

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ ПРОТИВ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, ФОРМИРУЮЩИХ МИКРОБНЫЕ БИОПЛЁНКИ

Б.И. Асланов, Л.П. Зуева, А.А. Долгий, С.Д. Конев, Т.А. Гришко

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41

### Реферат

**Введение.** В настоящее время доказано, что многие госпитальные штаммы, включая *Pseudomonas aeruginosa*, активно используют способность к биоплёнкообразованию. Актуальность проблемы борьбы с госпитальной синегнойной инфекцией с помощью химиотерапевтических препаратов активизирует необходимость поиска альтернативных противомикробных средств. Такими необходимыми средствами могут послужить бактериофаги. Для практического здравоохранения наибольшую значимость представляет возможность использования фагов с целью профилактики образования биоплёнок микробами на устройствах для инвазивных медицинских манипуляций, в частности, сосудистых и мочевых катетерах.

**Цель** — оценить эффективность высоковирулентных бактериофагов для предотвращения и разрушения биоплёнок госпитальных штаммов *P. aeruginosa*.

**Материалы и методы.** В работе были использованы 14 штаммов синегнойной палочки с высокой интенсивностью пленкообразования, полученных из клинического материала, отобранного в медицинских организациях различного профиля. Изучалась эффективность пяти высоковирулентных синегнойных бактериофагов из коллекции лаборатории молекулярной эпидемиологии и исследований бактериофагов. Профилактическое и деструктивное действие бактериофагов на биоплёнку штаммов *P. aeruginosa* оценивалось по интенсивности изменения оптической плотности на микропланшетном ридере Thermo Scientific Multiscan FC при длине волны 540 нм.

**Результаты.** В большинстве случаев профилактического (8 из 14 (57,1%)) и деструктивного (9 из 14 (64,3%)) действий бактериофаговна штаммы *P. aeruginosa* в лунках с однократным и многократным добавлением бактериофага оптическая плотность резко снижалась вначале и продолжала оставаться на низком уровне практически на всем протяжении экспериментов в течение 12 часов.

**Заключение.** Как однократное, так и многократное воздействие бактериофага на синегнойную палочку эффективно препятствует образованию микробом биоплёнки. Более позднее взаимодействие фага со штаммом *P. aeruginosa* (уже сформировавшим биоплёнку) вначале сдерживает дальнейшее образование биоплёнки, а затем эффективно способствуют деструкции уже созревших биоплёнок. Бактериофаги могут стать эффективным средством борьбы с госпитальными штаммами, способными формировать микробные биоплёнки

**Ключевые слова:** бактериофаг, *P. aeruginosa*, биоплёнка, лекарственная устойчивость, инфекция, связанная с оказанием медицинской помощи.

### Введение

Для выживания и паразитизма в организме человека и животных микробы выработали разнообразные проявления патогенного потенциала, одним из которых является формирование особой структурно-функциональной их организации, получившей название биоплёнки.

Биоплёнка (англ. biofilm) — это высокоорганизованные, подвижные, непрерывно изменяющиеся микробные сообщества, которые состоят как из активно функционирующих клеток, так и из покоящихся форм, заключенных в экзополимерный матрикс. Для большинства бактерий способность к образованию биоплёнки является важным феноменом эволюции, сформировавшимся в течение миллионов лет под действием мутаций и естественного отбора [2, 8].

Бактериальные инфекционные заболевания, в том числе инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), представляют собой актуальную проблему современного здравоохранения за счет широкого распространения в популяциях людей. Часто возбудителями ИСМП являются

госпитальные штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, сформировавшиеся в условиях медицинских организаций и способные к образованию биоплёнок [3,5]. Процессы формирования госпитальных штаммов микробов различных видов, в том числе *P. aeruginosa*, в современный период происходят интенсивно в силу специфики организации лечебного процесса и нерационального применения антимикробных средств [6].

