

МИКРОБИОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Шипицына И. В., Осипова Е. В., Овчинников Е. Н., Леончук Д. С.

ЗАВИСИМОСТЬ БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ОТ АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, ВЫДЕЛЕННЫХ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени акад. Г. А. Илизарова»
Минздрава РФ, 640014, Курган, Россия

В связи с распространением высокорезистентных штаммов среди клинически значимых клонов P. aeruginosa возникает необходимость назначать антибиотики не только с учётом знания спектра чувствительности конкретного изолята, но и данных биоплёночной активности микроорганизма.

Цель – исследовать зависимость биоплёнокообразующей способности от чувствительности к антибактериальным препаратам клинических штаммов P. aeruginosa, выделенных от пациентов с хроническим остеомиелитом. Обследовано 36 пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей старше 18 лет, находившихся на лечении в центре гнойной остеологии. Объект исследования – материал из ран, свищей, очага воспаления. Проанализирована чувствительность выделенных микроорганизмов к 10 антибиотикам: пиперациллин/тазобактам, имипенем, меропенем, азтреонам, амикацин, ципрофлоксацин, цефтриаксон, цефтазидим, цефотаксим, цефепим. Среди клинических изолятов P. aeruginosa, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей, высоко- и среднеадгезивные штаммы составили 86,1%. Высокоадгезивные штаммы устойчивы к широкому спектру антибактериальных препаратов, применяемых в клинике. При анализе антибиотикограмм, полученных для высокоадгезивных штаммов, наиболее эффективны пенициллины, для среднеадгезивных штаммов – пенициллины, аминогликозиды, карбапенемы, для низкоадгезивных – аминогликозиды, пенициллины, карбапенемы, монобактамы, хинолоны. Мультирезистентность P. aeruginosa является серьёзной проблемой в лечении пациентов с хроническим остеомиелитом. Распространение антибиотикорезистентных штаммов P. aeruginosa связано с существованием бактерий в составе биоплёнки. Поскольку адгезия – первый этап в формировании биоплёнки, важно своевременно выявлять штаммы, обладающие высоким адгезивным потенциалом.

Ключевые слова: хронический остеомиелит; синегнойная инфекция; биоплёнки; адгезия; антибиотикорезистентность.

Для цитирования: Шипицына И. В., Осипова Е. В., Овчинников Е. Н., Леончук Д. С. Зависимость биопленкообразующей способности от антибиотикочувствительности клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных у пациентов с хроническим остеомиелитом. Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (1):37-41

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-37-41>

Shipitsyna I.V., Osipova E.V., Ovchinnikov E. N., Leonchuk D. S.

DEPENDENCE OF BIOFILM-FORMING ABILITY ON THE ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CLINICAL STRAINS ISOLATED FROM PATIENTS WITH CHRONIC OSTEOMYELITIS

Federal State Budgetary Institution Russian Ilizarov Scientific Centre «Restorative Traumatology and Orthopaedics» of the RF Ministry of Health, Kurgan, Russian Federation, 640014

Due to the spreading highly resistant strains among clinically significant P. aeruginosa clones, it becomes necessary to prescribe antibiotics not only taking into account the knowledge of sensitivity spectrum of a particular isolate but the data of microorganism biofilm activity as well. To study the dependence of biofilm-forming ability on the sensitivity to antibacterial preparations of P. aeruginosa clinical strains, isolated from patients with chronic osteomyelitis. 36 patients above 18 with chronic osteomyelitis of long tubular bones who were treated in the center of purulent osteology took part in the experiment. Object of the study – material isolated from wounds, fistulas, as well as from inflammatory foci. The sensitivity of isolated microorganisms to 10 antibiotics was analyzed: Piperacillin/Tazobactam, Imipenem, Meropenem, Aztreonam, Amikacin, Ciprofloxacin, Ceftriaxone, Cefazidime, Cefotaxime, Cefepime.

