

УРОПАТОГЕННЫЕ ШТАММЫ *ESCHERICHIA COLI*: БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И КОЛОНИЗАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ*

М.В. Кузнецова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Ю.С. Гизатуллина, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

В.А. Демаков, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Проблема катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей обусловлена активным заселением бактериями внедренных в организм медицинских материалов и формированием на них биопленок. Представлена характеристика уринарных и катетер-ассоциированных нозокомиальных штаммов уропатогенной *Escherichia coli* (UPEC). Изучены биопленкообразование и выживаемость UPEC на различных типах урологических катетеров в монокультуре и в ассоциациях *in vitro*. Показано влияние свойств атакуемой поверхности и факторов внешней среды на колонизационную активность бактерий.

Ключевые слова: уропатогенные *Escherichia coli*, биопленки, урологические катетеры, микробные ассоциации.

Биопленки как форма существования микроорганизмов привлекают все большее внимание в последние годы. Особо актуальной эта тема является для медицинской микробиологии в связи с широким применением в клинической практике био- и искусственных материалов, поверхности которых активно колонизируются бактериями [10]. Известно, что в составе биопленки клетки лучше защищены от негативных факторов. Экзополисахаридный матрикс, продуцируемый бактериями, обеспечивает «экранирование» живых клеток от воздействия температуры, солей, УФ-излучения, токсичных веществ, антибактериальных препаратов и эффекторов иммунитета [9, 15]. Высокая степень защиты бактерий

способствует их длительному сохранению, повышает риск персистенции возбудителя в организме и развития хронической инфекции [1, 5], поэтому биопленко-ассоциированные инфекции сложнее поддаются диагностике и лечению. Изучение механизмов формирования хронических инфекционных процессов и разработка способов борьбы с ними – одни из самых актуальных задач современной клинической микробиологии и инфектологии.

Наибольшее число случаев инфекций мочевыводящих путей (ИМВП) связано с катетер-ассоциированными инфекциями [8, 11], которые относятся к наиболее распространенным заболеваниям среди взрослого населения как в амбула-

* Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 01201353249.

торной, так и в стационарной практике во всем мире [3, 16]. Ведущая роль в развитии данной группы болезней отводится *Escherichia coli* (кишечной палочке) в монокультуре или в составе ассоциаций. Штаммы, вызывающие ИМВП – уропатогенные *E. coli* (UPEC) – имеют ряд особенностей, обуславливающих повышенную выживаемость бактерий в мочевыделительном тракте. Они способны закрепляться на поверхности уретеля, вырабатывать блокаторы местного иммунного ответа организма, формировать слизистые капсулы, обеспечивающие дополнительную защиту [1, 7, 13, 17]. Для понимания механизмов адаптации бактерий к условиям уротракта активно изучаются биологические свойства штаммов *E. coli*, выделенных при осложненных, в том числе катетеризацией, формах заболеваний.

Характеристики уропатогенной *E. coli*

В проспективном двухгодичном исследовании из бактериологических лабораторий г. Перми было получено 93 штамма UPEC от пациентов, находящихся на стационарном лечении с ИМВП. Из них 73 культуры были выделены из мочи, 20 получены непосредственно с поверхности уринарных катетеров через 48 ч после госпитализации [6].

Использование мультиплексной ПЦР (quadriplex PCR) согласно Clermont и соавт. (2013) позволило определить филогенетическую группу более чем 90% штаммов UPEC. Нозокомиальные культуры почти в 88,2% случаев принадлежали к филогруппе B2, к которой отнесены и все катетер-ассоциированные штаммы (табл.).

