

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Игнатова Н.И., Елагин В.В., Иванова Т.С., Харитоновна Т.М., Антонян А.Э., Стрельцова О.С.

ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ПАТОГЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С КОНКРЕМЕНТАМИ МОЧЕВЫДЕЛИТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава РФ, 603005, Нижний Новгород, Россия

В связи с распространённостью постоперационных осложнений при лечении мочекаменной болезни, большую значимость в лабораторно-диагностической практике представляет исследования обсеменённости камней почек и мочевого пузыря и потенциальной патогенности изолированных бактерий. Показано, что уропатогенные бактерии обнаруживаются в составе мочевых камней в 65±7,1% случаев, преимущественно, представители семейств Enterobacteriaceae и Staphylococcaceae. Наиболее часто обнаруживались бактерии родов Escherichia, Enterococcus, Staphylococcus. Проведён анализ биоплёночной активности и резистентности к антибиотикам у 50 уропатогенных штаммов. Все исследуемые штаммы обладали резистентностью хотя бы к двум тестируемым препаратам, среднее значение индекса множественной резистентности составило 0,51. При культивировании на питательном агаре с Конго красным показано, что более чем половина тестируемых штаммов обладает высокой биоплёночной активностью и около 80% потенциальной способностью к биоплёнокообразованию. Наибольшая биоплёночная активность отмечена у бактерий родов Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Staphylococcus.

Ключевые слова: уроинфекции; мочекаменная болезнь; конкременты; уропатогенные бактерии; антибиотикорезистентность; биоплёнокообразование.

Для цитирования: Игнатова Н.И., Елагин В.В., Иванова Т.С., Харитоновна Т.М., Антонян А.Э., Стрельцова О.С. Оценка потенциальной патогенности микроорганизмов, ассоциированных с мочевыми конкрементами. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (6): 369-373. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-369-373>

Для корреспонденции: Игнатова Надежда Ивановна, канд. биол. наук, доц. каф. эпидемиологии, микробиологии и доказательной медицины; e-mail: n.i.evtteeva@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ № 21-15-00371.

Поступила 15.03.2022

Принята к печати 28.03.2022

Опубликовано 20.06.2022

Ignatova N.I., Elagin V.V., Ivanova T.S., Kharitonova T.M., Antonyan A.E., Streltsova O.S.

EVALUATION OF THE POTENTIAL PATHOGENICITY OF MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH URINARY CALCULI

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian, 603005, Nizhny Novgorod, Russia

Due to the prevalence of postoperative complications in the treatment of urolithiasis, the study of the contamination of urinary calculi and the potential pathogenicity of isolated bacteria is of great importance in laboratory diagnostic practice. It has been shown that uropathogenic bacteria are found in the composition of urinary stones in 65±7.1% of cases, mainly representatives of the Enterobacteriaceae and Staphylococcaceae families. Bacteria of the genera Escherichia, Enterococcus, Staphylococcus were most frequently detected. The analysis of biofilm activity and antibiotic resistance in 50 uropathogenic strains was carried out. It was shown that all the studied strains were resistant to at least two tested drugs, and the average value of the multiple resistance index was 0.51. When cultured on nutrient agar with Congo red, it was shown that more than half of the tested strains have high biofilm activity and about 80% potential for biofilm formation. The greatest biofilm activity was observed in bacteria of the genera Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Staphylococcus.

Key words: uroinfections; urolithiasis; calculi; uropathogenic bacteria; antibiotic resistance; biofilm formation.

For citation: Ignatova N.I., Elagin V.V., Ivanova T.S., Kharitonova T.M., Antonyan A.E., Streltsova O.S. Evaluation of the potential pathogenicity of microorganisms associated with urinary calculi. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; (6): 369-373 (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-6-369-373>

For correspondence: Ignatova N.I., PhD, Associate Professor, Department of epidemiology, microbiology and evidence-based medicine; e-mail: n.i.evtteeva@gmail.com

Information about authors:

Ignatova N.I., <https://orcid.org/0000-0002-4570-9342>;

Elagin V.V., <https://orcid.org/0000-0003-2676-5661>;

Ivanova T.S., <https://orcid.org/0000-0002-5303-0313>;

Kharitonova T.M., <https://orcid.org/0000-0003-3989-9087>;

Antonyan A.E., <https://orcid.org/0000-0001-6494-7277>;

Streltsova O.S., <https://orcid.org/0000-0002-9097-0267>.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment. This research was funded by the Russian Science Foundation under grant No. 21-15-00371.