Актуальность проблемы борьбы с госпитальной синегнойной инфекцией с помощью химиотерапевтических препаратов побуждает проводить поиск альтернативных противомикробных средств [1]. В связи с этим возрождается интерес к применению высоковирулентных бактериофагов. Бактериофаги являются вирусами бактерий. Высоковирулентные бактериофаги избирательно уничтожают бактерий гомологичного вида [1, 3, 6].

Процессы формирования бактериальными сообществами биоплёнок, приводящие к увеличению патогенного потенциала микробов и дополнительному увеличению их антибиотикорезистентности,

актуализируют рассмотрение варианта использования бактериофагов как препаратов, подавляющих биоплёнообразование [4, 7].

К настоящему времени эффективность бактериофагов против формирования биоплёнок микробами была подтверждена рядом исследований [4, 6, 7, 8]. Наибольшую значимость для практического здравоохранения представляет возможность использования фагов для профилактики образования биоплёнок микробами на устройствах для инвазивных медицинских манипуляций, в частности, сосудистых и мочевых катетерах [7].

**Цель исследования:** оценить эффективность высоковирулентных бактериофагов для предотвращения и разрушения биоплёнок госпитальных штаммов *P. aeruginosa*.

#### Материалы и методы

В работе были использованы 14 штаммов синегнойной палочки с высокой интенсивностью пленкообразования, полученных из клинического материала, отобранного в ряде медицинских организаций различного профиля: урологических, травматологических, хирургических, онкологических, ожоговых стационарах, отделениях реанимации новорожденных.

Изучалась эффективность пяти высоковирулентных синегнойных бактериофагов из коллекции лаборатории молекулярной эпидемиологии и исследований бактериофагов. Интенсивность пленкообразования оценивали, измеряя оптическую плотность (ОП) на микропланшетном ридере Thermo Scientific Multiscan FC при длине волны 540 нм.

Для оценки профилактического действия каждую культуру вносили в 7 лунок 96-луночного планшета с питательным бульоном. В первую (контрольную) лунку, содержащую только культуру *P. aeruginosa*, вносили физиологический раствор через 3, 6 и 9 часов. Вторая (контрольная) лунка содержала только культуру *P. aeruginosa*. В третью лунку бактериофаг был внесен одновременно с культурой, затем через 3, 6 и 9 часов. В четвертую лунку одновременно с внесением культуры *P. aeruginosa* был однократно добавлен бактериофаг. В остальные лунки фаг добавлялся однократно: в пятую — через 3 часа, в шестую — через 6, в седьмую — через 9 часов после начала эксперимента. ОП оценивалась каждые три часа.

Для оценки деструктивного действия на заранее сформированные в 96-луночном планшете 5-суточные биоплёнки *P. aeruginosa* 14 различных штаммов воздействовали определенным бактериофагом. В первую (контрольную) лунку добавляли сахарный бульон в начале, через 3, 6 и 9 часов. Во вторую вносили бактериофаг в начале, через 3, 6 и 9 часов. В третью (контрольную) лунку изначально добавлялся сахарный бульон после чего оценивалась ОП через 3, 6, 9 и 12 часов. В четвертую лунку изначально добавлялся бактериофаг и оценивалась ОП через 3, 6, 9 и 12 часов.

После заключительного измерения биоплотности все использованные лунки обоих 96-ти луночных планшетов окрашивались по следующей методике. В начале из лунок с помощью дозатора удалялась жидкая часть, после эти лунки заливались спиртом 175 мкл (96% этанолом) на 15 минут, затем спирт удаляли с помощью дозатора, давали план-

шетам подсохнуть, после чего в эти же лунки добавляли по 175 мкл красителя (водный фуксин 0,1%) на 15 минут, далее оба планшета промывали под струей дистиллированной воды, давали планшетам подсохнуть и вносили по 180 мкл 33% уксусной кислоты, выдерживали 20 минут и измеряли биологическую плотность на микропланшетном ридере.

Забор клинического материала от пациентов для бактериологического исследования производился согласно МУ 4.2.2039-05.4.2 «Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории».

Видовую идентификацию возбудителей ИСМП осуществляли согласно общепринятым методам бактериологического исследования.