Анализ биопленкообразующей способности UPEC показал, что она варьировалась в широких пределах: от 0,054 до 0,593 ед. ОП₅₇₀. Распределив штаммы по степени биопленкообразования

Таблица

Сравнительная характеристика биологических свойств штаммов UPEC, выделенных из мочи и с поверхности катетеров

Признак	Уринарные штаммы (n/%)	Катетер-ассоциированные штаммы (n/%)
Филогруппа:		
B2	62/84,9	20/100
Не B2	11/8,03	0
Гемолиз		
с гемолизом	15/20,5	4/20,0
Биопленкоформирование:		
Низкое	21/28,8	11/55,0*
Высокое	52/71,2	9/45,0
Антибиотикорезистентность:		
Ампициллин	41/56,2	12/60,0
Амоксициллин	18/24,7	11/55,0*
Цефотаксим	27/37,0	12/60,0
Амикацин	6/8,2	2/10,0
Ципрофлоксацин	25/34,2	12/60,0*
Продукция БЛРС	17/23,3	12/60,0*

* – достоверное отличие от группы уринарных штаммов (p<0,05).

(более 0,3 ед. ОП₅₇₀ – высокое биопленкообразование, менее 0,3 ед. ОП₅₇₀ – низкое биопленкообразование), выявили, что 65,6% формировали массивную биопленку, при этом биопленкообразующими чаще были уринарные *E. coli*, чем катетер-ассоциированные культуры. Гемолитическую активность проявляли только 20% исследованных UPEC, и их доля не различалась между группами. Важно отметить, что штаммы, выделенные при катетеризации, чаще были устойчивы к амоксицилину и ципрофлоксацину. Продукция бета-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) была выявлена у двадцати девяти (31,2%) культур, при этом статистически значимо их доля различалась в группах нозокомиальных штаммов: уринарные < катетер-ассоциированные (p<0,005). Таким образом, наши результаты согласуются с данными исследований, которые указывают на возможность концентрирования в стационаре *E. coli* филогруппы B2, а представители именно этой группы считаются основными патогенами для человека.

Влияние условий среды на биопленкообразующую способность уропатогенной *E. coli*

Большинство ИМВП вызваны представителями нескольких видов фекальной микробиоты [12, 20]. Хорошо известна способность таких микроорганизмов, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, изменять pH окружающей среды биотопа, продуцируя уреазу – фермент, расщепляющий мочевины с образованием свободного аммиака [5, 24]. Изменение уровня кислотности играет большую роль в жизнеспособности бактериальных клеток и развитии инфекционного процесса. В литературе встречаются противоречивые данные о влиянии pH среды на биопленкообразование эшерихий, тогда как оптимум роста *E. coli* находится в диапазоне pH 6,0–8,0 [22, 23]. Поскольку именно этот микроорганизм является ведущим этиопатогеном при ИМВП, интересно

было оценить его «ответ» на изменение уровня кислотности среды.

Максимальная биомасса биопленок штаммов UPEC была зарегистрирована в диапазоне pH 6,0–7,0. При этом биопленкообразующая способность бактерий не различалась в слабокислой и слабощелочной среде и оставалась значительно ниже, чем при нейтральном уровне кислотности (рис. 1, А).

Содержание глюкозы в среде также является важным фактором, определяющим эффективность размножения бактерий. Известно, что у людей с сахарным диабетом выше риск развития ИМВП из-за повышенной концентрации глюкозы в моче [11, 18, 19]. В нашем исследовании при увеличении количества основного питательного субстрата клетки *E. coli* образовывали более массивные биопленки, что хорошо видно на рис. 1, Б. Таким образом, показано, что более массивные биопленки были сформированы на поли-