Received 15.03.2022

Accepted 28.03.2022

Published 20.06.2022

Введение. Мочекаменная болезнь (МКБ) является широко распространённым заболеванием мочевыделительной системы у лиц среднего и старшего возраста. По ежегодным затратам на диагностику, лечение, госпитализацию МКБ занимает второе место среди всех инфекций, связанных с мочевыделительной системой [1]. Особенно остро стоит вопрос в странах с высоким уровнем жизни, где частота образования камней в почках значительна (>10-30%) [2]. Урологи особо обеспокоены камнями, образующимися в ходе персистенции микроорганизмов в мочевыводящей системе, которые составляют до 15% камней в почках [3]. Бактерии, расщепляющие мочевины, такие, как *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Providencia* spp., *Ureaplasma urealyticum*, обычно ответственны за струвитные камни [4,5]. При дроблении таких камней, микроорганизмы могут вызывать послеоперационные осложнения, такие как пиелонефрит, синдром системной воспалительной реакции, уросепсис [6]. Многие патогены антибиотикорезистентны, что обуславливает их персистенцию при лечении постоперационных осложнений. Широкая распространённость хронических заболеваний мочевыводящих путей, катетер-ассоциированных инфекций и других патологий, имеющих в своей основе биоплёночный процесс [7], определяет актуальность исследования потенциальной способности штаммов к биоплёнокообразованию. Биоплёнка представляет сообщество взаимодействующих бактерий, погруженных в слизисто-полимерный матрикс, что делает данные микроорганизмы более устойчивыми к воздействию ряда факторов, в том числе, к антимикробным препаратам (АМП) [8]. Применение АМП является основным способом лечения и профилактики послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений. Представляет интерес изучение спектра антибиотикочувствительности бактерий, ассоциированных с камнями мочевыделительной системы и их способности к биоплёнокообразованию, что и явилось целью данного исследования.

Материал и методы. Материалом для исследования служили 50 штаммов бактерий, изолированных из камней мочевыделительной системы пациентов с МКБ, госпитализированных в ГБУЗ НО «Нижегородская областная клиническая больница им. Н. А. Семашко». Смывы с измельченных конкрементов высевали на дифференци-

ально-диагностические среды: желточно-солевой агар, энтерококк агар, среду Эндо. Посевы культивировали 24 ч, при 37° С. Видовая идентификация представителей *Staphylococcaceae* и *Enterobacteriaceae* проводилась с помощью наборов биохимической идентификации бактерий (Диагностические системы, Нижний Новгород, Россия) и оксидазного теста (Диагностические системы, Нижний Новгород, Россия). Чувствительность к АМП (офлоксацину, норфлоксацину, ампициллину, амоксицилину с клавулановой кислотой, цефтриаксону, цiproфлоксацину, цефтазидиму, цефотаксиму, триметоприму с сульфаметоксазолом) определяли диско-диффузионным методом. Диаметры зон задержки роста интерпретировались в соответствии с инструкцией производителя (NICE, Санкт-Петербург, Россия).

Определение способности микроорганизмов к биоплёнокообразованию проводили путём посева исследуемых штаммов на агар, содержащий Конго красный [9]. Принцип метода заключается в способности Конго красного окрашивать полисахарид, входящий в состав матрикса биоплёнки. Штаммы, с высокой способностью к биоплёнокообразованию, окрашивают среду вокруг колоний в чёрный цвет. Для штаммов со средней способностью биоплёнокообразования характерно окрашивание колоний в чёрный или коричневый цвет, при этом среда остается неокрашенной, штаммы не способные к образованию биоплёнки не имеют окрашивания колоний или среды.

Статистическая обработка данных. Частота обнаружения различных штаммов бактерий в мочевых камнях выражена в процентах по отношению к общему числу штаммов. Индекс множественной резистентности (ИМР) к АМП рассчитывался соотношением количества резистентных штаммов к общему числу тестируемых АМП.

