення, діагностичних і лапароскопічних апаратів і, особливо, у разі тривалих катетеризацій сечовивідної системи (Donlan, 2011; Jacobsen et al., 2008).

Перераховані проблеми мають три напрями. Один – суто медичний, що стосується тактики лікування при застосування катетерів. Другий напрям – біотехнологічний, оскільки дозволяє значно збільшити вихід корисних продуктів мікробного синтезу (Galkin, 2013). Їх ми не торкатимемося. Третій напрям – суто біологічний, або мікробіологічний, тому що біоплівковий ріст, або оброщення катетерів в організмі людини, має біологічні закономірності поверхневого росту та починається з такого поверхневого процесу як адгезія (Coenye and Nelis, 2010; Jacobsen et al., 2011), далі переростає в утворення масиву мікробного оброщення, який, на наш погляд, є формуванням типової біоплівки. Останніми роками спостерігається збільшення частки бактерій *Enterococcus sp.* – представників нормальної резидентної мікрофлори людини, грибів роду *Candida*, які в разі зниження імунних сил організму потенційно здатні ставати збудниками катетер-асоційованих інфекцій сечовивідних шляхів (Pascual, 2002; Semyak et al., 2005; Janovs'ka, 2009). Протягом багатьох років ентерококи не розглядалися як клінічно вагомі збудники, але все частіше їх стали виділяти із клінічного матеріалу при різних патологічних станах (Lysen'ki et al., 2005; Makushenko, 2002).

Більшість ентерококів, які викликають майже 5% усіх бактеріальних інфекцій сечовивідних шляхів (ІСВШ), не мають особливо виражених пристосувальних ознак для існування у середовищі сечовивідної системи. У разі внутрішньолікарняного зараження пацієнтів, особливо за наявності постійного уретрального катетера (Seno et al., 2005; Mohamed et al., 2007), частка ентерококів у розвитку ІСВШ сягає 15–20% (Polishhuk, 2009). Ці мікроорганізми характеризуються низьким рівнем патогенності та проявляють свою активність тільки за певних умов: зниженні природної резистентності макроорганізму, особливо при травмах кишечника або сечостатевого тракту у результаті інструментальних досліджень (Baldassari et al., 2005), вони можуть проникати у стерильні за нормальних умов порожнини, органи та тканини з наступним запаленням. Саме здатність до початкової адгезії, а потім і до утворення біоплівок дозволяє ентерококам добре утримуватись

на слизових оболонках органів людини, викликаючи у цих місцях запалення, наприклад цистити, уретрити, пієлонефрити тощо (Donlon, 2002; Mironenko, 2009). Тому біоплівкоутворення бактерій *E. faecalis* досліджували на моделі, найбільш наближеній до реальності – безпосередньо на урологічних катетерах.

Мета статті – описати динаміку біоплівкового росту *Enterococcus faecalis* на силіконових катетерах.

Матеріал і методи досліджень

Для виконання поставленої мети проведено забір біологічного матеріалу від пацієнтів, які не були урологічно хворими, але через катетеризацію могли ними стати в перспективі. Тому вивчення динаміки утворення біоплівки проводили з використанням штаму *E. faecalis* 49, який виділено із сечі хворого з не урологічного відділення реанімації та інтенсивної терапії. Ідентифікацію штаму за біохімічними властивостями здійснювали з використанням мікробіологічного аналізатора VITEK 2 System TM – compact 15 (виробництва BioMerieux, Франція), використовуючи для грампозитивних бактерій карт GP-21342. Для дослідження біоплівкового росту *E. faecalis* фрагменти силіконових катетерів у вертикальному положенні занурювали у завись *E. faecalis*, приготовану в триптиказосоевому бульйоні. Густиною зависі $1,5 \cdot 10^8$ кл./мл встановлювали за допомогою денситометра Densimat (BioMerieux, Франція) і набору стандартів оптичної густини бактеріальних зависей McFarland. Після інкубації зазначених вище фрагментів у термостаті за $+37^\circ\text{C}$ через 24, 48 та 72 години клітини мікроорганізмів, адгезовані на поверхні досліджуваних катетерів, фіксували за методикою Galkin (2013) у нашій модифікації (Sinetar et al., 2014): фарбували розчином генціан-віолету, тричі промивали дистильованою водою та фіксували протягом 30 хвилин 96% етиловим спиртом. Усі маніпуляції виконували за кімнатної температури.

