

НОВЫЙ МЕТОД КОЛИЧЕСТВЕННОГО УЧЕТА КОККОВ В НАДКЛЕТОЧНЫХ ОБРАЗОВАНИЯХ — КЛАСТЕРАХ И БИОПЛЕНКЕ

УДК 576.851.2

Поступила 19.03.2010 г.



И.В. Чеботарь, к.м.н., доцент кафедры микробиологии и иммунологии;
Е.А. Таланин, программист;
Е.Д. Кончакова, студентка

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород

Цель исследования — разработка нового метода подсчета кокковых микроорганизмов в составе кластеров и биопленки и способов применения этого метода для количественных оценок стафилококковых биопленок.

Материалы и методы. Использовали различные штаммы золотистого и эпидермального стафилококков: *Staphylococcus aureus* (штаммы 5983/2, 5663/2, 18А) и *Staphylococcus epidermidis* (штаммы 178М, 0309, 328/5).

Результаты. Продемонстрированы возможности вновь разработанного метода автоматизированного подсчета микробов в составе биопленки или в составе микробных кластеров. Метод позволяет: 1) учитывать абсолютное количество микробных клеток на цифровом изображении микроскопического препарата; 2) учитывать количество кластеров с определением количества микробных клеток, из которых они состоят; 3) отображать распределение отношений «микроб/кластер» в виде графика.

Ключевые слова: биопленка, бактериальные кластеры, стафилококки.

English

New method of the coccus quantitative consideration in the supracellular formations — clusters and biofilm

I.V. Chebotar, c.m.s., assistant professor of a microbiology and immunology chair;
E.A. Talanin, programmer;
E.D. Konchackova, student

Nizhny Novgorod state medical academy, N. Novgorod

Aim of investigation is elaboration of a new method of the coccal microorganism calculation in the clusters and biofilm and methods of that method use for the staphylococcal biofilm quantitative assessments.

Materials and methods. The different strains of the golden and epidermal staphylococci: *Staphylococcus aureus* (strains 5983/2, 5663/2, 18A) and *Staphylococcus epidermidis* (strains 178M, 0309, 328/5) were used.

Results. The possibilities of a newly elaborated method of the microbe automated calculation in the biofilm or microbic clusters are demonstrated. A method permits: 1) to consider an absolute quantity of microbic cells in a digital picture of a microscopic preparation; 2) to consider a quantity of clusters with a detection of the microbic cell quantity; 3) to depict a distribution of the «microbe/cluster» ratios in a form of graph.

Key words: biofilm, bacterial clusters, staphylococci.

Исследования последних лет вскрыли возможность существования бактерий в форме сложноорганизованных сообществ, что качественно изменило взгляды на патогенез, терапию и профилактику инфекционных заболеваний. Дело в том, что многие бактерии способны к надклеточной организации, которая повышает их

резистентность ко многим повреждающим факторам, таким как антибиотики и дезинфектанты, фагоцитоз [1]. Самой сложной формой надклеточной организации патогенных бактерий является биопленка [2] — такое микробное сообщество, при котором бактерии локализованы на какой-либо поверхности внутри сложноор-

Для контактов: Чеботарь Игорь Викторович, тел. раб. 8(831)465-42-71; e-mail: nizarnn@yandex.ru.

ганизованного внеклеточного матрикса [3], имеющего белковую либо полисахаридную природу. Некоторые бактерии (чаще кокки) могут образовывать более простые по сравнению с биопленкой надклеточные структуры — кластеры. Иногда в качестве синонимов термина «кластеры» употребляются слова «агрегаты», «конгломераты». Наиболее известным кластером является скопление стафилококков, похожее, по определению основоположников микробиологии, на гроздь винограда.