High- and medium-adhesive strains accounted for 86,1 % among P. aeruginosa clinical isolates, obtained from the wounds of patients with chronic osteomyelitis of long tubular bones. Highly adhesive strains are resistant to a wide range of antibacterial preparations used clinically. Penicillins were the most effective preparations when analyzing antibioticograms obtained for highly adhesive strains, for medium adhesive strains – penicillins, aminoglycosides and carbapenems, for low adhesive ones – aminoglycosides, penicillins, carbapenems, monobactams, quinolones. P. aeruginosa multi-resistance is a serious problem in the treatment of patients with chronic osteomyelitis. Spreading antibiotic-resistant strains of P. aeruginosa is associated with the presence of bacteria in the biofilm. Since adhesion is the first step in the biofilm formation, it is important to identify strains having high adhesive ability timely.

Key words: chronic osteomyelitis; *P. aeruginosa* (pyocyanic) infection; biofilms; adhesion; antibiotic resistance.

For citation: Shipitsyna I.V., Osipova E.V., Ovchinnikov E. N., Leonchuk D. S. Dependence of biofilm-forming ability on the antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated from patients with chronic osteomyelitis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2020; 65 (1): 37-41. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-1-37-41>

For correspondence: Shipitsyna I.V., Ph.D. of Biological Sciences; e-mail: IVSchimik@mail.ru

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

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

Received 29.10.2019
Accepted 06.11.2019

Введение. В этиологии остеомиелита возросла роль грамотрицательной микрофлоры, высокорезистентной к антибактериальным препаратам, применяемых в клинике [1, 2]. Особое место среди возбудителей остеомиелита занимает *Pseudomonas aeruginosa* – грамотрицательная бактерия, имеющая многочисленные факторы вирулентности: пили, флагеллярные протеины, липид А, экзо- и эндотоксины, пиоцианин, эластазу и др. [3, 4]. Сложной системой защиты *P. aeruginosa* от иммунной атаки организма является образование биоплёнок [5, 6]. *P. aeruginosa* может формировать недифференцированную или дифференцированную биоплёнку [3]. Внеклеточный матрикс *P. aeruginosa* формируют за счёт собственных полимеров, для построения матрикса *in vivo* бактерия активно использует биополимеры хозяина (фибрин, секреты слизистых оболочек, тканевые дериваты) [3, 6]. Данные о биоплёночной активности *P. aeruginosa* разнятся. Большинство исследователей сходятся во мнении, что лишь малая часть изолятов *P. aeruginosa* не являются биоплёночными. Основная масса активно формирует биоплёнку на различных поверхностях [2, 3]. Существование бактерий в составе биоплёнок способствует снижению эффективности антибактериальной терапии [7, 8].

Согласно рекомендациям «Европейского комитета по тестированию чувствительности к антибиотикам — EUCAST» для лечения инфекции, ассоциированной с *P. aeruginosa*, могут использоваться ампициллин, амоксициллин, цефазолин, цефотаксим, цефтриаксон, эртапенем, канамицин, неомицин, тетрациклины, тигециклин, триметоприм, триметоприм/сульфаметоксазол. Увеличение доли резистентных штаммов среди клинически значимых клонов *P. aeruginosa* ведёт к необходимости, при назначении антибиотиков, учитывать не только спектр чувствительности конкретного изолята, но и его биоплёночную активность.

Цель – исследовать чувствительность к антибактериальным препаратам клинически значимых штаммов *P. aeruginosa*, выделенных у пациентов с хроническим остеомиелитом, в зависимости от их биоплёнокообразующей способности.

Материал и методы. Обследовано 36 пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей старше 18 лет, находившихся на лечении в центре гнойной остеологии города. Объект исследования – материал из ран, свищей, очага воспаления.

Идентификацию микроорганизмов и определение антибиотикоустойчивости проводили с помощью бактериологического анализатора WalkAway-40 Plus («Siemens», США). При характеристике антибиоти-

кочувствительности микроорганизмов использовали общепринятые показатели: «чувствительные» (S), «умеренно резистентные» (I), «резистентные» (R) штаммы. Проанализирована чувствительность выделенных микроорганизмов к пиперациллину/тазобактаму, имипенему, меропенему, азтреонаму, амикацину, цiproфлоксацину, цефтриаксону, цефтазидиму, цефотаксиму, цефепиму.