Дослідження біоплівкового росту *E. faecalis* на поверхні досліджуваного катетера проводили за допомогою сканувального електронного мікроскопа Tescan Mira 3 LMU, виробництва Чехії. Традиційно, досліджуючи такі зразки методами сканувальної електронної мікроскопії (СЕМ), для запобігання локального накопичення заряду в області, що досліджується, поверхню зразка покривають тонким шаром (15–20 нм) струмопровідного матеріалу (Au, Pt, C). Проте в даному експерименті застосовано режими з низькою прискорювальною напругою. Відмова від додаткових етапів пробопідготовки (напилення струмопровідної плівки) дозволила запобігти появі суттєвих спотворень поверхні, яку досліджено. Концентрацію бактеріальних клітин на поверхні фрагменту катетера обчислювали за формулою $p = 3\kappa^{1,5}$, де κ – об'єм концентрації (Zhalko-Tytarenko, 1981).

Результати та їх обговорення

Виділений штаму *E. faecalis* 49 – типовий за біохімічними властивостями, характеризувався середнім ступенем адгезивності за значенням показника індексу адгезивності мікроорганізмів ($3,5 \pm 4,0$). За результатами

дослідження чутливості до антибіотиків із використанням автоматичного аналізатора VITEK 2-compat 15 та карт AST-YSO1 (виробництва BioMerieux, Франція) встановлено, що штам стійкий до ампіциліну, левофлоксацину та гатіфлоксацину. За допомогою сканувальної електронної мікроскопії встановили динаміку та фази прикріплення *E. faecalis* і подальшого оброщення бактеріями поверхні силіконового катетера. Ступінь адгезії *E. faecalis* на поверхні катетера через 24 години інкубації становив 295 мкм². При обчисленні за вищенаведеною формулою показник адгезії у пристінному моношарі складав 0,49 мікробних клітин. Тобто, кожна друга клітина з моношару адгезувалась на катетері. Як видно з таблиці 1, площа біоплівкового росту *E. faecalis* на 24-ту годину інкубації складала 51,5 мкм².

На рисунку 1 видно окремі адгезовані клітини *E. faecalis* та їх наступний ланцюжковий ріст, а також утворення мікроколоній. Адгезованими ми вважали поодинокі розташовані клітини *E. faecalis*, відокремлені одна

від одної. Мікроколонії – невеличкі угруповання мікробів, розсіяні на поверхні катетера в точках адгезії, які їм передували (рис. 1).

Таблиця 1

Динаміка зростання площі біоплівкового росту *E. faecalis* на поверхні силіконового катетера

Години інкубації силіконового катетера	Рисунок	Площа біоплівкового росту <i>E. faecalis</i> , мкм ²
24	1	51,5
48	2	231,5
72	3	1922,8

Через 48 годин площа біоплівкового росту *E. faecalis* збільшилась до 231,5 мкм². Інкубація фрагментів силіконового катетера на 48-му годину викликала до об'єднання мікроколоній клітин *E. faecalis* у скупчення, «агломерати» (рис. 2).