Поскольку кокковая флора продолжает занимать одну из лидирующих позиций среди возбудителей заболеваний человека [4], изучение стафилококковых надклеточных образований — кластеров и биопленок — является актуальной задачей современной медицинской науки. Важнейший аспект выполняемых исследований связан с количественным учетом бактерий, изучаемых в эксперименте. Количественное определение бактерий необходимо в двух случаях: при стандартизации исходных условий исследования и при оценке результатов эксперимента, когда нужно проанализировать изменение количества бактерий в ответ на какое-либо воздействие. Несмотря на кажущуюся простоту, вопрос определения количества бактерий является очень сложным. Обычно в современной микробиологии количественный учет микробов проводится либо по критерию светопоглощения/светопропускания [5], либо по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ). Первый критерий является достоверным только в том случае, если в образце присутствуют полностью однородные отдельные микробные клетки или одинаковые микробные кластеры, состоящие строго из одного и того же числа бактерий. В случаях, когда образцы содержат кластеры, различные по величине или структуре, применение количественного учета (или стандартизации) бактерий по светопоглощению имеет существенные ограничения. В работе [6] доказано, что агрегация стафилококков в кластеры при сохранении абсолютного количества бактериальных клеток существенно снижает светопоглощение образца взвеси. Это свидетельствует о том, что количественная оценка бактерий, которые организованы в кластеры или биопленку, при помощи методов светопропускания некорректна. Число КОЕ, безусловно, является важным показателем, но может применяться только при учете живых бактерий и требует больших временных затрат. Кроме того, метод может недостоверно оценивать общее число живых бактерий. В свете появившихся сведений о существовании групп «жизнеспособных, но неразмножающихся бактерий» [7] тест КОЕ может занижать количество живых бактерий, присутствующих в изучаемом образце. Существующие методы количественного учета микро- и наночастиц на основе анализа лазерной дифракции [8] также могут применяться для анализа количественных характеристик бактерий, но они позволяют учитывать бактерии только во взвеси, а не в адгезированном состоянии. Таким образом, существует потребность в создании методов корректной количественной оценки бактерий, организованных в надклеточные сообщества.

Цель исследования — разработка нового метода подсчета кокковых микроорганизмов в составе кластеров и биопленки и способов применения этого метода для количественных оценок стафилококковых биопленок.

Материалы и методы. Работа включала три основных этапа: подготовку препарата на основе биопленки или стафилококковых кластеров, адгезированных на поверхности (пластик), микроскопию с получением цифровых изображений бактериальных ассоциаций и программную обработку полученных изображений на персональном компьютере.

В исследовании использовали различные штаммы золотистого и эпидермального стафилококков: *Staphylococcus aureus* (штаммы 5983/2, 5663/2, 18А) и *Staphylococcus epidermidis* (штаммы 178М, 0309, 328/5).

Подготовка препаратов. Для получения стафилококковой биопленки использовали стерильные полимерные чашки Петри диаметром 40 мм. В каждую чашку помещали по 4 мл бульона Мюллера—Хинтона (Becton, Dickinson and Company), содержащего 1% глюкозы, и вносили при помощи бактериальной петли суточную культуру стафилококков. Инкубировали в течение 48 ч при +37°C. После инкубации питательную среду сливали, дважды ополаскивали поверхность чашек раствором Хенкса (по 2 мл), фиксировали 10% раствором формалина на забуференной (рН=7,2—7,4) дистиллированной воде, высушивали, окрашивали 1% раствором кристаллвиолета и промывали дистиллированной водой.

Для получения кластеров стафилококков, адгезированных на поверхности пластика, использовали взвесь бактерий в растворе Хенкса. Для этого двухсуточные культуры стафилококков в бульоне Мюллера—Хинтона (3 мл), содержащем 1% глюкозы, трижды отмывали при помощи центрифугирования (3000 об./мин по 15 мин на центрифуге ОПН-8). Полученный осадок ресуспендировали в растворе Хенкса и переносили в полимерные чашки Петри (диаметр 40 мм) по 4 мл. Инкубировали 20 мин при +37°C. После инкубации раствор Хенкса сливали, дважды ополаскивали поверхность чашек раствором Хенкса (по 2 мл), фиксировали 10% раствором формалина на забуференной (рН=7,2—7,4) фосфатным буфером дистиллированной воде, высушивали, окрашивали 0,4% раствором кристаллвиолета и промывали дистиллированной водой.

