

их защитный эффект: в концентрации 5 мкг/мл и выше антитела полностью подавляли развитие ЦПД от заражающей дозы вируса ЕЗ в течение 5 суток; в концентрации 2,5 мкг/мл и выше антитела полностью подавляли развитие ЦПД от заражающей дозы *daf+* и *daf-* клонов Е11 в течение 5 суток. В положительном контроле 100% ЦПД соответствующих вирусов наблюдалось на 2-е сутки. Инфицирующая доза вируса CVB5, использовавшегося в качестве отрицательного контроля, вызвала 100% ЦПД на 2-сутки как без антител к FcRn, так и при добавлении антител в возрастающих концентрациях вплоть до 10 мкг/мл.

Выводы:

1. Механизм защитного эффекта альбумина при заражении культуры клеток RD эховирусами обусловлен конкуренцией эховирусов и альбумина за один и тот же клеточный рецептор.

2. Независимость проявления защитного эффекта альбумина и защитного эффекта антител к FcRn от типа эховирусов и от различий в их способности к взаимодействию с первичным клеточным рецептором DAF, подтверждает роль FcRn в качестве общего клеточного рецептора для эховирусов.

Список литературы:

1. Bergelson J.M. Picornavirus entry. / Bergelson J.M., Coyne C.B. // Adv. Exp. Med. Biol. – 2013. – V.790. – P.24-41.

2. Mbida A.D. Monoclonal antibody specific for the cellular receptor of echoviruses. / Mbida A.D., Gaudin O.G., Sabido O., Pozzetto B., Le Bihan J.C. // Intervirology. – 1992. – V.33. – № 1. – P.17-22.

3. Novoselov A.V. A single amino acid substitution controls DAF-dependent phenotype of echovirus 11 in rhabdomyosarcoma cells. / Novoselov A.V., Rezaikin A.V., Sergeev A.G., Fadeyev F.A., Grigoryeva J.V., Sokolova Z.I. // Virus Res. – 2012. – V.166. – № 1-2. – P.87–96.

4. Ward T. Role for beta2-microglobulin in echovirus infection of rhabdomyosarcoma cells. / Ward T., Powell R.M., Pipkin P.A., Evans D.J., Minor P.D., Almond J.W. // J. Virol. – 1998. – V.72. – № 7. – P.5360–5365.

5. Ward T. Serum albumin inhibits echovirus 7 uncoating. / Ward T., Powell R.M., Evans D.J., Almond J.W. // J. Gen. Virol. – 1999. – V.80. – № 2. – P.283–290.

УДК 57.083.13

Устинова Д.В., Вечтомова Е.В., Зорников Д.Л.

Отработка методики культивирования бактериальных биопленок

Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии
Уральский государственный медицинский университет
Екатеринбург, Российская Федерация

Ustinova D.V., Vechtomova E.V., Zornikov D.L.

Adaptation of the method for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* biofilm cultivation

Department of microbiology, virology and immunology
Ural state medical university
Yekaterinburg, Russian Federation

Email: ustinova-d@mail.ru, vechtomova199913@gmail.com

Аннотация. В ходе исследования были получены биопленки культур *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* ATCC 25923 на планшетах для иммуноферментного анализа. Для определения факта и степени биопленкообразования исследуемых штаммов был адаптирован ранее разработанный протокол, основанный на измерении оптической плотности экстрагированного из биопленки красителя. В ходе эксперимента установлено, что культура *E. coli* ATCC 25922 обладает большей способностью к биопленкообразованию, чем культура *S. aureus* ATCC 25923 при культивировании в статических аэробных условиях в течение 24 часов.

Annotation. The *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 25923 biofilms were established on 96-well flat-bottom microtiter plate. For measurement of biofilm formation we adapted the previously described protocol based on the optical density assay of dye extracted from the biofilm. We found out that *E. coli* ATCC 25922 had formed thicker biofilms than *S. aureus* ATCC 25923 while they were cultivated in Beef Extract Broth under static aerobic conditions for 24 hours.