Результаты. Изолировано 50 штаммов бактерий. Количество инфицированных проб составило 65% от общего числа анализируемых конкрементов, из 44% проб изолирован один штамм, из 21% проб – 2 и более штаммов. Определены представители 9 родов микроорганизмов, большая часть которых относилась к семейству *Enterobacteriaceae* (7 родов). Наиболее часто выделялись представители родов *Staphylococcus* (26%), *Escherichia* (24%), *Enterococcus* (14%) (рис. 1).

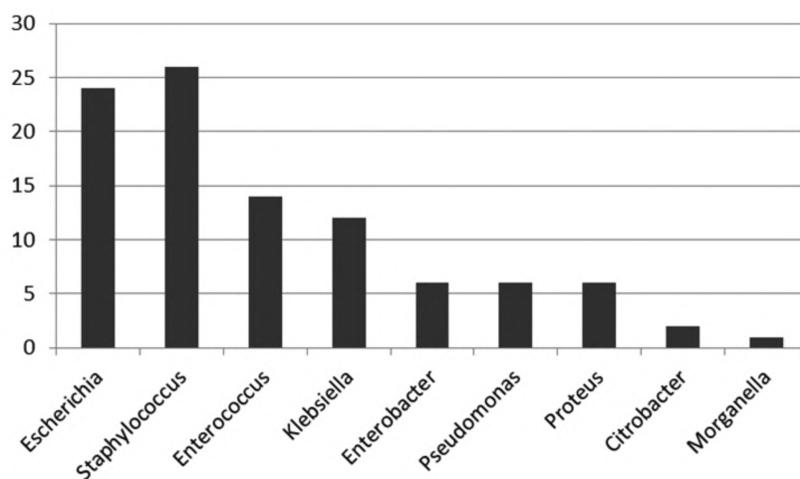


Рис. 1. Видовой состав микроорганизмов, изолированных из конкрементов мочевыделительной системы (% от общего числа штаммов).

Анализ чувствительности изолированных штаммов к АМП, рекомендуемым для терапии урологических инфекций, показал, что практически для всех АМП наблюдается примерно равное количество чувствительных и резистентных штаммов. Исключение составляют ампициллин и сульфаметоксазон, для которых преобладают резистентные штаммы, и цефтазидим с незначительным преобладанием чувствительных штаммов. Среди представителей рода *Escherichia* только один выделенный штамм обладал чувствительностью ко всем АМП. Для остальных штаммов среднее значение ИМП составило 0,54 (рис. 2).

К офлоксацину, ампициллину, ципрофлоксацину наблюдалось наибольшее количество резистентных штаммов рода *Escherichia*. Среди *Staphylococcus aureus* один штамм обладал чувствительностью ко всем АМП, кроме ампициллина, для всех остальных характерна мультирезистентность (среднее значение ИМП 0,63). Наибольшее количество резистентных штаммов отмечено для ампициллина, офлоксацина, норфлоксацина, цефотаксима. Один штамм *Staphylococcus xylosus* резистентен ко всем

АМП, другой к пяти. Среди штаммов *Staphylococcus epidermidis* и *Staphylococcus intermedius* устойчивость обнаружена к двум, трём, шести АМП. Наибольшее количество штаммов демонстрировало резистентность к ампициллину, амоксициллину/клавуланату, триметоприму/сульфаметоксазону. Штаммы *Enterococcus faecalis* имели среднее значение ИМП 0,25. Для *Enterococcus faecium* значение ИМП составляло 0,6; один штамм чувствителен только ко одному АМП, один резистентен ко всем. Наименее эффективны ампициллин, амоксициллин/клавуланат, триметоприм/сульфаметоксазон. Один штамм *Klebsiella planticola* устойчив ко всем исследованным АМП, один штамм *Klebsiella pneumoniae* чувствителен ко всем АМП. Для остальных представителей рода *Klebsiella* значение ИМП 0,33. Наибольшая устойчивость выявлена к ампициллину и триметоприму/сульфаметоксазону (рис. 3).