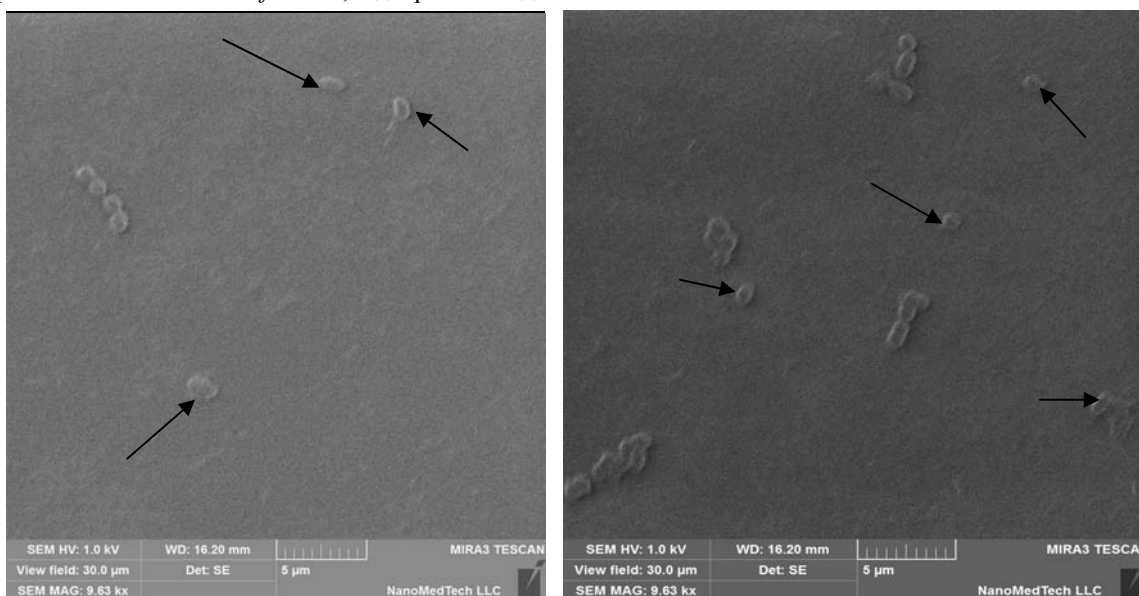


Рис. 1. Адгезія клітин *E. faecalis* усередині силіконового катетера *in vitro* через 24 години: стрілками відмічено адгезію клітин *E. faecalis*

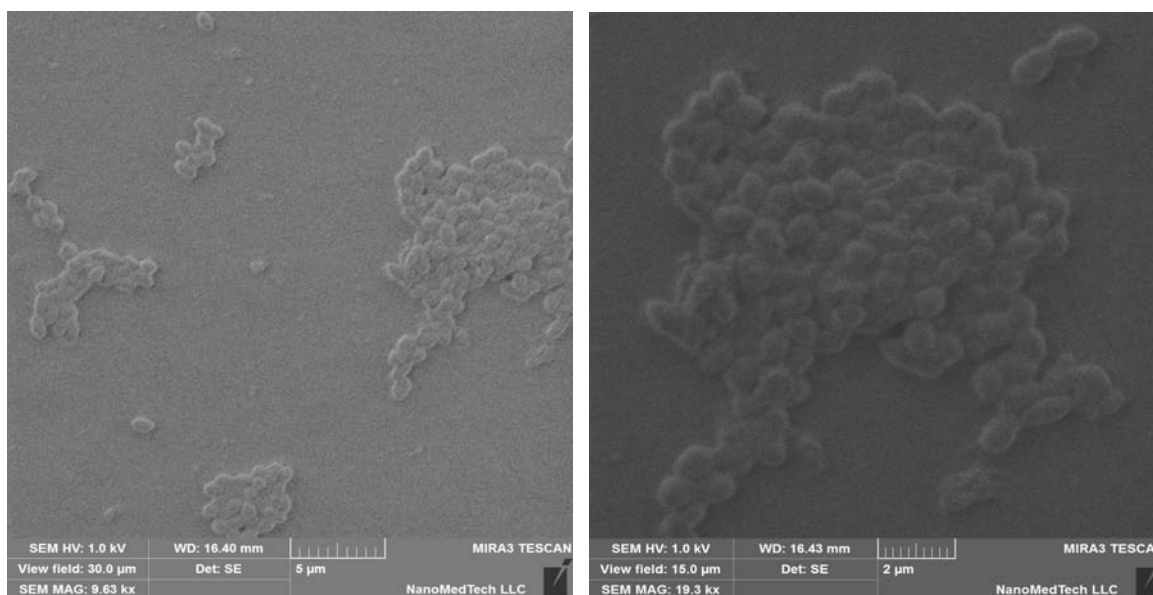


Рис. 2. Утворення агломератів *E. faecalis* усередині силіконового катетера *in vitro* через 48 годин

У деяких ділянках між агрегатами залишалися окремі мікроколонії клітин *E. faecalis* (рис. 2). Згідно з нашими спостереженнями, агрегати характеризуються поділом клітин *E. faecalis* із мікроколоній, що передують їм.