#### Результаты и их обсуждение

Профилактическое действие бактериофагов на процессы пленкообразования штаммов *P. Aeruginosa* оценивалось после одновременного начала культивирования микроба и фага в сахарном бульоне.

В ходе данного исследования было установлено, что в большинстве случаев (57,1%, 8 из 14 штаммов), оптическая плотность (ОП) в лунке с однократным добавлением фага осталась практически неизменной на всем протяжении эксперимента в течение 12 часов. Такой же эффект отмечался и в лунке с добавлением фага в начале эксперимента, а также через каждые три часа. В остальных лунках выросшая к моменту добавления фага ОП оставалась неизменной к концу эксперимента. В контрольных лунках через 12 часов наблюдался рост ОП в несколько раз выше, чем в лунках с внесением бактериофага. Было отмечено, что в 42,9% случаев (6 из 14 штаммов) профилактическое действие бактериофага на процесс формирования биопленок было выражено слабо либо не выражено совсем. Данный вопрос требует дальнейшего изучения. Вероятно, это связано с литическими характеристиками использованных в эксперименте фагов и следует оценить действие других вирулентных фагов.

На примере культуры 10Ps показано, что ОП в лунке с однократным добавлением фага осталась практически неизменной на всем протяжении эксперимента в течение 12 часов (рисунок 1). Такой же эффект отмечался и в лунке с добавлением фага в начале, а также через каждые три часа. В контрольных лунках через 12 часов наблюдался рост ОП в несколько раз выше, чем в лунках с добавлением бактериофага.

Эта часть эксперимента позволила констатировать, что и однократное, и многократное добавление фага эффективно предотвращает образование биоплёнки. Рост *P. aeruginosa* без подавления бактериофагом сопровождается быстрым формированием биоплёнки.

Деструктивное действие бактериофагов оценивалось при добавлении бактериофага к культурам *P. aeruginosa*, уже сформировавшим биоплёнки. Результаты работы показали, что в большинстве случаев (64,3%, 9 из 14 штаммов) в лунках с однократным и многократным добавлением бактериофага ОП резко снижалась вначале и продолжала оставаться на низком уровне практически на всем протяжении эксперимента в течение 12 часов. В контрольных лунках через 12 часов наблюдался рост ОП в несколько раз выше, чем в лунках с бактериофагом.