Один из трёх представителей рода *Enterobacter* имел чувствительность ко всем АМП, второй – к норфлоксацину и цефтазидиму, третий – устойчив ко всем АМП. Один штамм *Pseudomonas aeruginosa* устойчив ко всем

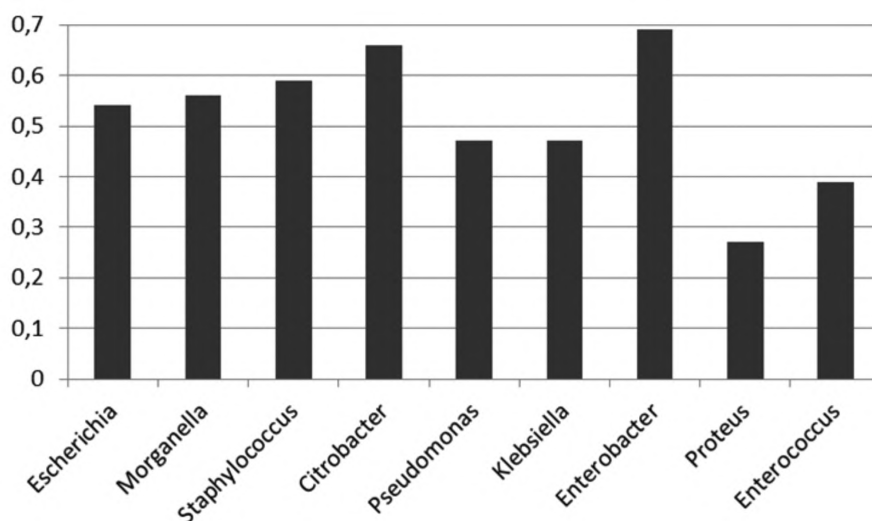


Рис. 2. Значения среднего ИМП для наиболее часто встречающихся уропатогенов.

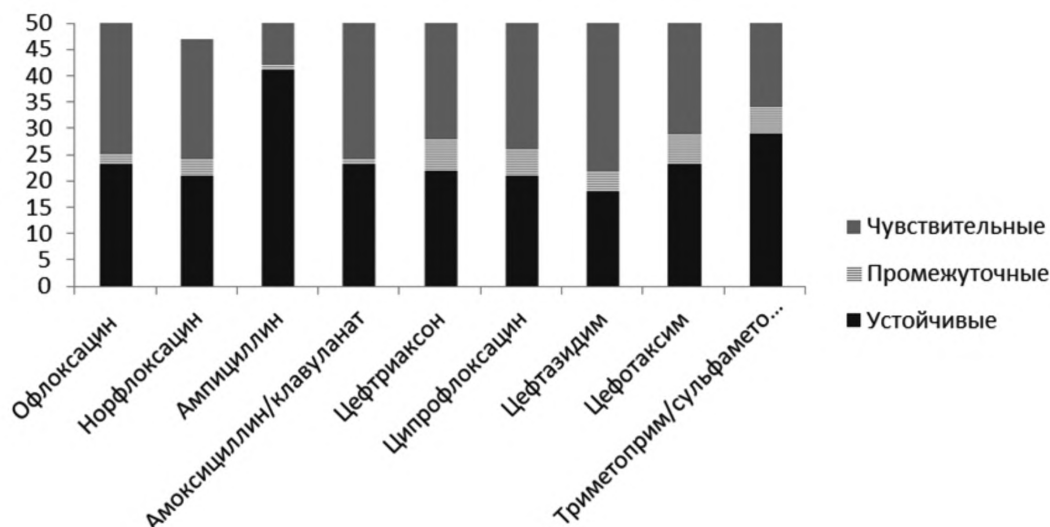


Рис. 3. Спектр чувствительности штаммов уропатогенов к АМП.

исследованным АМП, два других имели ИМП 0,22. Наименьшую эффективность при этом продемонстрировали триметоприм/сульфаметоксазон, норфлоксацин, ампициллин. Один из штаммов *Proteus mirabilis* чувствителен ко всем АМП, второй устойчив только к цiproфлоксацину. Третий штамм устойчив к ампициллину, цефтриаксону, цiproфлоксацину, триметоприму/сульфаметоксазону. Среди представителей *Citrobacter* один штамм устойчив ко всем АМП, второй – к ампициллину, цефтриаксону, цефотаксиму. Единственный представитель рода *Morganella* чувствителен к амоксициллину/клавуланату, цефтриаксону, цефтазидиму, цефотаксиму.

Из 50 исследуемых штаммов более половины (54%) составляли штаммы с высокой способностью к биоплёнкообразованию, 23% показали низкую способность, 23% не образовывали биоплёнки.