Микроскопия и получение цифровых изображений препаратов. Полученные препараты рассматривали под микроскопом при увеличении в 300—500 раз без иммерсии или с масляной иммерсией. Цифровые изображения бактерий получали с помощью видеокамеры DCM310 (Score Tec) и сохраняли в форматах *bmp* или *jpeg*.

Программная обработка полученных изображений. Для подсчета бактерий на изображениях использовали специально написанную для этого программу. Первым этапом обработки изображения являлась управляемая бинаризация изображения. Алгоритм программы основан на сравнительном анализе информации о цветах в соседних точках обрабатываемого

изображения. Программа позволяет подсчитать количество стафилококков на изображении независимо от того, расположены ли они одиночно или находятся в составе кластеров, адгезированных к поверхности, или локализованы в составе биопленки. Кроме этого, программа дает возможность определить количество кластеров, состоящих из одинакового числа бактерий, а также построить диаграмму, отражающую соотношение «кластер/количество бактерий» в этом кластере. Разработанный метод позволяет вычислить абсолютные количества бактерий: зная оптические характеристики микроскопа (диаметр поля зрения) или используя микроскопические стандарты длины, можно подсчитать плотность бактерий на единицу площади поверхности.

Сравнительная характеристика некоторых штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* по способности образовывать биопленку и адгезироваться на поверхности пластика

Исследуемый стафилококк	Биопленка (количество бактерий в поле зрения)	Адгезия (количество бактерий в поле зрения)
<i>S. epidermidis</i>: штамм 178М	34 321±2709	12 392±1351
штамм 0309	14 992±1005	8082±894
штамм 328/5	45 790±4544	9147±1031
<i>S. aureus</i>: штамм 5983/2	20 424±1544	4098±817
штамм 18А	25 233±981	5779±632
штамм 5663/2	19 756±1583	5242±703

Программа позволяет экспортировать полученные данные в стандартные приложения Excel и PRISMA для последующей статистической обработки.

Результаты и обсуждение. При помощи разработанного метода была проведена сравнительная характеристика количества стафилококков (на единицу площади) в биопленках, образованных разными штаммами *S. aureus* и *S. epidermidis*, а также изучена способность к кластерообразованию этих же штаммов стафилококков (см. таблицу и рис. 1).

Из результатов, представленных в таблице, видно, что плотность бактерий в биопленках, образованных различными стафилококками, неодинакова. Наибольшее количество клеток в поле зрения (45 790±4544) характерно для *S. epidermidis*, штамм 328/5, наименьшее — для *S. epidermidis*, штамм 0309 (14 992±1005). В целом штаммы *S. epidermidis* 178М и 328/5 характеризовались более высокой плотностью бактериальных клеток в биопленке. Показатели адгезии — количество адгезированных к пластику бактерий на единицу площади — не коррелировали со способностью образовывать биопленку. Наиболее адгезивным оказался *S. epidermidis*, штамм 178М (12 392±1351 клеток в поле зрения), наименее адгезивным — *S. aureus*, штамм 5983/2 (4098±817 клеток в поле зрения).

Отсутствие корреляции может быть объяснено с позиции молекулярных механизмов, обеспечивающих закрепление стафилококков на пластике и в биопленке. Согласно данным М. Vergara-Irigaray с соавт. [9], стафилококки закрепляются на неспецифических носителях благодаря специальным молекулам, прежде всего тейхоевым кислотам. Биопленочные контакты реализуют