Биоплёнокообразующую способность выделенных штаммов ($n=36$) изучали с помощью унифицированной ранее методики [9]. Для интерпретации полученных данных использованы внутривлабораторные критерии, разработанные на основе рекомендаций S.Stepanovic и соавт. [10]. При значениях OD_{630} (оптическая плотность красителя при длине волны 630 нм) ниже 0,090 – у штаммов отсутствует способность к образованию биоплёнки; $0,090 < OD_{630} \leq 0,180$ – слабая; $0,180 < OD_{630} \leq 0,360$ – средняя; $OD_{630} \leq 0,360$ – высокая способность к образованию биоплёнки.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения анализа данных AtteStat, версия 13.0 [11]. Данные представлены в виде медианы (Me), 25% и 75% квартилей (Q_{25} - Q_{75}). Для проверки гипотезы нормальности распределения в выборках использовали критерий Шапиро-Уилка. Значимость различий между группами проверяли с помощью непараметрического критерия Вилкоксона. Различия между группами наблюдений считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Все штаммы *P. aeruginosa*, выделенные из патологического материала у пациентов с хроническим остеомиелитом, обладали адгезивными свойствами. Уровень биоплёнокообразования на поверхности полистирола различен: у 31% изолятов отмечено высокое средство к плёнкообразованию, у 56% – средний уровень, у 13% – низкий.

Биоплёнокообразующая способность высокоадгезивных штаммов через 24 ч составляла 0,412 (0,372; 0,450) ед. опт. пл., через 48 ч – 0,435 (0,399; 0,461) ед. опт. пл. (рис. 1). Уровень плёнкообразования среднеадгезивных штаммов через 24 ч составил 0,239 (0,212; 0,267) ед. опт. пл., через 48 ч – 0,250 (0,240; 0,294) ед. опт. пл. Средняя оптическая плотность низкоадгезивных штаммов через сутки достигла отметки 0,130 (0,113; 0,150) ед. опт. пл., через 48 ч – 0,147 (0,139; 0,157) ед. опт. пл.

Установлены различия в чувствительности к антибактериальным препаратам, зависящей от способности к биоплёнокообразованию. Низкая чувствительность к цефалоспорином (63,6% устойчивых штам-

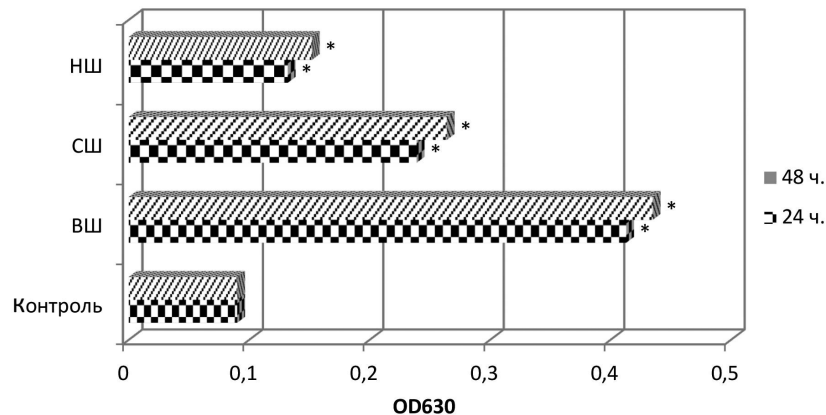


Рис. 1. Биоплёнкообразующая активность (OD_{630}) штаммов *P. aeruginosa* через 24 ч и 48 ч, выраженная в ед. опт. пл. НШ – низкоадгезивные штаммы; СШ – среднеадгезивные штаммы; ВШ – высокоадгезивные штаммы; * – различия значимы по сравнению с контрольными значениями при $p < 0,05$.



Рис. 2 Чувствительность штаммов *P. aeruginosa*, обладающих высоким средством к биоплёнкообразованию. Здесь и на рис. 3,4: R-резистентный штамм; S – чувствительный штамм; I – умеренно-резистентный штамм.

