

## БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЕ *ESCHERICHIA COLI* КАК ТРИГГЕР КАТЕТЕР-АССОЦИИРОВАННЫХ ИНФЕКЦИЙ МОЧЕВЫВОДЯЩИХ ПУТЕЙ \*

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

Ю.С. Поспелова, *филиал ООО «Централизованная клиничко-диагностическая лаборатория»*

И.Л. Масленникова, *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН*

Э.М. Старчич, *Люблинский университет*

### Для цитирования:

Кузнецова М.В., Поспелова Ю.С., Масленникова И.Л., Старчич Э.М. Биопленкообразование *Escherichia coli* как триггер катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей // Вестник Пермского федерального исследовательского центра. – 2022. – № 1. – С. 13–25. <https://doi.org/10.7242/2658-705X/2022.1.2>

Широкое применение в урологической практике биологических и искусственных материалов, на поверхности которых формируются бактериальные биопленки, повышает риск персистенции возбудителя в организме. На сегодняшний день остро стоит проблема катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей (ИМВП), которые чаще всего вызваны штаммами уропатогенной *Escherichia coli* (UPEC), как в монокультуре, так и в составе полимикробных ассоциаций с фекальной микробиотой.

Бактериальная адгезия и колонизация поверхности катетеров определяются, с одной стороны, природой полимерного материала, с другой – набором фимбриальных и афимбриальных адгезинов, а также белков наружной мембраны этиопатогенов. Прикрепление бактерий к клеткам в биотопах макроорганизма также опосредуется различными адгезинами и имеет важное значение в патогенезе ИМВП. В прикрепленных микробных сообществах создаются оптимальные условия для горизонтального переноса генов (ГПГ), кодирующих многочисленные факторы патогенности и антибиотикоустойчивости, посредством конъюгации и мобилизации. Вместе с тем конъюгативный перенос может внести дополнительную динамику в формирование биопленки за счет усиленной экспрессии факторов слипания во время передачи плазмиды.

В рамках выполнения научных проектов изучены генетические адгезионные профили уропатогенных штаммов *E. coli*, оценена их связь с адгезией с учетом типа атакуемого материала, определено влияние некоторых

\* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ и Пермского края в рамках научного проекта №19-44-590014 «Биопленкообразование *Escherichia coli* как триггер катетер-ассоциированных инфекций мочевыводящих путей» и проекта VI-RU/16-18-047 «Факторы, влияющие на конъюгативный перенос в природных бактериальных популяциях» («Factors influencing conjugation in natural bacterial strains») в рамках международного сотрудничества с Университетом Любляны.

антибактериальных препаратов на колонизацию поверхности уретральных катетеров. Кроме того, в планктоне и биопленке исследована частота передачи F-плазмиды в зависимости от биологических свойств штаммов-реципиентов: филогенетической группы, уровня иоппленкообразующей способности, лизогении, бактериоциногении и бактериоциночувствительности.

Полученные данные будут способствовать большему пониманию механизмов внутривидового взаимодействия *E. coli* в биопленках, что позволит выявить особенности и закономерности персистенции UPEC при катетер-ассоциированных ИМВП.

**Ключевые слова:** уропатогенная *Escherichia coli* (UPEC), адгезия, биопленка, уретральные катетеры, конъюгация, F-плазида.

Инфекции мочевыводящих путей (ИМВП) относятся к числу наиболее распространенных инфекционных заболеваний, которые встречаются как в амбулаторной, так и в стационарной практике во всех возрастных группах [10, 18]. Основной представитель бактериальной микрофлоры в моче больных – уропатогенные *Escherichia coli* (UPEC). Штаммы UPEC составляют до 90% бактериальных культур при ИМВП у амбулаторных пациентов и около 50% у людей, находящихся на стационарном лечении [5, 22, 29]. Распространенность ИМВП в России составляет 1 000 случаев на 100 тыс. населения в год [10]. К факторам, способствующим развитию ИМВП, относят структурные, морфологические и функциональные изменения в органах мочевыводящей системы, а также наличие катетера, который в 30–80% случаев играет роль входных ворот для госпитальных инфекций [19].

После перенесенных острых заболеваний часто формируется хронический инфекционный процесс в различных вариантах клинического течения. Например, кратковременная катетеризация пациентов с нарушением произвольного мочеиспускания может обуславливать развитие бактериемии, а длительная экспозиция катетера – простатита и мочекаменной болезни [8]. Механизмы формирования персистентных инфекций и разработка способов борьбы с ними являются одними из самых актуальных проблем современной клинической микробиологии и инфектологии.

**Генетические профили адгезии и адгезивная вариабельность уропатогенных штаммов *E. coli*** (ранее данные представлены в [3]). Уропатогенный потенциал представителей *E. coli* реализуется последовательно на этапах инфекционного процесса: адгезии, колонизации, персистенции. Представление адгезивных молекул является наиболее важной детерминантой патогенности UPEC при инициации ИМВП. Адгезины позволяют бактериям связываться с клетками-мишенями в мочевыводящих путях и избегать быстрого вымывания с потоком мочи, кроме того, первичная адгезия способствует бактериальной инвазии в клетки хозяина [30]. С целью расшифровки молекулярных механизмов адгезии и биопленкообразования, способствующих персистенции эшерихий при ИМВП, была поставлена задача изучить распространенность генетических детерминант адгезии штаммов уропатогенной *E. coli* и оценить их связь с уровнем специфической и неспецифической адгезии. Уропатогенные *E. coli* (n=33) были ранее выделены от пациентов медицинских учреждений г. Перми с ИМВП [4]. Детекцию генов адгезинов проводили с использованием праймеров и режимов амплификации, согласно рекомендациям авторов. Определение уровня неспецифической адгезии осуществляли в стеклянных пенициллиновых флаконах (гидрофильная поверхность) и в полистироловых 96-луночных плоскодонных планшетах (гидрофобная поверхность), согласно Николаеву Ю.А. [6].