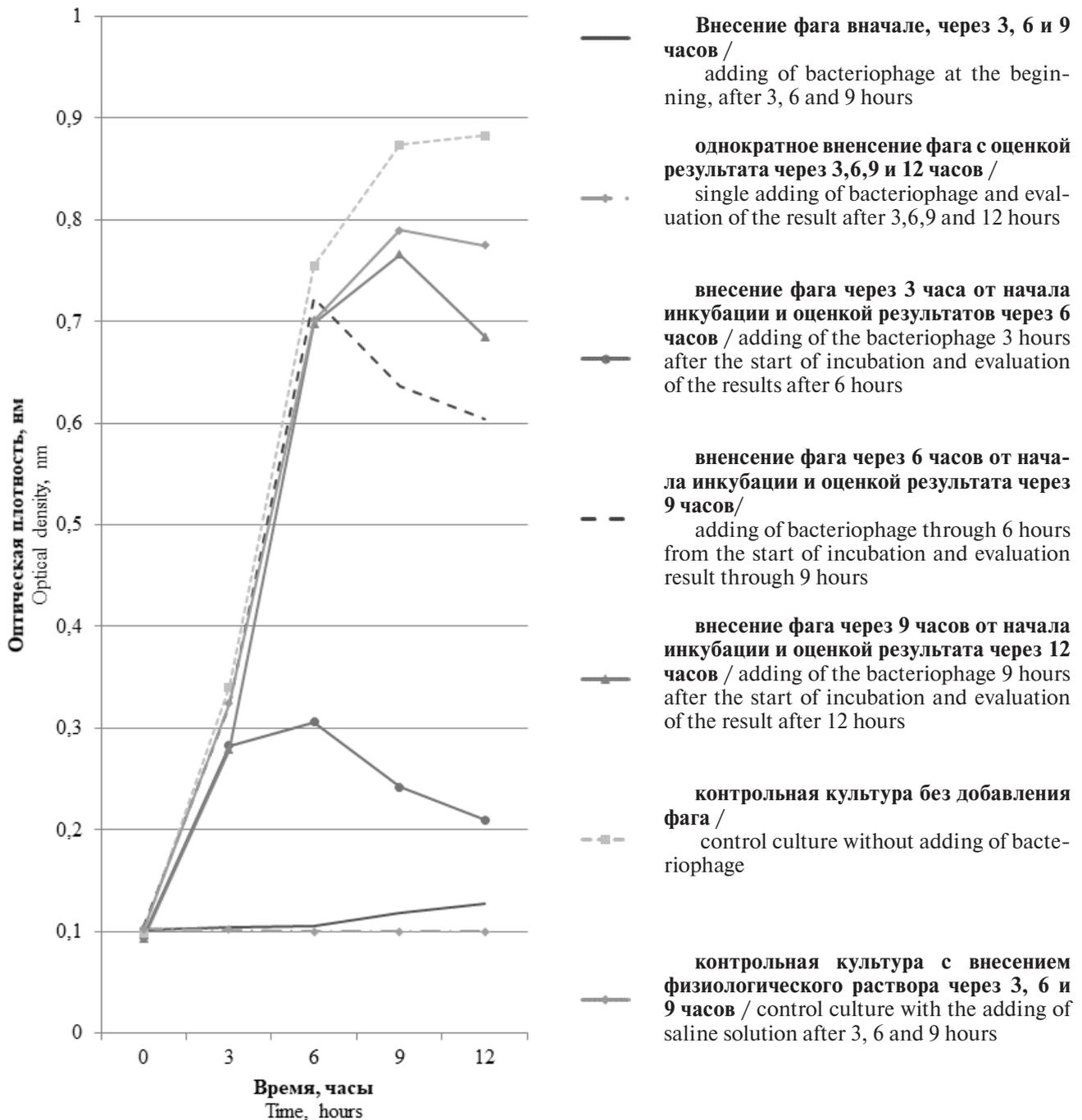


Рисунок 1. Предотвращение формирования биопленки под воздействием бактериофага: изменение оптической плотности штамма *P.aeruginosa* 10Ps

Figure 1. Preventive effect of bacteriophage on biofilm: changes of optical density of *P.aeruginosa* 10 Ps

На примере культуры 10Ps показано, что ОП в лунках с однократным и многократным добавлением бактериофага резко снижается вначале и продолжает оставаться на низком уровне практически на всем протяжении эксперимента в течение 12 часов. В контрольных лунках через 12 часов наблюдался рост ОП в несколько раз выше, чем в лунках с добавлением бактериофага (рисунок 2).

Отметим, что более позднее взаимодействие фага со штаммом *P. aeruginosa* сдерживает нарастание пленкообразования. Рост *P. aeruginosa* без подавления бактериофагом происходит с бы-

стрым формированием биопленки. Мы видим, что однократное и многократное добавление бактериофага, помимо профилактического действия, эффективно способствует деструкции уже сформированных биопленок синегнойной палочки.

В ходе этой части эксперимента было отмечено, что в 35,7% случаях (5 из 14 штаммов) деструктивное действие бактериофага было выражено слабо либо не выражено совсем. Вероятно, в отношении этих устойчивых биопленок необходимо оценить действие других вирулентных фагов.