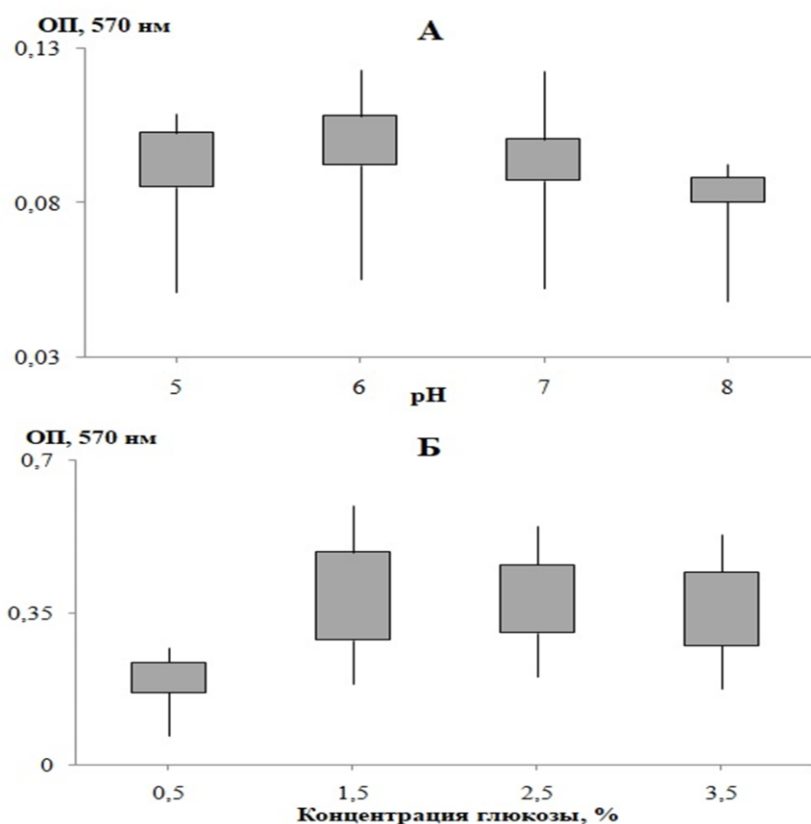


Рис. 1. Зависимость биомассы биопленки *E. coli* от уровня кислотности среды (А) и количества глюкозы (Б)

стироле при концентрации глюкозы 1,5% и выше, а также при рН 6,0 и 7,0. В связи с последним можно предположить, что при смешанной инфекции *E. coli* будет иметь меньшее преимущество в росте, если ассоциант способен изменять рН среды.

Модели для изучения процесса формирования биопленок

Изучением биопленок в последние годы активно занимаются во всем мире. Несмотря на разнообразие целей исследований, основная работа осуществляется в модели, принятой в качестве классического образца – полистироловом иммунологическом планшете. Удобство данного варианта очевидно, так как в ходе эксперимента большинство параметров унифицированы (площадь поверхности, материал, кислородные условия и т.д.). Однако в случае клинической задачи по изучению биопленок полистироловый планшет может быть использован только для проведения предварительных исследований биологических свойств микроорганизмов.

Для получения более достоверных результатов по адгезивной, биопленко-

образующей активности и выживаемости бактерий при моделировании катетер-ассоциированной инфекции необходимо использовать непосредственно применяемые в урологической практике материалы, которые различаются по многим показателям (архитектура поверхности, гидрофобность и шероховатость, поверхностный заряд, наличие дополнительных антимикробных агентов и т.д.).

Самыми распространенными на сегодняшний день являются катетеры Нелатона и Фолея из латекса, силикона, предназначенные для длительной катетеризации (более 7 дней), и поливинилхлорида (ПВХ). Среди вышеперечисленных типов катетеров есть много модификаций: гидрофильное покрытие, пропитка антибактериальными препаратами, напыление наночастиц серебра и др. Некоторые из них были использованы нами для изучения колонизационной активности UPEC (рис. 2).

Колонизационная активность штаммов UPEC

Используемые в современной практике урологические катетеры имеют различные показатели гидрофобности.