Под величиной адгезии понимали количество клеток, прилипших на стенки флакона/планшета, выраженное в % от их исходного количества. Уровень специфической адгезии бактерий к эритроцитам человека (A0+) определяли по методу Брилиса В.И. с соавт. [1].

В последнее время появляется все больше данных, указывающих на то, что преимущественное связывание микроорганизма со специфичными субстратными молекулами определяется его принадлежностью к конкретному адгезивному фенотипу и обуславливает способность успешно колонизировать разные экологические ниши и вызывать патологический процесс. В большинстве работ по распространенности фимбриальных адгезин-ассоциированных генов среди уропатогенных штаммов показано двукратное снижение частот встречаемости в ряду *fimH*>*papC*>*sfaDE*, что нашло подтверждение и в нашем исследовании.

Среди исследуемых штаммов самым часто детектируемым геном адгезина был универсальный для бактерий *E. coli* *fimH* (75,76%). Вторым по распространенности оказался ген *flu*, кодирующий поверхностный антиген Ag43a (66,67%). Ген *iha*, гомолог адгезина, был обнаружен у 39,40% штаммов. В 33,33% детектировали ген Р-фимбрий *papC*.

С равной частотой (18,18%) встречались ген S-фимбрий *sfaDE*, гены нефимбриальных адгезинов *upaG* и *afa/draBC*, а также ген *yqi*, кодирующий фимбриальный адгезин, ассоциированный с группой патогенных для птиц *E. coli* (АРЕС). Ген *eaeA*, обеспечивающий адгезию и инвазию штаммов энтеропатогенной (ЕРЕС) и энтерогеморрагической (ЕНЕС) *E. coli*, не был обнаружен ни в одном из штаммов.

Среди 33 штаммов были определены 23 индивидуальных адгезивных генотипа. Из представленной выборки повторялись следующие комбинации генов: *fimH* (n=4), *fimH+flu* (n=5), *fimH+flu+iha+upaG* (n=2) и *fimH+flu+iha+papC* (n=2). В целом, моновалентный адгезивный генотип обнаружен в 6 (18,18%) случаях, два гена в любой комбинации выявлены у 7 штаммов (21,21%), три – у 3 (9,09%). Множественные гены адгезии (4 и более) детектированы в 15 (45,45%) случаях, два штамма не имели ни одного гена. 7 штаммов (21,21%) имели гены только фимбриальных адгезинов и 3 (9,09%) – только афимбриальных или белков наружной мембраны, у 21 (63,64%) штамма присутствовали одновременно гены обоих типов адгезинов. Вариативность сочетаний разных детерминант адгезии представлена на рис. 1.

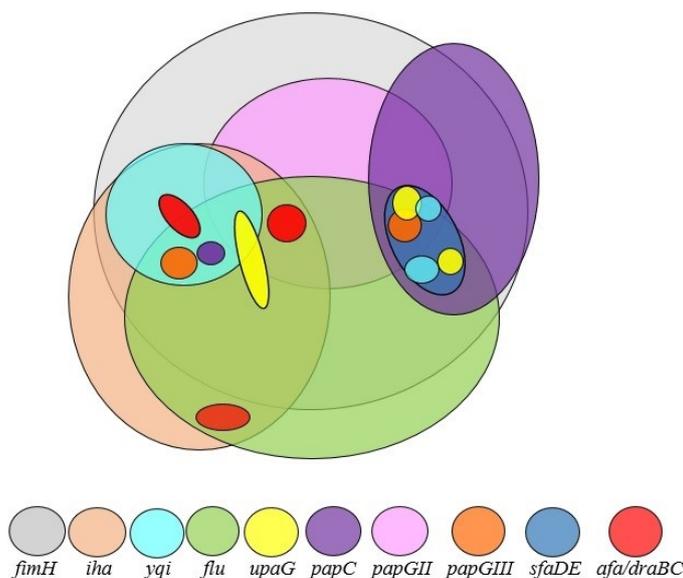


Рис. 1. Варианты комбинаций генов адгезинов среди штаммов UPEC [3]

Связь наличия генов адгезинов с уровнями специфической и неспецифической адгезии и биопленкообразования. Учитывая многообразие комбинаций генов адгезинов у исследуемых UPEC, было достаточно сложно установить достоверные связи между присутствием какого-либо гена с уровнем адгезии или биопленкообразования штаммов. Так, связи между наличием определенного гена адгезина (без учета других генов) или их комбинации, и уровнем специфической адгезии штаммов обнаружено не было. При этом были получены достоверные отличия в случае неспецифической адгезии: штаммы с профилем *fimH*<sup>+</sup> (Me[Q1–Q3] составили 2,63[1,59–4,45] vs 1,46 [0,01–2,16]), *papC*<sup>+</sup> (2,85[2,56–6,64] vs 1,72[0,99–3,28]) и *uraG*<sup>+</sup> (4,13[0,80–7,20] vs 2,28[1,48–3,25]) имели более высокий уровень адгезии к стеклу, чем штаммы без данных генов. Кроме того, генотип *papC*<sup>+</sup> (10,06[7,33–13,23] vs 3,49[1,68–8,81]) давал бактериям преимущество в прикреплении к полистиролу. Ранее в исследованиях Naves P. и соавт. (2008) показано, что у продуцентов массивных биопленок чаще встречались шесть генов, включая адгезины, ассоциированных с вирулентностью: *papC* и *papG*, *sfa/focDE*, *focG*, *hlyA* и *cnf1* [31].

Интересно, что штаммы, несущие гены только фимбриальных адгезинов, в сред-

нем имели большие показатели адгезии к стеклу и эритроцитам, в то время как штаммы с генами только афимбриальных адгезинов – к полистиролу. Тенденция к формированию более массивных биопленок на поверхности латексного катетера штаммами с положительным генетическим профилем была отмечена для всех генов, участвующих в адгезии (рис. 2).

**Формирование биопленок бактериями *E. coli* на катетерах в присутствии антибактериальных средств.** Профилактика катетер-ассоциированных инфекций ИМВП связана с техническими успехами в модификации материалов катетеров, которые предотвращают или ингибируют формирование бактериальных биопленок. Так, были разработаны уретральные катетеры с серебряным покрытием [13, 33] и катетеры, импрегнированные антибиотиками [34], тем не менее вопрос об эффективности применения антибактериальных покрытий катетеров с целью снижения риска развития бактериальных инфекций на сегодняшний день остается открытым.