Електронномікроскопічна картина оброщування чітко відрізняється від адгезії. Коли відбувається адгезивна контамінація поверхні, мікроорганізми дифузно

розкидані по поверхні та не стикаються один з одним (рис. 1). Кардинальною ознакою біоплівкоутворення є щільне розташування мікробних клітин, оскільки виникає через клітинний поділ упродовж 48 годин (рис. 2). Через 72 години інкубації площа біоплівкового росту *E. faecalis* збільшилась до 1 922,8 мкм². На рисунку 3 зафіксоване щільне оброщення поверхні досліджуваного катетера з нашаруванням бактерій.

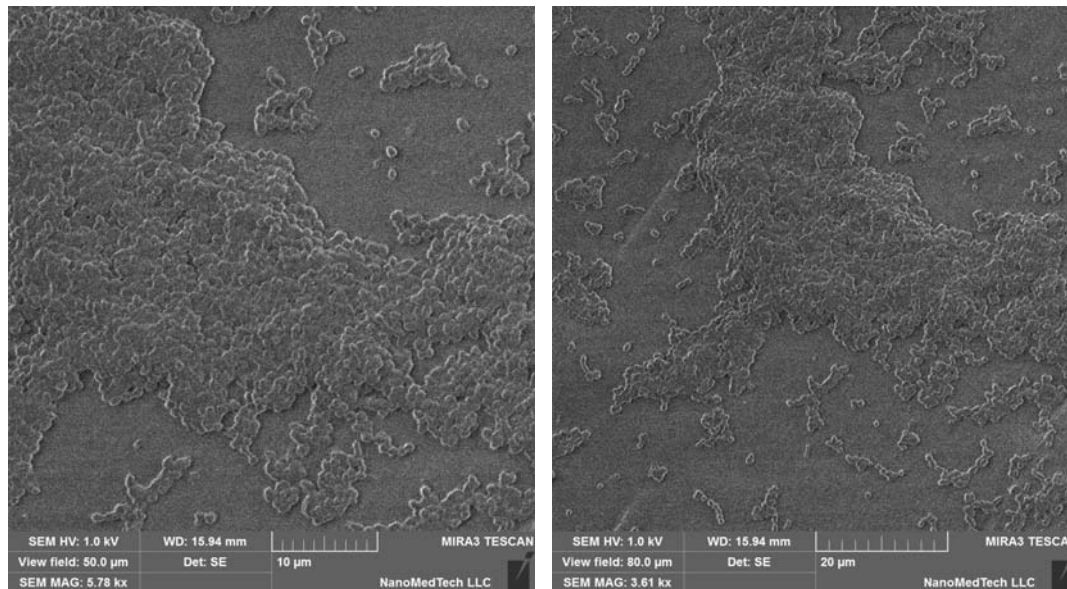


Рис. 3. Біоплівковий ріст *E. faecalis* на поверхні силіконового катетера *in vitro* через 72 години

Наведені результати отримано на фрагментах катетерів, занурених у бульйон у вертикальному положенні. Така орієнтація виключила осадження мікробів за рахунок седиментації, тобто за дії сили тяжіння. Адже відомо, що після логарифмічної фази та досягнення М-концентрації вже за лічені години починається відмирання мікробів і можливе їх осадження. Тому отримані результати свідчать про утворення біоплівки, а не осад змертвілих мікробів.

Звертаємо увагу на те, як розташовані клітини в мікроколоніях, агрегатах і розвинених біоплівках, наведених на рисунках 1, 2 та 3: мікробні клітини щільно прилягають одна до одної, що є наслідком їх поділу під час розмноження. Ця ознака, на наш погляд, характерна, оскільки дає змогу передбачити біоплівкоутворення на початкових стадіях, наприклад, коли тільки починають утворюватись мікроколонії. Та сама ознака дає можливість відрізнити біоплівку від мікробного осаду іншого походження.

В означенні CDC записано (Salmanov et al., 2012), що «біоплівка є формою групованого існування мікроорганізмів, вкритих екзополімерною оболонкою, які утворюються як на природних, так і штучних (неживих) поверхнях». Із цим означенням важко погодитись, тому що тоді, наприклад, центрифугат рідкої культури, або мікробний осад на поверхні мембранного фільтра теж треба вважати «біоплівкою».