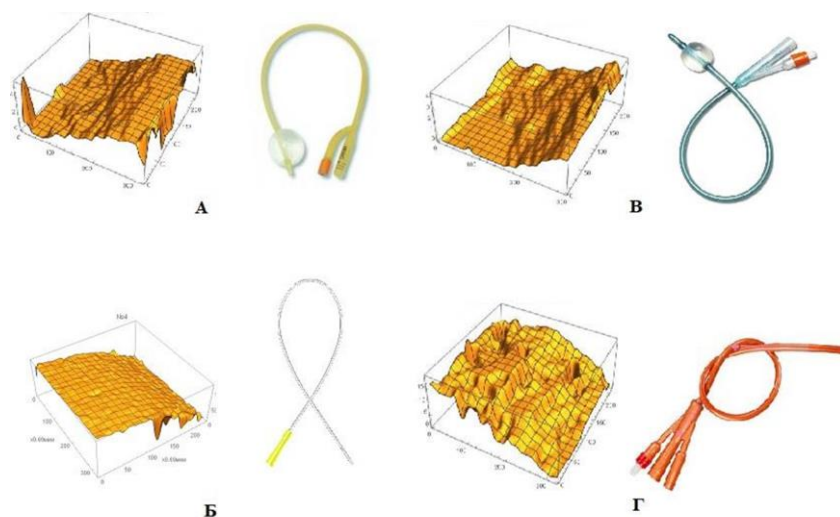


Рис. 2. Внешний вид (фотографии с сайта <http://www.apexmed.ru>) и 3D-рельеф поверхности (получены с использованием оптического цифрового 3D-видеомикроскопа Nirox KH-7700 с.н.с. ИТХ УрО РАН Морозовым И.А.) урологических катетеров, применяемых в современной практике: А – латекс, Б – ПВХ, В – силикон, Г – катетер с серебряным покрытием.

Ранее показано, что повышение гидрофильности материала препятствует биопленкообразованию микроорганизмов [10, 21]. Согласно нашим исследованиям, наиболее гидрофобным является латексный катетер, а наименее – катетер из силикона. Полистирол в классической модели оказался самым гидрофобным в ряду абиотических поверхностей. Сильная корреляция ($R_s=0,69$) между показателем биомассы биопленки и гидрофобностью поверхности урологического катетера (рис. 3, А) доказывает, что физико-химические параметры материала определяют характер адгезии уропатогенных *E. coli* [2].

Наибольшее клиническое значение имеет количество жизнеспособных клеток, заключенных в биопленке, которая является резервуаром бактерий, способных к персистированию в организме. Для данного показателя можно проследить обратную зависимость: на катетере с наименьшей биопленкой (и самой низкой гидрофобностью, соответственно) наблюдалась самая высокая выживаемость клеток и наоборот (рис. 3, Б). При этом в полистироловом планшете, несмотря на высокий показатель гидрофобности и массивную биопленку, обнаружено большое число живых клеток. Полученные результаты подтверждают необходимость