Ключевые слова: культивирование биопленок, оптическая плотность, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Key words: biofilms cultivation, optical density, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Введение

Вплоть до конца прошлого века микробиология развивалась главным образом на основе исследований чистых культур микроорганизмов. Однако в конце 90-х годов 20-го века было установлено, что большинство бактерий способны формировать биопленки – микробные сообщества, состоящие из плотно прикрепленных друг к другу клеток, заключенных во внеклеточный полисахаридный матрикс [1].

При этом критическое значение имеет изменение биологических свойств бактерий в биопленках, которое приводит к возрастанию их патогенного потенциала за счет недоступности в этом состоянии для факторов иммунной системы организма, а также к снижению чувствительности ко многим лекарственным препаратам [2, 5].

Способностью бактерий расти в виде биопленок на поверхностях кожных покровов и слизистых оболочек объясняется хроническое и рецидивирующее течение многих инфекций человека [3, 6].

Следовательно, весьма актуальным вопросом является изучение биологических свойств, устойчивости к дезинфектантам, антисептикам, антибиотикам бактерий внутри биопленки. Однако для этого необходимо располагать доступной и воспроизводимой моделью для культивирования бактериальных биопленок.

Цель исследования – отработать методику культивирования бактериальных биопленок на 96-луночном планшете для иммуноферментного анализа.

Материалы и методы исследования

Исследование проводили на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Уральского государственного медицинского университета.

В исследовании использовали музейные культуры *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* ATCC 25923. Для культивирования данных бактерий использовали мясо-пептонный бульон. Суточные бульонные культуры с помощью стерильного физиологического раствора доводили до концентрации 10^5 КОЕ/мл. Затем по 100 μ л взвеси каждого микроорганизма вносили в 6 лунок стерильного 96-луночного планшета для иммуноферментного анализа. В качестве контроля была взята стерильная питательная среда, которую также вносили в 6 лунок.

После этого планшет с содержимым инкубировали в аэробных условиях при температуре 37°C в течение 24 часов. Затем для визуализации бактериальных биопленок использовали ранее предложенный протокол [4] с некоторыми модификациями. Последовательность действий указана ниже:

1. Резким движением перевернуть планшет для освобождения лунок от питательной среды;
2. Внести в лунки по 200 μ л стерильного физиологического раствора для отмывания остатков питательной среды и планктонных бактерий;
3. Резким движением перевернуть планшет для освобождения лунок от промывочного физиологического раствора;
4. Зафиксировать адсорбированные на дне лунок бактерии в течение 20 минут 250 μ л 95% раствора этилового спирта;
5. Резким движением перевернуть планшет для освобождения лунок планшета от спирта;
6. Внести в лунки по 200 μ л раствора карболового фуксина Циля для окрашивания зафиксированных на дне лунок бактерий и выдержать экспозицию в 5 минут;
7. Резким движением перевернуть планшет для освобождения лунок планшета от красителя;
8. Трижды промыть лунки планшета 200 μ л стерильного физиологического раствора для удаления несвязавшегося красителя;
9. Внести в лунки по 200 μ л 95% раствора этилового спирта для экстрагирования красителя;
10. Измерить оптическую плотность на планшетном фотометре при длине волны 490 нм.

Увеличение показателя оптической плотности экстрагированного красителя в лунках, где находились исследуемые культуры, по отношению к контролю расценивали как наличие биопленки. В качестве контроля был взят показатель оптической плотности экстрагированного красителя в лунках, на время инкубирования заполненных стерильной питательной средой. Измерение проводили с помощью универсального автоматического фотометра BioTek ELx800 (BioTek Instruments, Inc., USA).

Для каждой исследуемой культуры и контрольного образца рассчитывали средний показатель оптической плотности (медиана) по 6 измерениям. Сравнение средних показателей оптической плотности каждой исследуемой культуры с контролем проводили с помощью критерия Манна-Уитни в программе IBM SPSS 20.0. Различия интерпретировали как достоверные при значениях $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

После 24 часов инкубирования в аэробных условиях рост исследуемых культур отмечали во всех лунках. Среда в контрольных лунках осталась прозрачной. После подготовки в соответствии с представленным в материалах и методах протоколом измерили оптическую плотность экстрагированного красителя в опытных и контрольных лунках. Полученные значения представлены в таблице 1.