Разработка новых биоцидных средств, а также модификация материалов катетеров для предотвращения формирования бактериальных биопленок на их поверхности ведутся постоянно, как и поиск новых дополнительных подходов к оценке

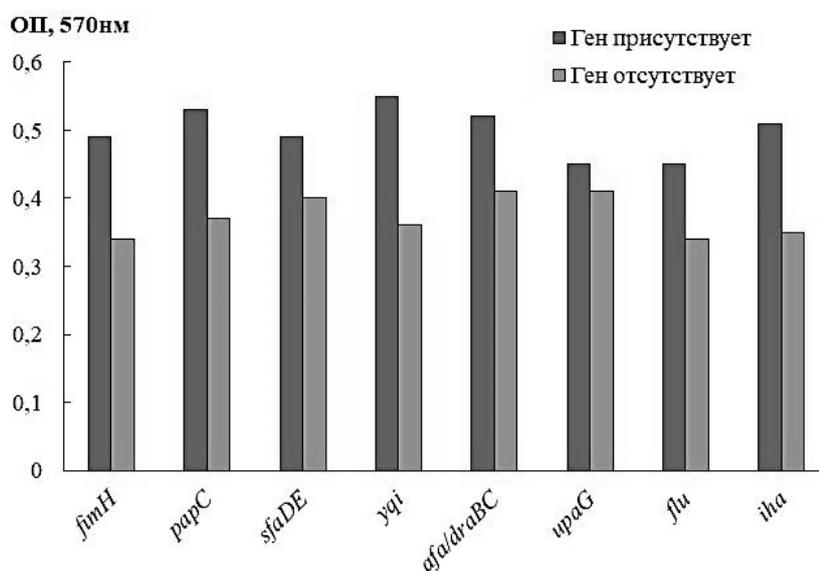


Рис. 2. Биомасса биопленок UPEC на поверхности латексного катетера

формирования и/или разрушения бактериальных биопленок. Большая часть исследований, посвященных этой проблеме, предполагает использование стандартных поверхностей для адгезии (стекла, полистирола) [32] и одного оценочного показателя (биомассы биопленки) [28]. Для выявления жизнеспособных адгезированных бактерий используют подсчет колониеобразующих единиц после ультразвуковой дезинтеграции биопленок, что не исключает гибель клеток при разрушении биопленки, а значит, не позволяет определить точное количество живых бактерий и, кроме того, увеличивает сроки получения результатов.

В ряде случаев для изучения жизнеспособности адгезированных на различных поверхностях бактерий, в том числе в биопленках, измеряют концентрацию внутриклеточной аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) после ее экстракции из клеток, но этот метод предполагает использование дорогостоящих коммерческих наборов [23]. В.К. Плакуновым и соавт. (2016) разработан универсальный метод количественной характеристики роста и метаболической активности микробных биопленок в статических моделях, позволяющий охарактеризовать рост биопленки в целом, а также синтез внеклеточного экзополисахаридного матрикса, метаболическую активность и минимальное вероятное число жизнеспособных микробных клеток в биопленке [11]. Данный метод предполагает использование фильтров из стекловолокна.

В рамках выполнения задачи по изучению влияния биоцидов на формирова-

ние биопленок бактериями *E. coli* нами был предложен новый подход к оценке колонизационной активности данных микроорганизмов. Представлялось важным провести оценку уровня адгезии и биопленкообразования бактерий на поверхности катетеров – собственно нативных инвазивных устройств, в том числе со сложной конфигурацией, где наряду с показателем массивности биопленки с помощью биолюминесценции будет определяться жизнеспособность входящих в нее клеток бактерий. В работе использовали суточные культуры люминесцентного штамма *E. coli* TG1 (pF1 lux<sup>+</sup> Ap<sup>r</sup>) [2], 4-луночные полистироловые плоскодонные планшеты и фрагменты (0,5 см) катетера Нелатона (поливинилхлорид (ПВХ), силикон, «Apexmed International BV», Нидерланды), предназначенного для однократной катетеризации мочевого пузыря. Усредненные показатели биолюминесценции (I, усл. ед) и массивности биопленки (ОП<sub>580</sub>, ед.) для варианта со средством и аналогичным в контроле сравнивали через 24 ч.

Показано, что биолюминесценция *E. coli* TG1 при экспозиции с препаратом «Хлоргексидина биглюконат» в концентрации 0,0002% была ниже на 99,7%, чем в контроле, показатель биомассы биопленки – на 97,3% (табл. 1), то есть антисептическое средство в данной концентрации ингибировало колонизацию поверхности бактериями. При использовании препарата «Ампициллина натриевой соли» (50 мкг/мл) биолюминесценция *E. coli* TG1 при экспозиции с антибиотиком снизилась только на 17,8% от кон-

Таблица 1

Оценка эффективности влияния антимикробных средств на колонизацию поверхности катетеров бактериями *E. coli* TG1 lux<sup>+</sup>

Средство	Показатель	Контроль (без средства)	Опыт (со средством)	Уровень снижения, %
Хлоргексидина биглюконат	I, усл. ед.*	2169,7±82,1	6,3±0,6	99,7
	ОП <sub>580</sub> , ед.**	0,110±0,020	0,003±0,001	97,3
Ампициллина натриевая соль	I, усл. ед.	2169,7±82,1	1782,7±145,6	17,8
	ОП <sub>580</sub> , ед.	0,110±0,020	0,15±0,03	-35,1
Серебряное покрытие катетера	I, усл. ед.	2169,7±82,1	14,0±2,0	99,3
	ОП <sub>580</sub> , ед.	0,110±0,020	0,395±0,130	-359,1%

Примечание: \*I – уровень биолюминесценции; \*\*ОП – оптическая плотность.