Із наших досліджень випливає, що біоплівка є «способом оброщення штучних і природних поверхонь мікроорганізмами, які утримуються на них за рахунок екзополімерних оболонок». Ознака оброщення – щільне розташування мікробних клітин. Крім переваги чисто

біологічної ознаки («оброщення»), пропонуване визначення не вимагає ніяких додаткових ознак на зразок товщини, протяжності, розмірів плівки, потреба в яких неодмінно виникає у разі застосування такого загальновідомого поняття як «плівка».

Висновки

Характерна ознака біоплівкового росту *E. faecalis* на поверхні силіконового катетера – це щільне розташування мікробних клітин.

Біоплівкоутворення на катетерах започатковується адгезією *E. faecalis* наприкінці першої доби росту у бульйонній культурі, з початком утворення мікроколоній із кількох клітин.

Агрегати мікробних клітин, як один з етапів формування біоплівки, виникають на другу добу; виражена багатошарова форма формується на третю добу.

Вертикальна орієнтація фрагментів катетера у суспензії бульйонної культури дає змогу уникнути домішок седиментованих бактерій і зумовлює справжню адгезію та наступний біоплівковий ріст.

Біоплівковий ріст бактерій виду *E. faecalis* відбувається з розширенням площі оброщування катетерів з 51,5 до 1922,8 мкм² протягом 24–72 годин інкубації.

Бібліографічні посилання

Baldassarri, L., Creti, R., Montanaro, L., Orefici, G., Arciola, C.R., 2005. Pathogenesis of implant infections by enterococci. *Int. J. Artif. Organs*. 28(11), 1101–1109.