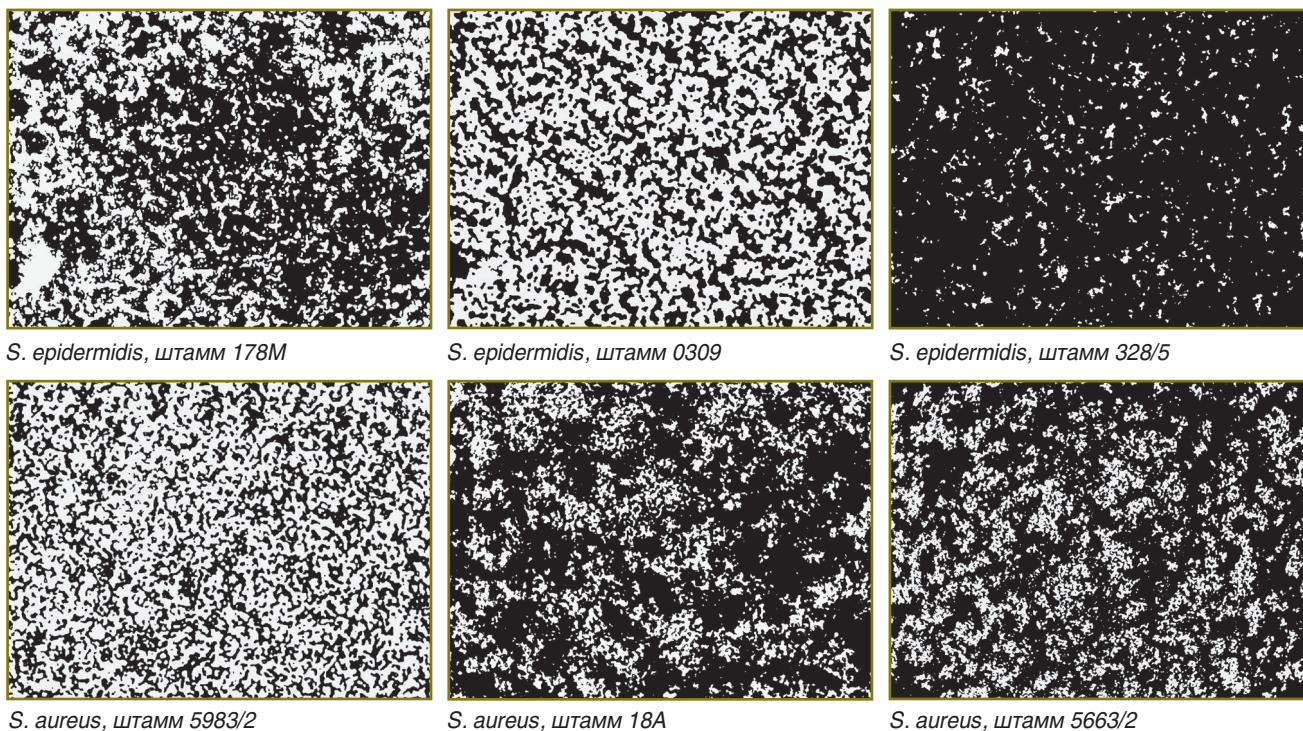


Рис 1. Типовые бинаризованные изображения биопленочных ассоциаций, образованных некоторыми штаммами *S. epidermidis* и *S. aureus*