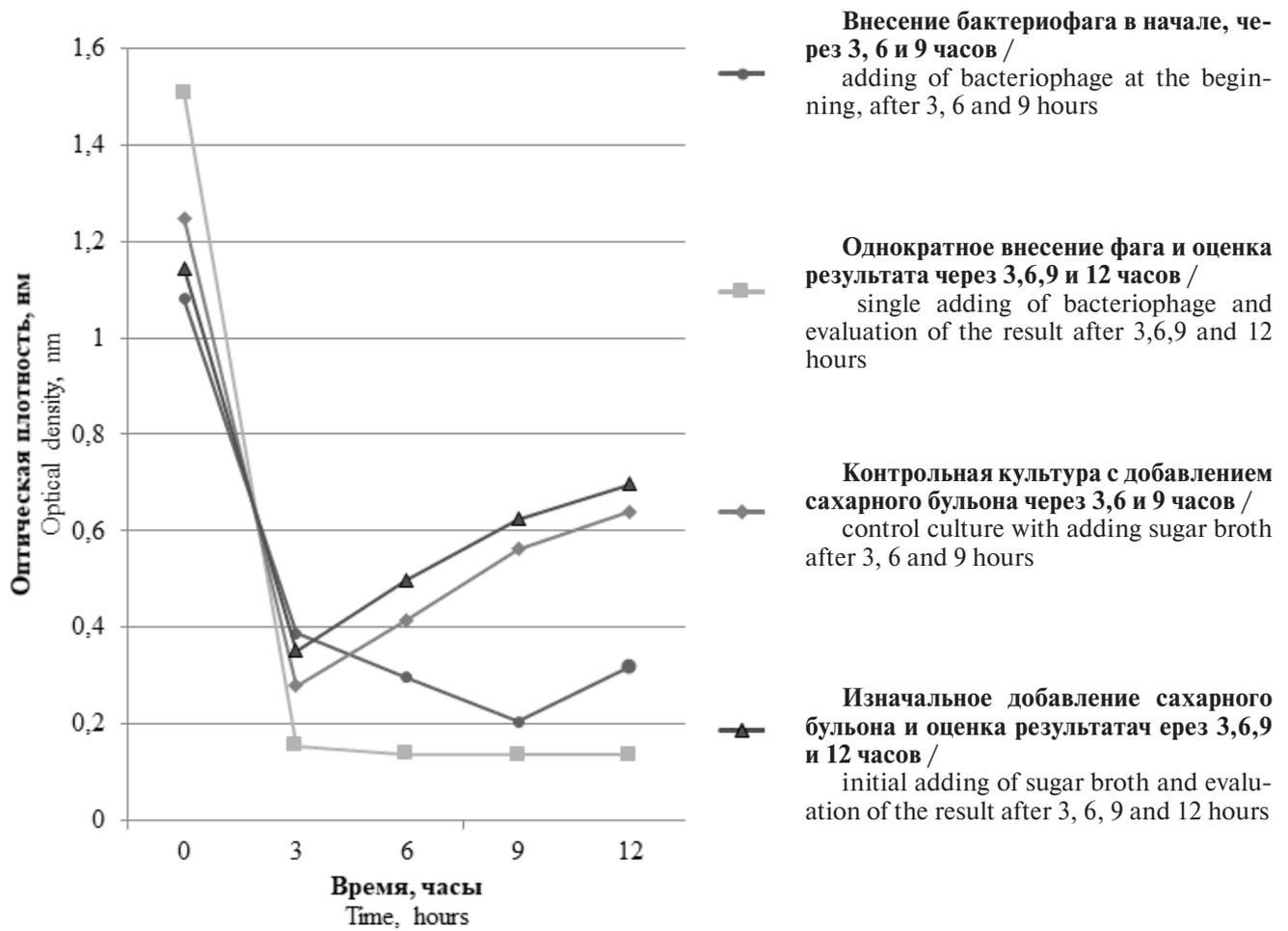


Рисунок 2. Деструкция сформированной биопленки под воздействием бактериофага: изменение оптической плотности биопленки *P.aeruginosa* 10Ps

Figure 2. Destructive effect of bacteriophage on biofilm: changes of optical density of *P.aeruginosa* 10Ps biofilm

### Заключение

Проведенный эксперимент показал, что как однократное, так и многократное воздействие бактериофага на синегнойную палочку эффективно препятствует образованию микробом биоплёнки. Более позднее взаимодействие фага со штаммом *P. aeruginosa* (уже сформировавшим биоплёнку) в начале сдерживает дальнейшее образование биоплёнки, а затем эффективно способствуют деструкции созревшей биоплёнки. В то же время рост *P.aeruginosa* на питательной среде без подавления бактериофагом способствует быстрому формированию биоплёнки.