- Coenye, T., Nelis, H.J., 2010. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. *J. Microbiol. Meth.* 83, 89–105.
- Dobrohot'sky, A.N., Khomyakov, J.N., Khomyakov, T.I., 2009. Epydemiyolohycheskoe znachenye formyrovaniya byoplenok v tehnycheskyh systemah [Epidemiological importance of biofilm formation in technical system]. *Life Without Dangers. Health. Prevention. Longevity* 1, 78–81 (in Russian).
- Donlan, R.M., 2011. Biofilm elimination on intravascular catheters: Important considerations for the infectious disease practitioner. *J. Clin. Infect. Dis.* 52(8), 1038–1045.
- Donlon, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193.
- Dunne, W.M., 2002. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15(2), 155–166.
- Galkin, M.B., 2013. Formuvannya bioplivky *Pseudomonas aeruginosa* za prysutnosti vismutovykh kompleksy porfyrinyv [*Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the presence of bismuth complexes of porphyrins]. *Instytut Mikrobiologii' i Virusologii' im. D.K. Zabolotnogo, Kyiv* (in Ukrainian).
- Garsin, D.A., Willems, R.J., 2010. Insights into the biofilm lifestyle of enterococci. *Virulence* 1(4), 219–221.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, L.P., 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.* 11(7), 1034–1043.
- Hooton, T.M., Bradley, F.S., Cardenas, D.D., 2010. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International clinical practice guidelines from the infectious diseases society of America. *Clin. Infect. Dis.* 50, 625–663.
- Hooton, T.M., Stamm, W.E., 1997. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 11(3), 551–581.
- Jacobsen, S.M., Stickler, D.J., Mobley, H.L.T., Shirtliff, M.E., 2008. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 21(1), 26–59.
- Jacobsen, T.H., 2011. Qualitative and quantitative determination of quorum-sensing inhibition *in vitro*. *Quorum-sensing: Methods and protocols. J. Meth. Mol. Biol.* 692, 253–263.
- Janov'ska, V.V., 2009. Biologichni vlastyvoli enterokokiv yak zbudnykiv zapal'nyh procesiv sechovyvidnyh shljahiv [Biological properties of enterococci pathogens as inflammation of the urinary tract]. *Instytut Epidemiologii ta Infekciynyh Hvorob im. L.V. Gromashevs'kogo NAMN Ukrainy, Kyiv* (in Ukrainian).
- Kostrikova, J.A., 2011. *Enterococcus faecalis* jak potencijnyj infekciynyj patogen v klinici vnutrishn'oi' medycyny [*Enterococcus faecalis* infection as a potential pathogen in clinical internal medicine]. *Actual Problems of Modern Medicine* 36(4), 139–141 (in Ukrainian).
- Lysen'ki, P., Mykuc'ki, J., Sulik, A., 2005. Enterokoky: Stari bakterii', novi problemy [Enterococci: Old bacteria new problems]. *Laboratory Diagnosis* 3, 23–35 (in Ukrainian).
- Makushenko, O.S., 2002. Enterokoky: Ekologichne ta klinichne znachenja v suchasnyh umovah [Enterococci, environmental and clinical significance in modern conditions]. *Laboratory Diagnosis* 3, 43–45 (in Ukrainian).
- Mel'nikov, V.G., 2010. Poverhnostnye struktury grampozitivnyh bakterij v mezhkletochnom vzaimodejstvii i pljonkoobrazovanii [Surface structure of gram-positive bacteria in cell-cell interactions and biofilm]. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology* 2, 119–123 (in Russian).
- Mironenko, L.G., 2009. Stabil'nost' biologicheskikh svojstv *Enterococcus faecium* v processe kriokonservirovaniya [The stability of the biological properties of *Enterococcus faecium* in the process of cryopreservation]. *Metody Odezhanja Chystyh Kul'tur Mikroorganizmiv ta Ih Dovgostrokovogo Zberigannja v Kolekcijah. Znannja Ukrainy, Kyiv* (in Ukrainian).
- Mohamed, J.A., Huang, D.B., 2007. Biofilm formation by enterococci. *J. Med. Microbiol.* 56(12), 1581–1588.
- Mohamed, J.A., Huang, W., Nallapareddy, S.R., Teng, F., Murray, B.E., 2004. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infect. Immun.* 72(6), 3658–3663.
- Mohamed, J.A., Murray, B.E., 2005. Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of *Enterococcus faecalis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43(10), 5405–5407.
- Pace, J.L., Rupp, M.E., Finch, R.G., 2006. Biofilms, infection, and antimicrobial therapy. *Taylor Francis Group*.
- Pascual, A., 2002. Pathogenesis of catheter-related infections: Lessons for new designs. *Clin. Microbiol. Infect.* 8(5), 256–264.
- Polishchuk, O.I., Mironenko, L.G., Glushkevych, T.G., Janov'ska, V.V., Pokas, O.V., Peretjatko, O.G., 2009. Metody vydilennja ta identyfikacii' enterokokiv [The methods of isolation and identification of enterococci]. *Znannja Ukrainy, Kyiv* (in Ukrainian).
- Saint, S., Chenoweth, C.E., 2003. Biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 17, 411–432.
- Salmanov, A.G., Marijevs'kyj, V.F., Bojko, V.V., Ioffe, I.V., Taraban, I.A., 2012. Antybiotykyrezystentnist' v hirurgii [Antibiotic resistance in surgery]. *HTMT, Kharkov* (in Ukrainian).
- Seno, Y., Kariyama, R., Mitsuata, R., Monden, K., Kumon, H., 2005. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta. Med. Okayama* 59(3), 79–87.
- Sernjak, J.P., Fukszon, A.S., Roshhyn, J.V., Krysh'topa, M.V., 2005. Problema kateter-associovannyh infekcyj mochevogo trakta y bakteryal'nyh byologicheskych plenok v sovremennoj urologii [The problem of catheter-associated urinary tract infections and bacterial biological biofilm in modern urology]. *Zdorov'e Muzhchyny* 2, 40–44 (in Russian).
- Synetar, E.O., Avdjejeva, L.V., Skoryk, M.A., Brych, O.I., 2014. Formuvannya bioplivky *Candida albicans* na poverhni medychnyh kateteriv: Doslidzhennja *in vitro* [*Candida albicans* biofilm formation on the surface of medical catheters: An *in vitro* study]. *Dovkillja ta Zdorov'ja* 68(1), 28–32 (in Ukrainian).
- Zhal'ko-Tytarenko, V.P., 1981. Mehanyzm prykreplenyja shygell k slyzystoj obolochke kyshechnyka [*Shigella* attachment mechanism to the intestinal mucosa]. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology* 8, 73–88 (in Russian).

Надійшла до редколегії 06.08.2015