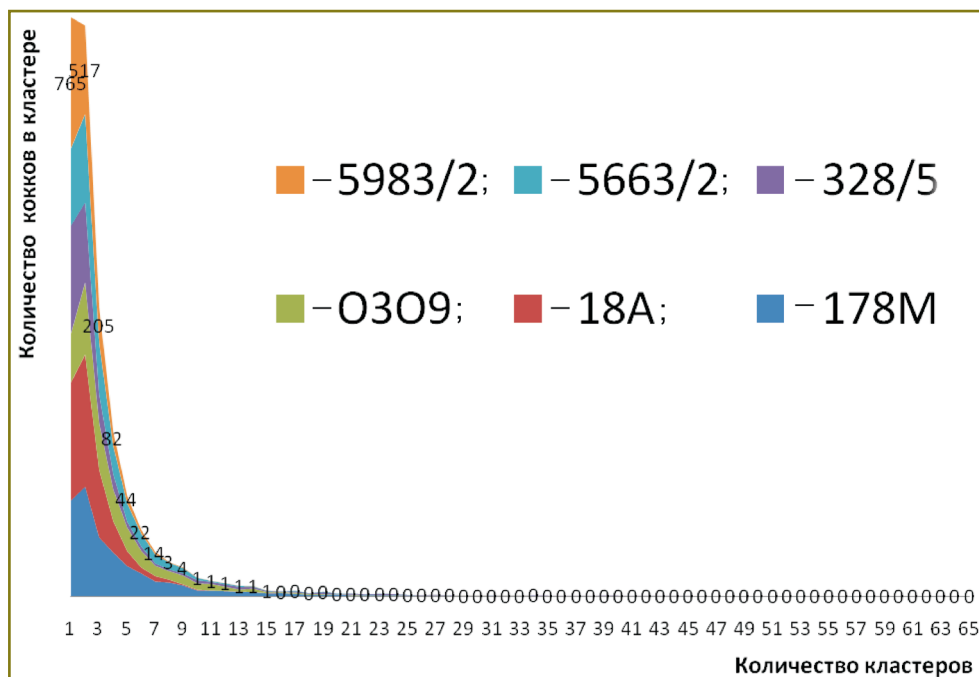


Рис. 2. Диаграмма распределения количества бактерий в составе кластеров разных штаммов *S. aureus* (18A, 5983/2 и 5663/2) и *S. epidermidis* (178M, 0309 и 328/5), адгезированных на пластике

ся через связь с матриксом за счет других поверхностных молекул семейства MSCRAMM, распознающих адгезивные матриксные молекулы [10]. Экспрессия этих структур кодируется генами из разных локусов ДНК. Поэтому выраженность данных признаков у разных штаммов может быть различна, что мы и наблюдали в наших экспериментах.

В оценке кластерообразования адгезированных стафилококков использовался еще один критерий — распределение отношений «количество кластеров/количество бактерий в кластере». Полученная диаграмма отражает распределение стафилококковых кластеров в зависимости от того, из скольких клеток они образованы (рис. 2). Наиболее выраженную способность к образованию кластеров проявили *S. aureus*, штамм 5983/2 и *S. aureus*, штамм 5663/2. В процессе адгезии на пластик они были способны образовывать кластеры, объединяющие по несколько сотен бактерий.

Заключение. Разработанный метод позволяет:

- 1) учитывать абсолютное количество микробных клеток на цифровом изображении микроскопического препарата;
- 2) учитывать количество кластеров с определением количества микробных клеток, из которых они состоят;
- 3) отображать распределение отношений «микроб/кластер» в виде графика.

Это свидетельствует о перспективности применения метода в количественном анализе бактериальных надклеточных структур — кластеров и биопленок.

Работа выполнялась при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ), грант №09-04-97072.

Литература

1. *Маянский А.Н.* Патогенетическая микробиология. Н. Новгород: Изд-во НГМА; 2006; 520 с.
2. *Donlan R.M., Costerton J.W.* Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 2002; 15(2): 167—193.
3. *Carpentier B., Cerf O.* Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol* 1993; 75: 499—511.
4. *Dancer S.* Keeping watch over the Staphylococcus. *J Hosp Infect* 2008; 70(4): 297—307.
5. *Luong T.T., Lei M.G., Lee C.Y.* Staphylococcus aureus Rbf activates biofilm formation in vitro and promotes virulence in a murine foreign body infection model. *Infect Immun* 2009; 77(1): 335—340.
6. *Маянский А.Н., Коликова Т.В., Маянский Н.А., Невмятуллин А.Л., Сибирякова Н.И., Зеленова Е.Г.* Феномен высокоизбирательного взаимодействия между нейтрофилами человека и стафилококком. *Иммунология* 1997; 3: 25—28.
7. *Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И.* Механизмы выживания нейтрофилов. М: Медицина; 2005; 367 с.
8. *Hansen H.N., Carneiro K., Haitjema H., De Chiffre L.* Dimensional micro and nano metrology. *CIRP Annals—Manufacturing Technology* 2006; 55(2): 721—743.
9. *Vergara-Irigaray M., Maira-Litran T., Merino N. et al.* Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the staphylococcus aureus cell surface. *Microbiology* 2008; 154(3): 865—877.
10. *Speziale P., Visai L., Rindi S. et al.* Prevention and treatment of staphylococcus biofilms. *Curr Med Chem* 2008; 15: 3185—3195.