троля, а показатель биомассы биопленки увеличился на 35%. Оказалось, что ампициллин в данной концентрации не предотвращал (а даже стимулировал) формирование биопленки на катетере из силикона, что вполне объяснимо для штамма с Amp<sup>R</sup> фенотипом резистентности.

Наиболее информативным, на наш взгляд, этот метод будет при тестировании материалов с высокой сорбционной способностью красителя, используемого для окрашивания биопленок, не позволяющей оценить адгезивную активность бактерий по общепринятому показателю.

Так, при оценке влияния серебряного антибактериального покрытия катетера Нелатона (имплантационно-нетоксичный медицинский силикон, «Arxmed International BV», Нидерланды) показатель биомассы биопленки оценить не представлялось возможным – в контроле (катетер без напыления) он был существенно меньше, чем в опытном варианте ( $0,110 \pm 0,020$  vs  $0,395 \pm 0,13$ ), тогда как по биолюминесценции выявлено, что в опытном варианте колонизация катетера снизилась на 99,3% по сравнению с контролем (табл. 1).

**Уропатогенные штаммы *E. coli* как реципиенты в конъюгации** (ранее данные представлены в [24]). Конъюгация – прямой перенос ДНК от бактериального

донора к клетке-реципиенту играет важную роль в приобретении бактериями генов устойчивости к антибиотикам и тяжелым металлам, а также детерминант патогенности [26, 36]. Поскольку резистентность бактерий к лекарственным препаратам является одной из самых серьезных глобальных угроз для здравоохранения, интерес к конъюгации вновь возрастает. Широкий спектр биотических и абиотических факторов, включая способ роста бактерий, может влиять на эффективность внутри- и межвидового конъюгативного переноса [14, 15, 35]. Мы предположили, что штаммы, различающиеся по биологическим характеристикам, могут иметь разную скорость конъюгации в биопленке по сравнению с планктонным ростом. Кроме того, для конъюгативного переноса могут иметь значение число и состав детерминант патогенности и антибиотикоустойчивости реципиентов, а также их способность образовывать биопленки.

**Биологические свойства штаммов UPEC.** Штаммы-реципиенты были охарактеризованы по филогенетической группе, продукции бактериоцинов (бактериоциногенности), наличию бактериофага (лизогении), типу О-кора липополисахарида, способности образовывать биопленки, а также по наличию генов F-плазмиды (рис. 3).

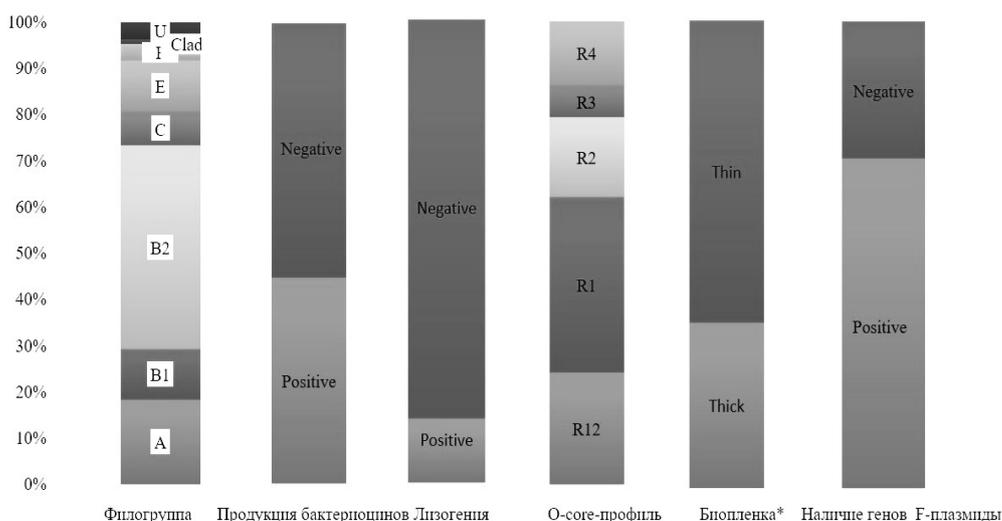


Рис. 3. Распределение штаммов согласно некоторым биологическим свойствам. «Толстая» биопленка – биомасса биопленок реципиентов >0,3 ед. ОП<sub>580</sub>; «тонкая» биопленка – биомасса биопленок реципиентов <0,3 ед. ОП<sub>580</sub>

Кроме того, оценено присутствие вирулент-ассоциированных генов и характер устойчивости штаммов к антибиотикам.

Среди изученных штаммов 12 (41,4%) относились к филогенетической группе В2, 5 (17,2%) – к филогенетической группе А, 3 (10,3%) – к группе В1, 3 (10,3%) – к группе Е, 2 (6,9%) – к группе С, по одному штамму (3,4%) к группе F и Clade I или II, при этом 2 штамма (6,9%) оказались нетипируемыми. Чаще всего (37,9%) культуры принадлежали к R1 типу кора молекулы липополисахарида (ЛПС), в 24,1% случаев – к K12 типу, в 17,2 % – к R2 типу, 13,8 % имели тип кора R4 и 6,9% – тип R3. Продукция бактериоцинов была обнаружена у 13 штаммов. Инфицирование бактериофагом выявлено только у 4 культур. Высокая биопленкообразующая способность ( $ОП_{580} > 0,3$ ) была зафиксирована у 9 штаммов (31,0%), низкое биопленкообразование ( $ОП_{580} < 0,3$ ) – у 20 (69,0%).

Среди исследованного набора генов, ассоциированных с вирулентностью, *papC* обнаружен у 10 штаммов (34,5%), *iroN* – у 8 (27,6%), *cnf*, *hlyA*, *sfaDE* и *afa/draBC* – у 6 (20,7%) и *ibeA* – только у 1 (3,4%) штамм. Ген *repB* региона репликации RepFIB обнаружен у 18 (54,54%) штаммов, а ген *repE* региона репликации RepFIA – у 14 (42,42%) штаммов. Ген *traJ* выявлен у 9 (27,27%) штаммов.