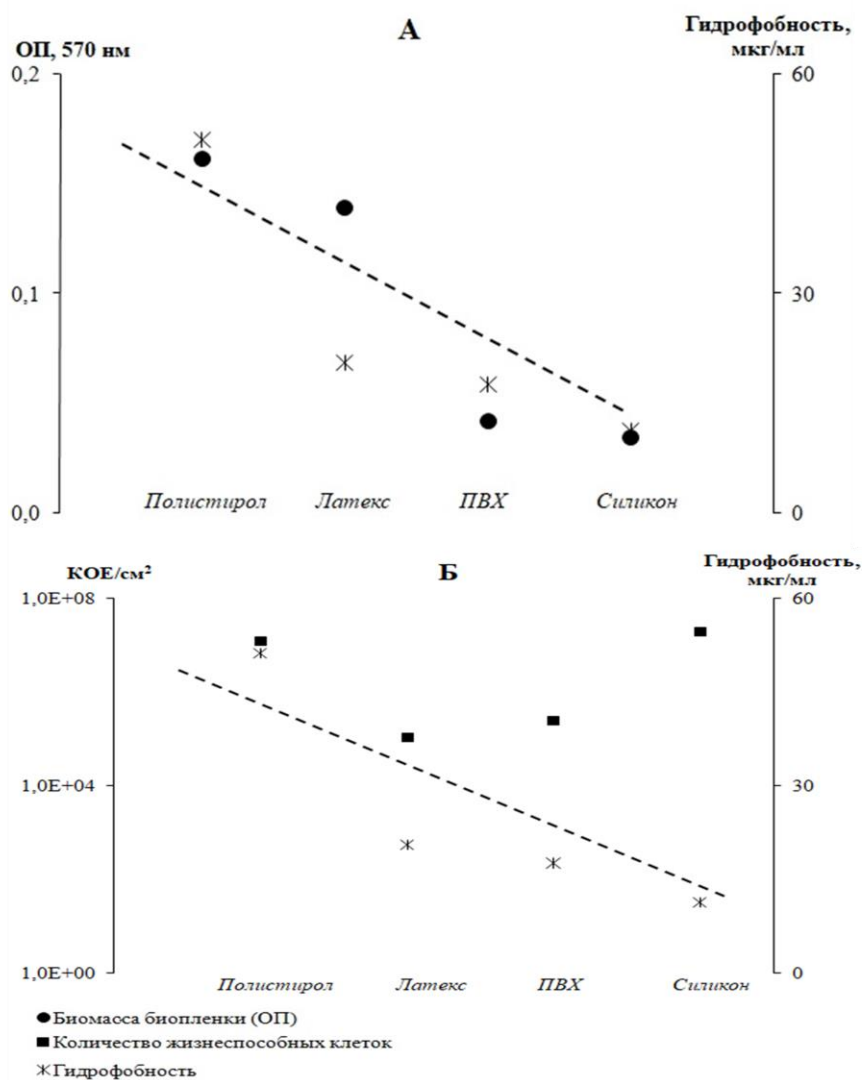


Рис. 3. Биомасса биопленок (А) и количество жизнеспособных клеток *E. coli* (Б) на различных поверхностях. Пунктирная линия – усредненные значения гидрофобности поверхностей

использования реальных материалов для изучения процесса колонизации в медицинских исследованиях.

Смешанные инфекции мочевыводящих путей

Наряду с ведущим этиопатогеном (*E. coli* – до 80%) при ИМВП часто обнаруживаются *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* и *Enterococcus faecalis* [14, 20]. Ранее показано, что доля ассоциаций в уринарной группе составила 43,8%, а в катетер-ассоциированной частота микст-вариантов выявлялась уже в 80% исследований. Преобладающими при неосложненных [6] ИМВП были двухкомпонентные ассоциации (78,1%), при катетеризации – двух-, трех- и четырехкомпонентные ассоциации встречались в равной степени (рис. 4).

Сравнение нозокомиальных УРЕС, выделенных при ИМВП из мочи и с поверхности катетера, показало, что при катетеризации видовой спектр ассоциантов ограничен несколькими таксонами: клебсиелла, протей, неферментирующие бактерии (рис. 5), тогда как при неосложненных ИМВП изолированы коринебактерии, стрептококки, кандиды, которые вообще

не были обнаружены при катетер-ассоциированных инфекциях. Интересно, что ассоциация *E. coli*–*E. coli* чаще встречалась в группе уринарных штаммов, изолированных у пациентов без катетеризации.

В связи с этим нами были изучены две наиболее часто встречающиеся микробные ассоциации – *E. coli* с *K. pneumoniae* и *E. faecalis*. При совместном росте эшерихий с клебсиеллой или энтерококком рН среды смещался в щелочную сторону до 8,5 с *K. pneumoniae* и 8,4 с *E. faecalis*, по сравнению с моновариантом *E. coli* (рН 7,5). Интересно, что в предварительных экспериментах на полистироле при нейтральной реакции среды монокультура *E. coli* имела более высокую биопленкообразующую способность, чем при рН 8,0 [4], а в ассоциациях, напротив, биомасса смешанной биопленки была выше.