Наибольшей способностью к образованию биоплёнок обладали штаммы *Escherichia coli* (рис. 4). Из 12 исследованных штаммов только два не образовывали биоплёнки. Среди представителей рода *Staphylococcus* один штамм не формировал биоплёнки, 5 штаммов обладали высокой способностью к формированию биоплёнок, 6 – имели среднюю способность. Из шести штаммов *Enterococcus* половина имела высокую способность образовывать биоплёнки (*Enterococcus faecalis*), другая половина – среднюю (*Enterococcus faecium*). Среди представителей рода *Klebsiella* 3 штамма имели высокую способность формировать биоплёнки, 1 – среднюю. Все выделенные штаммы *Morganella* и *Enterobacter* характеризовались высокой биоплёночной активностью. *Pseudomonas* и *Citrobacter* не обладали способностью формировать биоплёнки. Среди представителей рода *Proteus* только один штамм обладал высокой биоплёночной активностью (рис. 4). Около 80% штаммов уропатогенов обладало способностью к биоплёнкообразованию.

Обсуждение. Существует два варианта связи МКБ с инфекциями мочевыделительной системы: образование камней может возникать на фоне инфекционного процесса или камни могут быть инфицированы после их формирования [10]. В обоих случаях камни могут выступать источником вторичной инфекции, что определяет важность исследования потенциальной патогенности микроорганизмов, ассоциированных с ними.

Патогенность микроорганизмов определялась по их способности формировать биоплёнки и устойчивости к АМП. В первую очередь, мы начали с определения частоты встречаемости микроорганизмов на камнях. Из всех исследованных образцов 65% конкрементов содержали микроорганизмы. Согласно данным литературы, этот показатель может составлять от 15 до 70% [11], и во многом зависит от химического состава камня [12]. В 21% случаев на камнях присутствуют более одного вида микроорганизмов. Поскольку разные штаммы могут иметь разную чувствительность к АМП и разную способность формировать биоплёнки, это повышает вероятность развития вторичной инфекции. В исследовании выделено 17 видов микроорганизмов, относящихся к 9 родам. Больше всего выделено штаммов *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecium*. Согласно предыдущим исследованиям, наиболее часто выделяются *E. coli*, следующими по частоте могут быть представители *Proteus* или *Pseudomonas*, далее *Klebsiella* [12, 13]. Такое различие в видовом разнообразии микроорганизмов, выделенных с камней, определяется экологическими особенностями регионов проживания пациентов и доступностью АМП.

Анализ резистентности выделенных микроорганизмов к АМП, как одного из факторов их патогенности, показал, что только 3 штамма являлись чувствительными ко всем исследованным АМП, ещё 3 штамма устойчивы к одному АМП. Остальные штаммы обладали мультирезистентностью. При оценке резистентности к АМП с одинаковым механизмом действия показано некоторое сходство, что свидетельствует об одинаковых механизмах защиты со стороны бактерий. К норфлоксацину и офлоксацину – практически одинаковая чувствительность. АМП цефалоспоринового ряда показали сходную чувствительность. При сравнении ампициллина и амоксициллина, усиленного клавулановой кислотой, заметна эффективность добавления ингибитора β-лактамаз. Наибольшее количество штаммов *E. coli* и *S. aureus* резистентны к бета-лактамам АМП, устойчивость к которым связана с продукцией β-лактамаз [14]. К цефтриаксону, наиболее часто назначаемому АМП при инфекциях мочевыделительной системы, резистентность демонстрируют 44% от всех выделенных штаммов, а 12% штаммов проявляют промежуточную чувствитель-