Связь биопленкообразующей способности с другими биологическими свойствами UPEC. Среди штаммов с высокой биопленкообразующей способностью преобладали культуры филогруппы В2 (55,5%),

с K12 типом кора ЛПС (44,4%), обладающие детерминантами RepFIA (66,6%) и *afa/draBC* (44,4%). С другой стороны, штаммы филогруппы В2 образовывали более толстые биопленки, чем штаммы других филогрупп (табл. 2), хотя различия не были статистически значимыми.

Наиболее массивные биопленки выявлены у штаммов с кором ЛПС R3 и K12, тогда как культуры с кором R1 и R2 формировали «тонкие» биопленки (табл. 2). Различия показателя биомассы биопленки выявлены между группами K12 и R1 типов, K12 и R4, а также между R2 и R4 типами (*U*-test:  $p=0,017$ ,  $p=0,043$ ,  $p=0,043$  соответственно). Биопленкообразующая способность бактериоцинопродуцирующих и непродуцирующих бактериоцины штаммов не различалась, хотя биомасса 24-часовых биопленок во второй группе была выше. Примечательно, что биомасса биопленок была достоверно выше в группе нелизогенных штаммов (*U*-test:  $p=0,015$ ). Одним из возможных объяснений этих данных могут быть особенности кворум-сенсинг(QS)-регуляции взаимодействия в системе фаг-хозяин, когда равновесие процессов лизогения/лизис в биопленках нарушается способностью бактериального QS влиять на индукцию профага (переход от лизогении к лизису) [21]. В соответствии с этим недавно было обнаружено, что *E. coli* ATCC 15144 содержит псевдолизогенный профаг, регуляторный белок которого дерепрессировался присутствием межвидового аутоиндуктора AI-2; при достижении определенной

Таблица 2

Биомасса биопленок штаммов UPEC с учетом некоторых биологических свойств		
	Характеристика	Биомасса биопленки, ед. $ОП_{570}$
Филогруппа	В2	0,164 (0,119-0,806)
	не В2	0,127 (0,106-0,210)
Кор олигосахарида	R1	0,111 (0,104-0,146)
	R2	0,108 (0,092-0,210)
	R3	0,619 (0,490-0,747)
	K12	0,433 (0,166-1,091)
Бактериоциногенность	продуцирующие	0,127 (0,099-0,140)
	непродуцирующие	0,186 (0,152-0,281)
Лизогения	лизогенные	0,085 (0,078-0,108)
	нелизогенные	0,152 (0,106-0,228)

Примечание. Данные представлены в виде медианы и квартилей Me(Q1-Q3).

плотности клеток AI-2 активировал экспрессию «литических» генов, способствуя лизису бактерий [25]. Кроме того, известно, что состояние высокой плотности клеток, в том числе в условиях биопленки, может способствовать повышению протектолитической активности и, как следствие, дисперсии (репрессии) биопленки [37].

Увеличение числа штаммов UPEC, обладающих антибиотикорезистентностью, наблюдается во всем мире [5, 9, 20, 22, 29]. В нашем исследовании среди штаммов UPEC наибольший уровень резистентности был зафиксирован к ципрофлоксацину (58,62% культур), цефотаксиму, цефтазидиму (44,83%), левофлоксацину (41,38%) и триметоприм-сульфаметоксазолу (31,03%). К амикацину и фурадонину были нечувствительны 3,45% и 6,89% штаммов соответственно. Нулевые показатели устойчивости определены в отношении фосфомицина и меропенема. Пять штаммов были отнесены к группе полирезистентных (устойчивость к 5 и более антибиотикам [27]), остальные культуры имели устойчивость к 1, 2, 3 или 4 препаратам.

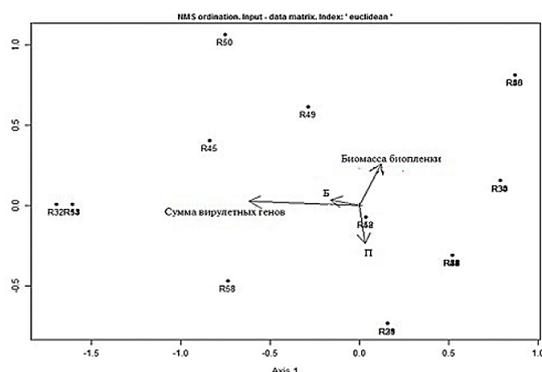
*Конъюгативный перенос в планктоне и биопленке.* Во всех экспериментах по конъюгации в качестве штамма-донора использовали штамм *E. coli* N4i pOX38:Sm [24]. Частота переноса плазмиды pOX38 в уропатогенные штаммы *E. coli* в условиях планктонного роста в течение 6 ч варьировалась от  $1,28E-05 \pm 1,03E-05$  до  $1,26E+00 \pm 2,05E-01$ . Показатели эффективности горизонтального переноса в планктоне и биопленке составили Me(Q1-Q3):  $3,54E-04(1,02E-04-1,08E-02)$  и  $1,15E-02(3,84E-04-1,43E-01)$  соответственно. Частота передачи плазмиды в штаммы UPEC была значительно выше в условиях биопленки (*W*-test:  $p=0,015$ ).

Корреляция между частотой конъюгации и биомассой смешанной (реципиент+донор) биопленки составила  $rs=-0,44$ . В связи с этим были сформированы две группы в зависимости от толщины сформированной смешанной 6-часовой биопленки. Оказалось, что эффективность

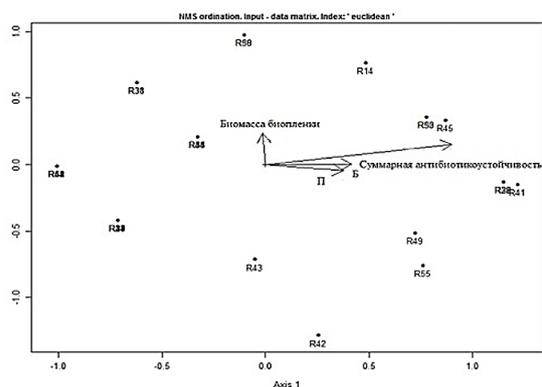
переноса плазмиды pOX38 в условиях «тонкой» биопленки (показатель ОП<0,3) выше, чем в «толстой» (ОП≥0,3) (*U*-test:  $p=0,008$ ). Учитывая, что корреляция между биомассой моновидовой биопленки реципиентов и смешанной биопленки составила  $rs=0,85$ , а эффективность переноса в двух моделях коррелировала положительно ( $rs=0,50$ ), можно предположить, что частота конъюгации зависит от такого свойства реципиентов как биопленкообразующая способность.