При анализе двух наиболее распространенных урологических катетеров (латексного и силиконового) можно увидеть, что биомасса обеих смешанных биопленок была намного выше на поверхности латексного катетера, что согласуется с концепцией о влиянии гидрофобности материала на биопленкообразо-

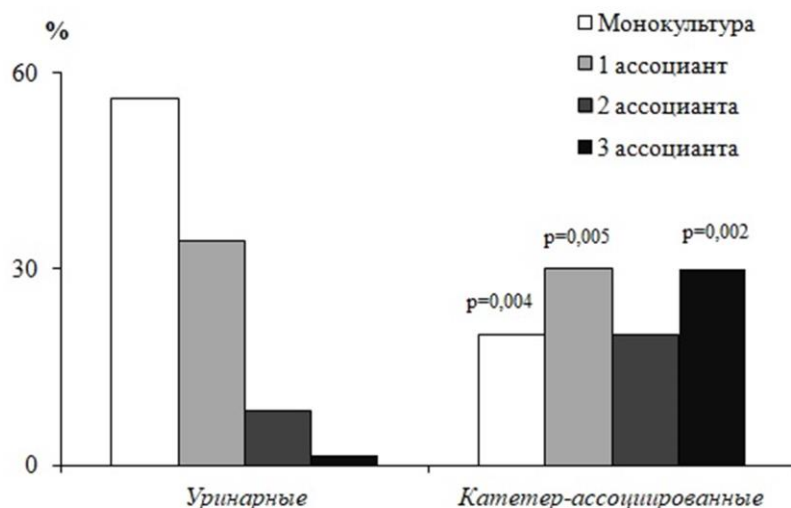


Рис. 4. Процентное соотношение *E. coli* в монокультуре и в составе ассоциаций в моче и на поверхности катетеров.

**p* – уровень достоверности различий по сравнению с группой уринарных штаммов

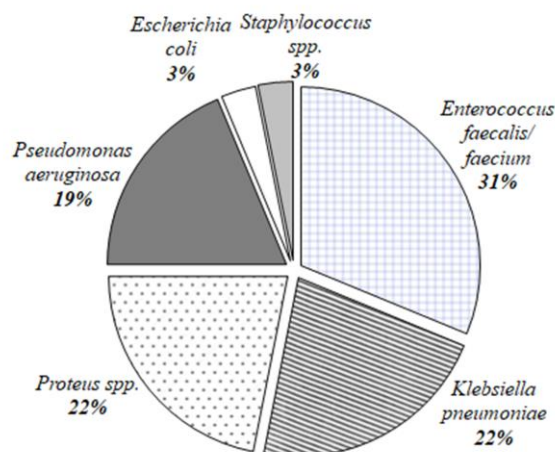


Рис. 5. Доли основных ассоциантов *E. coli* при катетер-ассоциированных инфекциях

вание (рис. 6). Также на его поверхности *E. faecalis* оказался практически не конкурентоспособным при совместном росте. *K. pneumoniae*, напротив, имела равное соотношение жизнеспособных клеток с *E. coli* на обеих поверхностях.

Таким образом, в модельном эксперименте было показано, что изменение условий роста при смешанных инфекциях (в частности уровня pH) не имеет значительного влияния на рост клеток УРЕС, которые обладают высокой конкурентоспособностью в ассоциациях как с грамотрицательными, так и с грамположительными

бактериями, что подтверждает их ведущую роль в инфекциях мочевыводящих путей.

Заключение

Штаммы уропатогенной *E. coli* имеют высокий потенциал для существования в условиях мочевого тракта. Активность процесса биопленкообразования, выживаемость клеток на поверхности различных катетеров зависят от характеристик используемого материала, условий развития инфекции, а также видового разнообразия возбу-