Значение оптической плотности в лунках с *E. coli* достоверно превышало значение оптической плотности в лунках с контролем (0,448 против 0,127; $p = 0,004$). Показатель оптической плотности в лунках с *S. aureus* также статистически значимо был выше, чем в контрольном образце (0,250 против 0,127; $p = 0,010$). Более высокие показатели оптической плотности в исследуемых лунках свидетельствуют об образовании биопленок, бактерии из которых не были удалены в процессе промывания.

При этом среднее значение оптической плотности красителя в лунках с *E. coli* примерно в два раза превышало аналогичное для лунок с *S. aureus* (0,448 против 0,250; $p = 0,006$). Данный факт позволяет утверждать, что способность к биопленкообразованию у данного штамма *E. coli* превышает таковую у исследуемого штамма *S. aureus* при использованных условиях культивирования.

Таблица 1. Значение оптической плотности экстрагированного красителя в лунках с исследуемыми культурами и в контрольных лунках.

	Оптическая плотность			Достоверность
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Контроль	
1	2	3	4	5
Лунка 1	0,415	0,138	0,112	$p_{2-4} = 0,004$
Лунка 2	0,475	0,206	0,111	$p_{3-4} = 0,010$
Лунка 3	0,572	0,214	0,127	$p_{2-3} = 0,006$
Лунка 4	0,497	0,341	0,140	

Лунка 5	0,421	0,303	0,153	
Лунка 6	0,309	0,286	0,127	
Медиана	0,448	0,250	0,127	

Выводы:

1. Статический метод культивирования с использованием пластикового планшета для ИФА позволяет с минимальными материальными затратами в течение 24 часов получить биопленки *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* ATCC 25923.

2. Предложенный алгоритм визуализации биопленок и измерения степени биопленкообразования может быть использован для культур *E. coli* ATCC 25922 и *S. aureus* ATCC 25923.

3. У *E. coli* ATCC 25922 отмечали большую степень биопленкообразования, чем у *S. aureus* ATCC 25923 при использованных условиях культивирования.

Список литературы:

1. Мелешкин Н.С. Биопленка как форма существования микроорганизмов. Действие факторов иммунной системы // Международный студенческий научный вестник. – 2017. – №2. - С. 32.

2. Шварц Т.А. Биопленки как микробное сообщество // Вестник Курганского университета. Серия Естественные науки. – 2015. - №35. - С. 41-44.

3. Attinger C., Wolcott R. Clinically addressing biofilm in chronic wounds. Adv. Wound Care. – 2012. - №1. – P. 127–132.

4. Luciana C.G. Optimization of cultivation conditions for *E. coli* biofilm formation in microtiter plates. Dissertation for Master's degree in Bioengineering Supervised by Professor Filipe Mergulhão / Department of Chemical Engineering Faculty of Engineering, Porto University. - July 2011. – P. 99.

5. Rogers S.A., Huigens R.W.III, Cavanagh J., Melander C. Synergistic effects between conventional antibiotics and 2-aminoimidazole-derived antibiofilm agents / Antimicrob. Agents Chemother. – 2010. – №54. - P. 2112–2118.

6. Romling U., Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies / J. Intern. Med. – 2012. - №272. – P. 541–561.

УДК 61:001.89

Шарабрин С.В., Усольцева П.С., Бурцева Ю.Ю
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
НЕПОЛИОМИЕЛИТНЫХ ЭНТЕРОВИРУСОВ, ЦИРКУЛИРОВАВШИХ В
УРАЛЬСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ И ЗАПАДНОЙ СИБИРИ В 2017 -
2018 гг.

ФБУН «Екатеринбургский научно-исследовательский институт вирусных инфекций» Роспотребнадзора
Екатеринбург, Российская Федерация