Использование метода многомерного неметрического шкалирования [7] показало, что более высокие частоты конъюгации в планктоне и биопленке положительно коррелируют с «суммой» генов, связанных с вирулентностью штамма-реципиента (рис. 4, а), наличием мультирезистентности к антибиотикам (рис. 4, б) и суммарной чувствительностью к бактериоцинам (рис. 4, в).

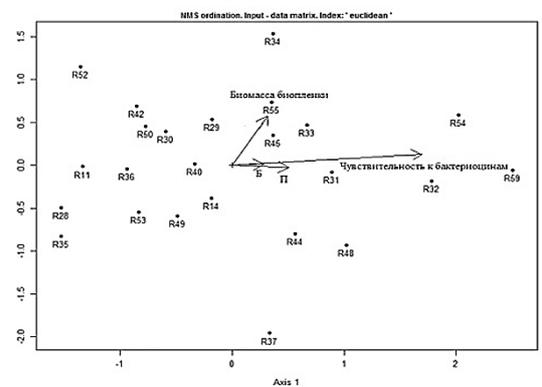
*Оценка биопленкообразующей способности жизнеспособных трансконъюгантов в сравнении с аналогичным показателем соответствующих культур-реципиентов.* Вопросы о возможном влиянии присутствия плазмиды в клетках бактерий на формирование ими биопленок активно обсуждаются в литературе. Известно, что наличие некоторых плазмид может положительно влиять на формирование биопленок микроорганизмами [15–17]. Исследование биопленкообразующей способности у жизнеспособных трансконъюгантов в сравнении с реципиентами поможет выявить, имеет ли данный феномен значение в случае производной F-плазмиды pOX38, для чего был проведен эксперимент по изучению биопленкообразования у исходных UPEC штаммов-реципиентов и этих же штаммов, получивших плазмиду pOX38. В пяти случаях биомасса биопленки трансконъюгантов была достоверно выше, а в двух случаях – ниже, чем аналогичный показатель у реципиентов. Для других пар штаммов разница была статистически недостоверной.



а



б



в

Рис. 4. Распределение UPEC штаммов на основе учета частоты конъюгации в планктоне (П) и биопленке (Б) в зависимости от суммы вирулентных генов (а), суммарной антибиотикорезистентности (б) и суммарной чувствительности к бактериоцинам (в)

В целом, показатель, характеризующий массивность биопленки, не различался в двух группах (Me(Q1-Q3), реципиенты vs трансконъюгантов): 0,137(0,100-0,199) vs 0,135(0,109-0,194) (U-test: p=0,137) (рис. 5). Таким образом, наше исследование также показало, что

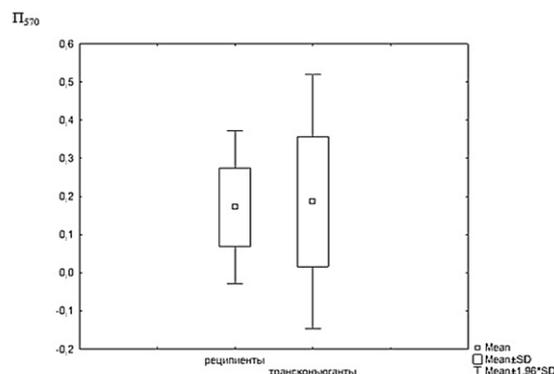


Рис. 5. Биомасса суточных биопленок реципиентов и трансконъюгантов *E. coli*

присутствие плазмиды чаще является позитивным фактором и усиливает биопленкообразующую способность бактерий, но может оказывать и противоположное действие.

### Заключение

Исследования, проведенные в рамках двух научных проектов, позволили получить данные о биологических свойствах UPEC, оценить влияние фено- и генотипических характеристик реципиента, а также природы абиотических поверхностей на биопленкообразующую способность клеток и эффективность внутривидового переноса производной F-плазмиды в условиях планктонного роста и формирующейся биопленки.

Выявлена широкая распространенность адгезин-кодирующих генов в штаммах UPEC, показано, что фимбриальные адгезины в большей степени определяли бактериальную адгезию и биопленкообразование, чем афимбриальные. Тенденция к формированию более массивных биопленок на поверхности латексного катетера штаммами с положительным генетическим профилем была отмечена для всех носителей генов, участвующих в адгезии, что подтверждает многочисленные данные о том, что эти структуры являются ключевыми факторами развития ИМВП.

Предложен способ оценки влияния антимикробных средств на бактериальную колонизацию катетеров, представлена быстрая и эффективная методика оценки

влияния различных антибактериальных средств и материалов на бактериальную колонизацию по биомассе биопленки и уровню биолюминесценции, характеризующей количество жизнеспособных клеток люминесцентного штамма *E. coli*. При частых замерах биолюминесценции способ позволяет мониторировать процессы, связанные с персистенцией бактерий в присутствии различных средств, а именно адгезию клеток (ускорение/ингибирование), скорость колонизации и формирования биопленки (замедление/усиление).

Показано, что способность к приему конъюгативных плазмид широко распространена среди клинических штаммов *E. coli*, при этом в условиях формирования

биопленки передача плазмиды происходит значительно эффективнее. Толщина биопленки играет существенную роль в частоте конъюгации, а именно, штаммы, образующие менее массивные биопленки, имели более высокую частоту переноса плазмиды. Филогенетическая группа реципиентов, наличие бактериофага, а также тип кора ЛПС не определяли данный параметр. В общем, полученные нами результаты показывают, что эволюция потенциально более патогенных штаммов посредством конъюгации зависит от способности бактерий быть «хорошими» реципиентами при конъюгативном переносе, возможно, из-за способности образовывать менее массивные биопленки.