Таким образом, результаты данной работы позволяют позитивно оценить перспективы применения вирулентных бактериофагов против полирезистентных госпитальных штаммов *P. aeruginosa*, вызывающих ИСМП и способных к формированию биоплёнок. Вероятно, бактериофаги могут стать эффективным средством борьбы и с госпитальными штаммами микроорганизмов других видов, способных формировать микробные биоплёнки (таких как *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*).

### Список литературы / References

1. Зуева Л.П. Современный взгляд на роль бактериофагов в эволюции госпитальных штаммов и профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи / Л.П. Зуева, Б.И. Асланов, В.Г. Акимкин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2014. № 3. С. 100–107. [Zueva L.P. Contemporary view on the role of bacteriophages in evolution of nosocomial strains and prophylaxis of healthcare associated infections/ L.P. Zueva, B.I. Aslanov, V.G. Akimkin // Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology. 2014, no. 3, pp. 100-104. (In Russian).
2. Лямин А.В. Проблемы в медицине, связанные с бактериальными биопленками / А.В. Лямин, Е.А. Боткин, А.В. Жестков // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012. № 4. С. 268–274. [Lyamin A.V. Medical Problems Associated with Bacterial Biofilms / A.V. Lyamin, E.A. Botkin, A.V. Zhestkov // Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.- 2012, no. 4, pp. 268-274 (In Russian).

3. Ульянов В.Ю. Способность госпитальных штаммов *Ps. Aeruginosa* к пленкообразованию / В.Ю. Ульянов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012. № 2. С. 52. [Ulyanov V.U. The ability of *Ps. Aeruginosa* hospitals strains to bi of ilmformation / V.U. Ulyanov // Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy. 2012, no. 2, pp. 52 (In Russian).

4. Azeredo J. The use of phages for the removal of infectious biofilms / J. Azeredo, I.W. Sutherland // Curr. Pharm. Biotechnol., 2008, Vol. 9, № 4, pp. 261–266. DOI: 10.2174/138920108785161604.

5. Big Impact of the Tiny: Bacteriophage–Bacteria Interactions in Biofilms / M.F Hansen, S.L. Svenningsen, H.L. Røder, M. Middelboe, M. Burmølle // Trends in Microbiology, 2019, Vol. 27, № 9, pp. 739–752. DOI: 10.1016/j.tim.2019.04.006.

6. Chen L. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies / L. Chen, Y.M. Wen // Int. J. Oral. Sci, 2011, Vol. 3, № 2, pp. 66–73. DOI: 10.4248/IJOS11022.

7. Lehman S.M. Bacteriophage-mediated control of a two-species biofilm formed by microorganisms causing catheter-associated urinary tract infections in an in vitro urinary catheter model / S.M Lehman, R.M. Donlan // Antimicrob Agents Chemother, 2015, Vol. 59, № 2, pp. 1127–1137. DOI: 10.1128/AAC.03786-14.

8. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy / Fairoz Al-Wrafiy, E. Brzozowska, S. Górska [et al.] // Postepy Hig Med Dosw, 2016, Vol. 70, pp. 78–91. DOI: 10.5604/01.3001.0010.3792.

#### Сведения об авторах:

*Асланов Батырбек Исмелович* – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии. Россия, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д.41, Тел.:8(812)543-13-21. E-mail: Batyrbek.Aslanov@szgmu.ru.

*Зуева Людмила Павловна* – заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии. Россия, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д.41, Тел.:8(812)543-13-21. E-mail: Lyudmila.Zueva@szgmu.ru.

*Долгий Алексей Алексеевич* – кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии. Россия, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д.41, Тел.:8(812)543-13-21. E-mail: Aleksei.Dolgiy@szgmu.ru.

*Конев Сергей Дмитриевич* – ординатор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии. Россия, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д.41, Тел.:8(812)543-13-21. E-mail: champofasia@mail.ru.

*Гришко Трофим Александрович* – ординатор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии. Россия, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д.41, Тел.:8(812)543-13-21. E-mail: troshka\_93@mail.ru.