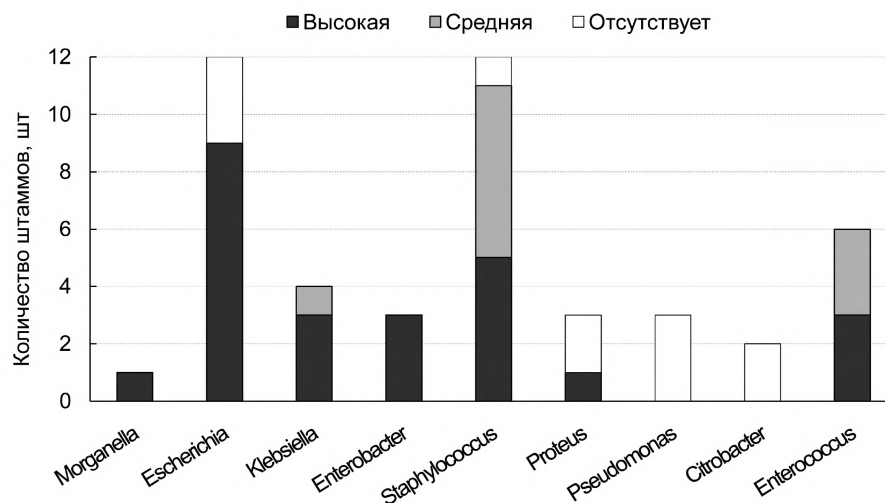


Рис. 4. Способность уропатогенов к формированию биоплёнок.

ность. Становится очевидным, что более чем в половине случаев назначения данного АМП пациентам, терапия не будет иметь эффекта. Выявленная мультирезистентность может быть обусловлена не только наличием у бактерий механизмов нейтрализации или удаления из клетки АМП, но и высокой способностью формировать биоплёнку. В исследовании данной корреляции не выявлено, что может быть обусловлено малым количеством анализируемых штаммов и ещё меньшим количеством штаммов, чувствительных к АМП.

Использование питательной среды с добавлением Конго красного показало, что почти 80% штаммов способны образовывать биоплёнку. Наиболее часто эта способность встречается среди грамотрицательных уропатогенов семейства *Enterobacteriaceae*. Это можно объяснить тем, что бактериальные сообщества используют систему кворум сенсинг (QS) для контроля образования биоплёнки. Механизм функционирует посредством аутоиндукторов, которые наиболее активно продуцируются именно у грамотрицательных бактерий. Образую биоплёнку, бактерии создают устойчивую систему защиты, в том числе, и от действия АМП [7,8], что может стать причиной хронической инфекционной патологии или способствовать развитию внутрибольничных инфекций [15]. Исследование чувствительности к АМП проведено не на биоплёнках, однако, необходимо учесть следующее обстоятельство. Краситель Конго красный окрашивает полисахарид, входящий в состав матрикса биоплёнки. В случае штаммов, обладающих высокой способностью к формированию биоплёнок, наблюдается окрашивание питательной среды вокруг колоний. Это позволяет предположить, что данные бактерии секретируют полисахарид в окружающее пространство, и тем самым затрудняют проникновение АМП внутрь клеток. У штаммов со средней способностью к формированию биоплёнок, Конго красным окрашиваются только колонии. В этом случае, полисахарид, вероятно, находится в составе клеточной стенки и препятствует проникновению АМП в клетку.

Более 80% выделенных из конкрементов мочевыделительной системы штаммов являются потенциально патогенными, поскольку способны формировать биоплёнку и обладают резистентностью к используемым АМП. Подобные штаммы могут вызвать послеоперационные осложнения, что необходимо учитывать при планировании лечения МКБ.

Заключение. Исследование подчеркивает важность микробиологического анализа камней для достижения стерильности мочевыделительной системы и предотвращения инфекционных осложнений при лечении МКБ. Поскольку большинство штаммов, изолированных из камней, являются мультирезистентными, возникает необходимость пересмотра устоявшихся схем лечения, разработки новых АМП или способов терапии.

article/n/oslozhnennoe-techenie-mochekamennoy-bolezni-v-hirurgicheskoy-praktike.

6. Мусейбов Е.А. Клинические проявления воспалительно-инфекционных осложнений при мочекаменной болезни. *Евразийский Союз Ученых*. 2019; 3(12): (69). <https://cyberleninka.ru/article/n/klinicheskie-proyavleniya-vospalitelno-infektsionnyh-oslozhneniy-pri-mochekamennoy-bolezni>.
7. Немцева Н.В. Биоплёнки – феномен формирования резистентности микроорганизмов в различных экосистемах. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2019; 3. <https://cyberleninka.ru/article/n/biopljenki-fenomen-formirovaniya-rezistentnosti-mikroorganizmov-v-razlichnyh-ekosistemah>.