#### Библиографический список

1. Брилис В.И., Брилен Т.А., Ленцнер Х.П. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. – 1986. – № 4. – С. 210–212.
2. Данилов, В.С., Зарубина А.П., Ерошников Г.Е., Соловьева Л.Н., Карташев Ф.В., Завильгельский Г.Б. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий // Вестник МГУ. Биология. – 2002. – № 3. – С. 20–24.
3. Кузнецова М.В., Гизатуллина Ю.С. Генетические профили адгезии и адгезивная вариабельность уропатогенных штаммов *Escherichia coli* // Инфекция и иммунитет. – 2021. – Т. 11. – №3. – С. 481–490.
4. Кузнецова М.В., Проворова С.В., Кубарев О.Г., Юдин Д.С., 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.
5. Набока Ю.Л., Алькина А.К., Коган М.И., Гудима И.А., Ибишев Х.С., Джалагония К.Т., Черницкая М.Л. Мониторинг микробиоты мочи и антибиотикорезистентности уропатогенов в одном урологическом стационаре // Вестник урологии. – 2020. – Т. 8. – №3. – С. 47–57.
6. Николаев Ю.А. Регуляция адгезии у бактерий *Pseudomonas fluorescens* под влиянием дистантных межклеточных взаимодействий // Микробиология. – 2000. – Т. 69. – № 3. – С. 356–361.
7. Новаковский А.Б. Взаимодействие Excel и статистического пакета для обработки R данных в экологии // Вестник института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН. – 2016. – №3 (197). – С. 26–33.
8. Овчинникова П.П., Богданова Т.М. Катетер-ассоциированные инфекции мочеполовых путей: зависимость течения инфекции от длительности катетеризации // Международный студенческий научный вестник. – 2018. – № 5. – С. 52.
9. Палагин И.С. и исследовательская группа «ДАРМИС-2018». Антибиотикорезистентность возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты исследования «ДАРМИС-2018» // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 21. – №2. – С. 134–146.
10. Перепанова Т.С. Федеральные клинические рекомендации-2015. Антимикробная терапия и профилактика инфекций почек, мочевыводящих путей и мужских половых органов // Терапевтический архив. – 2016. – №88(4). – С. 100–104.
11. Плакунов В.К., Мартыанов С.В., Тетенева Н.А., Журина М.В. Универсальный метод количественной характеристики роста и метаболической активности микробных биопленок в статических моделях // Микробиология. – 2016. – Т. 85. – №4. – С. 484–480.
12. Сухина М.А., Калашикова И.А., Кашиников В.Н., Веселов А.В., Михалевская В.И., Пуядина А.Ю. Влияние антибактериальных веществ на рост биопленки клинических изолятов // Колопроктология. – 2018. – №2. – С. 78–84.
13. Ahearn D.G., Grace D.T., Jennings M.J., Borazjani R.N., Boles K.J., Rose L.J., Simmons R.B., Ahanotu E.N. Effect of hydrogel/silver coating on in vitro adhesion to catheters of bacteria associated with urinary tract infections // Curr. Microbiol. – 2000. – Vol. 41. – P. 120–125.

14. *Bethke J.H., Davidovich A., Cheng L., Lopatkin A.J., Song W., Thaden J.T., Fowler V.G., Xiao M., You L.* Environmental and genetic determinants of plasmid mobility in pathogenic *Escherichia coli* // *Sci. Advances.* – 2020. – Vol. 6(4).
15. *Burmølle M., Bahl M.I., Jensen L.B., Sørensen S.J., Hansen L.H.* 1 Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains // *Microbiol.* – 2008. – Vol. 154. – P. 187–195.
16. *Dudley E.G., Abe C., Ghigo J.M., Latour-Lambert P., Hormazabal J.C., Nataro J.P.* An IncII plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces // *Infect. Immun.* – 2006. – Vol. 74. – P. 2102–2114.
17. *Ghigo J.M.* Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development // *Nature.* – 2001. – Vol. 412. – P. 442–445.
18. *Giray B., Uçar F.B., Aydemir S.Ş.* 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.
19. *Grabe M., Bartoletti R., Bjerklund Johansen T.E., Cai T., Çek M., Köves B., Naber K.G., Pickard R.S., Tenke P., Wagenlehner F., Wullt B.* Guidelines on urological infections. European Association of urology. – 2015. – 86 pp.
20. *Halaji M., Shahidi S., Atapour A., Ataei B., Feizi A., Havaei S.A.* Characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* among Iranian kidney transplant patients // *Infect. Drug. Resist.* – 2020. – Vol. 15(13). – P. 1429–1437.
21. *Høyland-Kroghsbo N.M., Mærkedahl R.B., Svenningsen S.Lo.* A quorum-sensing-induced bacteriophage defense mechanism // *MBio.* – 2013. – Vol. 19(4). – P. 1–8.
22. *Ishikawa K.* [et al.] The nationwide study of bacterial pathogens associated with urinary tract infections conducted by the Japanese Society of Chemotherapy // *J. Infect. Chemother.* – 2011. – Vol. 17. – P. 126–138.
23. *Jin Y., Samaranayake L.P., Samaranayake Y., Yip H.K.* Biofilm formation of *Candida albicans* is variably affected by saliva and dietary sugars // *Arch. Oral Biol.* – 2004. – Vol. 49(10). – P. 789–798.
24. *Kuznetsova M.V., Maslennikova I.L., Pospelova J.S., Zgur Bertok D., Starčič Erjavec M.* Differences in recipient ability of uropathogenic *Escherichia coli* strains in relation with their pathogenic potential // *Inf. Gen. Evol.* – 2022. – Vol. 97: 105160.
25. *Laganenka L., Sander T., Lagonenko A., Chen Y., Link H., Sourjik V.* Quorum sensing and metabolic state of the host control lysogeny-lysis switch of bacteriophage T1 // *MBio.* – 2019. – Vol. 10. – P. 3–8.
26. *Leungtongkam U., Thummeepak R., Tasanapak K., Siththisak S.* Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii* // *PLoS One.* – 2018. – Vol. 13(12): e0208468.
27. *Magiorakos A.-P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2012. – Vol. 18(3). – P. 268–281.
28. *Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A.* Growing and analyzing static biofilm // *Curr. Protoc. Microbiol.* – 2005. – Vol. 1: Unit-1B.1.
29. *Moges A.F., Genetu A., Mengistu G.* Antibiotic sensitivities of common bacterial pathogens in urinary tract infections at Gondar Hospital, Ethiopia // *East. Afr. Med. J.* – 2002. – Vol. 79. – P. 140–142.
30. *Mulvey M.A.* Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli* // *Cell Microbiol.* – 2002. – Vol. 4(5). – P. 257–271.
31. *Naves P., del Prado G., Huelves L., Gracia M., Ruiz V., Blanco J., Dahbi G., Blanco M., del Carmen Ponte M., Soriano F.* Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* // *Microb. Pathog.* – 2008. – Vol. 45. – P. 86–91.
32. *O'Toole G.A., Kolter R.* Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis // *Mol. Microbiol.* – 1998. – Vol. 28(3). – P. 449–461.
33. *Pickard R., Lam T., Maclennan G., Starr K., Kilonzo M., McPherson G., Gillies K., McDonald A., Walton K., Buckley B., Glazener C., Boachie C., Burr J., Norrie J., Vale L., Grant A., N'dow J.* Types of urethral catheter for reducing symptomatic urinary tract infections in hospitalised adults requiring short-term catheterisation: multicentre randomised controlled trial and economic evaluation of antimicrobial- and antiseptic-impregnated urethral catheters (the CATHETER trial) // *Health Technol. Assess.* – 2012. – Vol. 16(47). – P. 1–197.
34. *Schumm K., Lam T.B.* Types of urethral catheters for management of short-term voiding problems in hospitalized adults // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2008. – Vol. 16(2): CD004013.