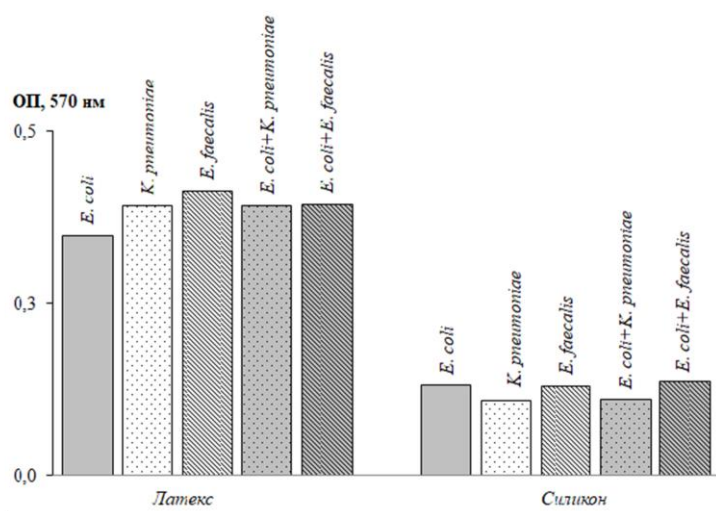


Рис. 6. Биомасса моновидовых и смешанных биопленок на поверхности катетеров из латекса и силикона

телей. Изучение механизмов адгезии, формирования биопленок и оценка влияния различных факторов на структурную организацию прикрепленных микробных сообществ представляет научную и практическую значимость. Информация о колонизационной актив-

ности УРЕС может быть использована для разработки медицинских материалов, менее подверженных бактериальной колонизации, а также поиска эффективных способов предупреждения адгезии бактерий на внедренные медицинские устройства.

Библиографический список

1. Бухарин О.В., Гриценко В.А., Вялкова А.А. Факторы уропатогенности бактерий: роль в патогенезе и значение в диагностике пиелонефрита // Нефрология и диализ. – 2001. – Т. 3. – № 4. – С. 469–475.
2. Гизатуллина Ю.С., Кузнецова М.В. Формирование биопленок уропатогенными штаммами *Escherichia coli* на различных абиотических поверхностях // Вестник Пермского университета. – 2017. – № 2. – С. 185–192.
3. Жабченко И.А. Уропатогенные штаммы *Escherichia coli*: особенности функционирования, факторы вирулентности, значение в клинической практике // Таврический медико-биологический вестник. – 2013. – Т. 16. – № 2. – Ч. 2. – С. 201–206.
4. Каримова Н.В., Гизатуллина Ю.С., Демаков В.А. Колонизационная активность уропатогенных *Escherichia coli* в полимикробных ассоциациях // Высокие технологии, определяющие качество жизни: материалы II Международной науч. конф. – Пермь. – 2018. – С. 221.
5. Коган М.И., Хасигов А.В., Белоусов И.И. Микробный спектр мочи при коралловидном нефролитиазе // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011. – Т. 7. – № 3. – С. 714–718.
6. Кузнецова М.В., Проворова С.В., Кубарев О.Г., Юдин Д.П., Каримова Н.В., Баяндина Н.В., Теплякова М.А., Демаков В.А. Сравнительная характеристика штаммов уропатогенной *Escherichia coli*, выделенных в условиях поликлиники и стационара // Урология. – 2018. – № 6. – С. 37–44.
7. Лагун Л.В., Жаворонок С.В. Бактериальные биопленки и их роль в инфекции мочевыводящих путей // Медицинский журнал. – 2013. – № 4. – С. 21–27.
8. Малей М. Лечение инфекций мочевыводящих путей: фокус на фторхинолоны // Медицинские аспекты здоровья мужчины. – 2015. – № 2(17). – С. 27–31.
9. Мальцев С.В., Мансурова Г.Ш. Что такое биопленка? // Природная медицина. – 2013. – № 13. – С. 86–89.
10. Немец Е.А., Юнес Р.А., Худощин А.К., Габриэлян Н.И., Севастьянов В.И. Образование биопленок штаммами госпитальной флоры, выделенными из биологических субстратов пациентов, на поверхности материалов и изделий медицинского назначения // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2013. – Т. 15. – № 4. – С. 92–97.
11. Перепанова Т.С. Значение инфекций, обусловленных образованием биопленок, в урологической практике // Эффективная фармакотерапия. Урология и нефрология. – 2013. – № 4(37). – С. 26–30.
12. Сергеев В.И., Ключарева Н.М. Факторы риска и профилактика внутрибольничных катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей // Заместитель главного врача. – 2016. – № 4(119). – С. 82–85.
13. Abdallah N.M.A., Elsayed S.B., Yassin M.M., El-gohary M., El-gohary G.M. Biofilm forming bacteria isolated from urinary tract infection, relation to catheterization and susceptibility to antibiotics // Int. J. Biotechnol. Mol. Biol. Res. – 2011. – Vol. 2. – P. 172–178.
14. Balasubramanian A., Chairman K., Ranjit Singh A.J.A., Alagumuthu G. Isolation and identification of microbes from biofilm of urinary catheters and antimicrobial susceptibility evaluation // As. Pas. J. Trop. Biomed. – 2012. – Vol. 8. – P. 1780–1783.
15. Donlan R.M., Costerton J. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15(2). – P. 167–193.
16. Ferrières L. *Escherichia coli* strains during catheter-associated biofilm formation // FEMS Imm Med Microbiol. – 2007. – Vol. 51(1). – P. 212–219.
17. Giray B., Ucar F.B., Aydemir S.S. Characterization of uropathogenic *Escherichia coli* strains obtained from urology outpatient clinic of Ege Medical Faculty in İzmir // Turk.J. Med. Sci. – 2012. – Vol. 42. – P. 1328–1337.
18. Grabe M., Bartoletti R., Bjerklund-Johansen T.E., Çek R.S., Pickard H.M., Tenke P., Wagenlehner F., Wullt B. Инфекции мочевыводящих путей у пациентов с почечной недостаточностью, после трансплантации почки, сахарным диабетом и иммуносупрессией. Рекомендации Европейской ассоциации урологов / Урология и нефрология. Избранные вопросы нефрологии. – 2015. – № 6. – С. 4–14.
19. Melecos M.D., Naber K.G. Complicated urinary tract infections // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2000. – Vol. 15. – P. 247–256.