Материал поступил в редакцию 05.10.2020

*Асланов Б.И., Зуева Л.П., Долгий А.А., Конев С.Д., Гришко Т.А. Эффективность применения бактериофагов против штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, формирующих микробные биоплёнки // Профилактическая и клиническая медицина. — 2020. — № 4 (77). — С. 40–45. DOI: 10.47843/2074-9120\_2020\_4\_40*

## EFFICACY OF BACTERIOPHAGES AGAINST PSEUDOMONAS AERUGINOSA BIOFILMS

B.I. Aslanov, L.P. Zueva, A.A. Dolgiy, S.D. Konev, T.A. Grishko

North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Russia, 191015, Saint-Petersburg, Kirochnaya Street, 41

### Abstract

**Introduction.** It has been proved that many hospital strains, including *Pseudomonas aeruginosa*, actively use the ability to biofilm formation. The urgency of the problem of antibiotic resistance of hospital acquired *P. aeruginosa* infection generates the need for alternative antimicrobial agents. Bacteriophages could serve as an effective antimicrobial. The use of phages to prevent the biofilm formation on invasive devices, in particular on vascular and urinary catheters, is of the great importance.

**Aim of the study** was to evaluate the efficacy of virulent bacteriophages for the prevention and destruction of biofilms formation by *P. aeruginosa* hospital strains.

**Materials and methods.** In were used 14 strains of *P. aeruginosa* with a high ability of biofilm formation, obtained from different hospitals. The efficacy of five virulent *P. aeruginosa* bacteriophages from the collection of the laboratory of molecular epidemiology and bacteriophage research was studied. The preventive and destructive activity of bacteriophages on *P. aeruginosa* biofilms was assessed by evaluation of biofilm optical density.

**Results.** In most cases of preventive (8 of 14 strains (57.1%)) and destructive (9 of 14 strains (64.3%)) application of bacteriophages on *P. aeruginosa* biofilms (both single and multiple exposition) the optical density sharply decreased at the beginning and continued to remain at a low level for the entire duration of the experiments for 12 hours.

**Conclusion.** Both single and multiple exposure of the bacteriophage to *P. aeruginosa* effectively prevents the biofilm formation. The application of the phages on the already formed biofilms effectively promotes their destruction. The study has shown that bacteriophages may be effective in the prevention and destruction of microbial biofilms.

**Key words:** bacteriophage, *P. aeruginosa*, biofilm, antibiotic resistance, health-care associated infection

### Information about authors:

*Batyrbek I. Aslanov* — D.Sc., 191015, Saint-Petersburg, Kirochnaya str., 41. Phone.: 8(812)543-13-21. E-mail: Batyrbek.Aslanov@szgmu.ru (Corresponding author).

*Ljudmila P. Zueva* — Honored Scientist of the Russian Federation, D.Sc. 191015, Saint-Petersburg, Kirochnaya str., 41. Phone.: 8(812)543-13-21. E-mail: Lyudmila.Zueva@szgmu.ru.

*Aleksey A. Dolgiy* — PhD, 191015, Saint-Petersburg, Kirochnaya str., 41. Phone.: 8(812)543-13-21. E-mail: Aleksei.Dolgiy@szgmu.ru.

*Sergey D. Konev* — Resident of Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology, 191015, Saint-Petersburg, Kirochnaya str., 41. Phone.: 8(812)543-13-21. E-mail: champofasia@mail.ru.

*Trofim A. Grishko* — Resident of Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology, 191015, Saint-Petersburg, Kirochnaya str., 41. Phone.: 8(812)543-13-21. E-mail: troshka\_93@mail.ru.

Accepted 05.10.2020

*Aslanov B.I., Zueva L.P., Dolgiy A.A., Konev S.D., Grishko T.A. Efficacy of bacteriophages against Pseudomonas aeruginosa biofilms // Preventive and clinical medicine. — 2020. — No 4 (77). — P. 40–45 (in Russian). DOI: 10.47843/2074-9120\_2020\_4\_40.eng*