REFERENCES

1. Clinical recommendations. Urolithiasis 2020 (01.06.20). Approved by the Ministry of Health of the Russian Federation. http://disuria.ru/_ld/7/733_kr20N20mz.pdf. (in Russian)
2. Styazhkina S.N., Azimova E.L., Zhernakova A.E., Zavyalova N.A. Complicated course of urolithiasis in surgical practice. *StudNet*. 2021; 5: 1-6. <https://cyberleninka.ru/article/n/oslozhnennoe-techenie-mochekamennoy-bolezni-v-hirurgicheskoy-praktike>. (in Russian)
3. Bazin D., André G., Weil R., Matzen G., Emmanuel V., Carpentier X. et al. Absence of bacterial imprints on struvite-containing kidney stones: a structural investigation at the mesoscopic and atomic scale. *Urology*. 2012, 79(4):786-90.
4. Shah P., Baral R., Agrawal C.S., Lamsal M., Baral D., Khanal B. Urinary Calculi: A Microbiological and Biochemical Analysis at a Tertiary Care Hospital in Eastern Nepal. *Int. J. Microbiol* 2020; 8880403.12. DOI:10.1155/2020/8880403.
5. Flannigan R., Choy W.H., Chew B., Lange D. Renal struvite stones-pathogenesis, microbiology, and management strategies. *Nat. Rev. Urol*. 2014; 11(6):333-41. DOI: 10.1038/nrurol.2014.99.
6. Museibov E.A. Clinical manifestations of inflammatory and infectious complications in urolithiasis. *Евразийский союз ученых*. 2019; 3 (12): 69. <https://cyberleninka.ru/article/n/klinicheskie-proyavleniya-vospalitelno-infektsionnyh-oslozhneniy-pri-mochekamennoy-bolezni>. (in Russian)
7. Nemtseva N.V. Biofilms – the phenomenon of the formation of resistance of microorganisms in various ecosystems. *Bulleten` Orenburgskogo nauchnogo tsentra Ural'skogo otdeleniya Rossiyskoy akademii nauk*. 2019; 3. <https://cyberleninka.ru/article/n/biopljenki-fenomen-formirovaniya-rezistentnosti-mikroorganizmov-v-razlichnyh-ekosistemah>. (in Russian)
8. Mahato S., Mandal P., Machato A. Biofilm production by uropathogens like *Klebsiella* spp. and *Pseudomonas* spp. and their antibiotic susceptibility. *Birat. Journal of Health Sciences*. 2020; 5(1):902-6. DOI: 10.3126/bjhs.v5i1.29609.
9. Saxena N., Naheshwari D., Dadhich D., Singh S. Evaluation of congo red agar for detection of biofilm production by various clinical candida isolates. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*. 2014; 3 (59):13234-8. DOI: 10.14260/jemds/2014/3761.
10. Miano R., Germani S., Vespasiani G. Stones and urinary tract infections. *Urol. Int*. 2007; 79 (Suppl. 1):32-6.
11. Schwaderer A.L., Wolfe A.J. The association between bacteria and urinary stones. *Ann. Transl. Med*. 2017; 5(2):32.
12. Golechha S., Solanki A. Bacteriology and chemical composition of renal calculi accompanying urinary tract infection. *Indian J. Urol*. 2001; 17:111-7.
13. Tavichakontrakool R., Prasongwattana V., Sungkeeree S. Extensive characterizations of bacteria isolated from catheterized urine and stone matrices in patients with nephrolithiasis. *Nephrol. Dial. Transplant*. 2012;27(11):4125-30.
14. Guo Wu., Son G., Sun M., Wang J., Wang Ya. Prevalence and treatment methods of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2020. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00107.
15. Vuotto C., Longo F., Pascolini C., Donelli G., Balice M.P., Libori M.F. et al, Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J. Appl. Microbiol*. 2017; 123: 1003-18. DOI: 10.1111/jam.13533.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-5, 8-15 см. REFERENCES)

1. Клинические рекомендации. Мочекаменная болезнь; 2020 (01.06.2020 г.). Утверждены Минздравом РФ. http://disuria.ru/_ld/7/733_kr20N20mz.pdf.
2. Стяжкина С.Н., Азимова Е.Л., Жернакова А.Е., Завьялова Н.А. Осложненное течение мочекаменной болезни в хирургической практике. Научно-образовательный журнал для студентов и преподавателей «StudNet». 2021; 5: 1-6. <https://cyberleninka.ru>