35. Stalder T., Top E. Plasmid transfer in biofilms: a perspective on limitations and opportunities // NPJ Biofilms Microbiomes. – 2016. – Vol. 2:16022.
36. Sun D., Jeannot K., Xiao Y., Knapp C.W. Editorial: Horizontal gene transfer mediated bacterial antibiotic resistance // Front. Microbiol. – 2019. – Vol. 10:1933.
37. Tan D., Hansen M.F., de Carvalho L.N., Røder H.L., Burmølle M., Middelboe M., Svenningsen S.L. High cell densities favor lysogeny: induction of an H20 prophage is repressed by quorum sensing and enhances biofilm formation in *Vibrio anguillarum* // ISME J. – 2020. – Vol. 14. – P. 1731–1742.

## BIOFILM FORMATION OF *ESCHERICHIA COLI* TITLE AS A TRIGGER OF CATHETER-ASSOCIATED URINARY TRACT INFECTIONS

Kuznecova M.V.<sup>1</sup>, Pospelova J.S.<sup>2</sup>, Maslennikova I.L.<sup>1</sup>, Starčič Erjavec M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS*

<sup>2</sup>*LLC «Centralized Clinical Diagnostic Laboratory»*

<sup>3</sup>*University of Ljubljana, Slovenia*

### For citation:

Kuznecova M.V., Pospelova J.S., Maslennikova I.L., Starčič Erjavec M. Biofilm formation of *Escherichia coli* title as a trigger of catheter-associated urinary tract infections // Perm Federal Research Center Journal. – 2022. – № 1. – P. 13–25. <https://doi.org/10.7242/2658-705X/2022.1.2>

The widespread use in urological practice of biological and artificial materials, on the surface of which bacterial biofilms form, increases the risk of pathogen persistence in the human body. Nowadays, there is an acute problem of catheter-associated urinary tract infections (CAUTI), which are most commonly caused by uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains, either in monoculture and as part of polymicrobial associations with fecal microbiota.

Bacterial adhesion and colonization of the catheter surface are determined, the one hand, by the nature of the polymeric material, and, on the other hand, by a set of fimbrial and afimbrial adhesins, as well as outer membrane proteins of pathogens. Attachment of bacteria to cells in human biotopes is also mediated by various adhesins and is important in the pathogenesis of CAUTI. Optimal conditions for horizontal gene transfer (HGT), of numerous virulence-associated and antibiotic resistance factors through conjugation and mobilization are created in adhered microbial communities.

At the same time, conjugative transfer can introduce additional dynamics into biofilm formation due to increased expression of sex pili needed for plasmid transfer. As part of the implementation of scientific projects, the genetic profiles of adhesins of uropathogenic strains of *E. coli* were studied, their relationship with adhesion was assessed, considering the type of surface material, and the effect of some antibacterial drugs on the colonization of the surface of urethral catheters was determined. In addition, the frequency of F-plasmid transmission in plankton and biofilm was studied depending on the biological properties of recipient strains: the phylogenetic group, biofilm-forming ability, lysogeny, bacteriocin production, and bacteriocin sensitivity. The data obtained will contribute to a better understanding of the mechanisms of intraspecific interaction of *E. coli* in biofilms, which will allow us to identify the features and patterns of UPEC persistence in CAUTI.

*Keywords: uropathogenic Escherichia coli (UPEC), adhesion, biofilm, urethral catheters, conjugation, F-plasmid.*

### Сведения об авторах

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

## ***ИССЛЕДОВАНИЯ: ТЕОРИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТ***

---

*Поспелова Юлия Сагитовна*, ведущий биолог филиала ООО «Централизованная клиничко-диагностическая лаборатория» в Пермском крае, 614025, г. Пермь, ул. Серпуховская, 4; e-mail: gizatullina.julia@yandex.ru

*Масленникова Ирина Леонидовна*, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунорегуляции, «ИЭГМ УрО РАН»; e-mail: I.Maslennikva1974@gmail.com

*Старич Эрьявец Марьянца*, PhD, профессор, биотехнического факультета Люблянского Университета, Словения; e-mail: marjanca.starcic.erjavac@bf.uni-lj.si

*Материал поступил в редакцию 16.02.2022 г.*