20. *Nicolle L.E.* Catheter associated urinary tract infections // *Antimicrob. Resist. Inf. Control.* – 2014. – Vol. 3(23). – P. 1–8.
21. *Pagedar A., Singh J., Batish V.K.* Surface hydrophobicity, nutritional contents affect *Staphylococcus aureus* biofilms and temperature influences its survival in preformed biofilms // *J. B. Microbiol.* – 2010. – Vol. 50. – P. 98–106.
22. *Romeo T.* Bacterial biofilms // In: Springer Ed. T. Romeo – Hidelberg. – 2008. – P. 295.
23. *Schilling A.T.* The effect of pH on the bacterium *E. coli* // California State Science Fair (2008).
24. *Tenke P., Kovacs B., Jackel M., Nagy E.* The role of biofilm infection in urology // *World J. Urol.* – 2006. – Vol. 24. – P. 13–20.

UROPATHOGENIC ESCHERICHIA COLI STRAINS: BIOLOGICAL PROPERTIES AND COLONIZATION ACTIVITY

M.V. Kuznetsova, J.S. Gizatullina, V.A. Demakov

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS

The problem of catheter-associated urinary tract infections is caused by the active colonization of embedded medical materials by bacteria and biofilm formation. The article presents the characteristics of urinary and catheter-associated nosocomial *Escherichia coli* (UPEC) strains. It observes biofilm formation and UPEC viability on different types of urological catheters both in monoculture, and associations *in vitro*. The influence of the properties of the attacked surface, as well as environmental factors, on the colonization activity of bacteria has been shown in the study.

Keywords: uropathogenic *Escherichia coli*, biofilms, urological catheters, microbial associations.

Сведения об авторах

Кузнецова Марина Валентиновна, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии, Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН (ИЭГМ УрО РАН), 614081, г. Пермь, ул. Голева, 13; e-mail: mar@iegm.ru

Гизатуллина Юлия Сагитовна, инженер лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии, ИЭГМ УрО РАН; e-mail: gizatullina.julia@yandex.ru

Демаков Виталий Алексеевич, доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, профессор, заведующий лабораторией молекулярной микробиологии и биотехнологии ИЭГМ УрО РАН; e-mail: demakov@iegm.ru

Материал поступил в редакцию 07.02.2019 г.