мов к цефтазидиму, 54,5% – цефотаксиму, 81,8% – цефтриаксону, 63,5% – цефепиму), аминогликозидам (54,5% устойчивых штаммов к гентамицину, 54,6% – к амикацину), монобактамам (45,4% резистентных к азтреонаму штаммов), хинолонам (81,8% резистентных к ципрофлоксацину штаммов) характерна для штаммов, активно формирующих биоплёнку. Карбапенемы проявляли среднюю активность: 36,4% и 27,3% устойчивых штаммов к имипенему и меропенему соответственно. Наиболее эффективный препарат в отношении высокоадгезивных штаммов *P. aeruginosa* пиперациллин/тазобактам (9,1% устойчивых штаммов) (рис. 2).

В отношении штаммов со средней биоплёнкообразующей способностью эффективны пиперациллин/тазобактам, цефтриаксон, азтреонам, амикацин, имипенем, меропенем (5; 5; 5; 25; 25, 15% устойчивых штаммов соответственно) (рис. 3).

Аминогликозиды, карбапенемы, пенициллины проявляли 100% эффективность в отношении низкоадгезивных штаммов *P. aeruginosa*. Среди цефало-

споринов наименьшую активность проявляли цефотаксим (40% устойчивых штаммов) и цефтриаксон (40% устойчивых штаммов). Цефепим и цефтазидим активны в отношении 80% штаммов (рис. 4).

Против высокоадгезивных штаммов наиболее эффективны карбапенемы, пенициллины, для среднеадгезивных штаммов – пенициллины, аминогликозиды, карбапенемы, для низкоадгезивных – аминогликозиды, пенициллины, карбапенемы, монобактамы, хинолоны и ряд цефалоспоринов.

Высокоадгезивные штаммы *P. aeruginosa* обладали множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам.

P. aeruginosa относится к условно-патогенным микроорганизмам и может вызывать инфекционный процесс, преимущественно, на фоне иммуносупрессии [7, 12, 13]. В этиологической структуре хронического остеомиелита *P. aeruginosa* наряду с *Staphylococcus aureus* занимает лидирующие позиции [1, 2]. Трудность лечения и диагностики синегнойной инфекции обусловлена наличием широкого спектра факторов патогенности

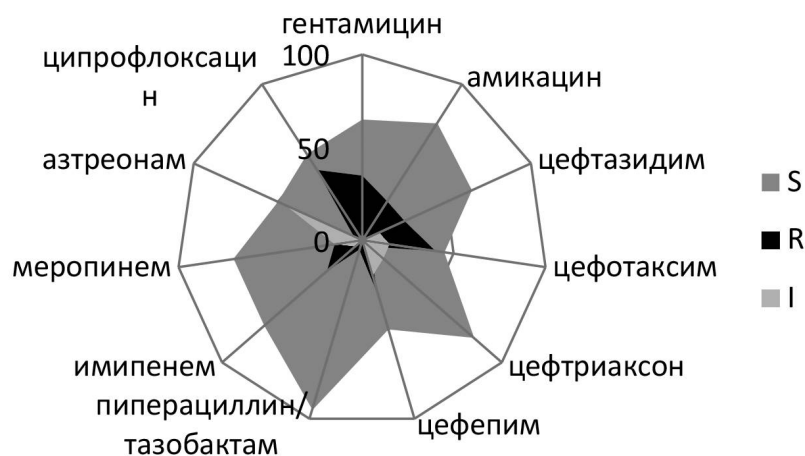


Рис. 3. Чувствительность среднеадгезивных штаммов *P. aeruginosa* к антибактериальным препаратам.



Рис. 4. Чувствительность низкоадгезивных штаммов *P. aeruginosa* к антибактериальным препаратам.

и локализацией бактерий в глубоких слоях тканей, а не на поверхности ран [4, 14]. Одним из механизмов защиты против иммунной системы организма, является нахождение бактерии в составе биоплёнки [5, 7, 15]. Такая форма жизни делает её недоступной для многих антибактериальных препаратов. Карбапенем, активный в отношении планктонных форм *P. aeruginosa*, в случае сформированной биоплёнки, не является эффективным. Вследствие использования при лечении антибактериальных препаратов, плохо проникающих в биоплёнку, появляются мультирезистентные штаммы, что ведёт к возникновению рецидивов заболевания и формированию очагов хронических процессов [3, 6].

Лечение инфекции, ассоциированной с биоплёночными формами *P. aeruginosa*, направлено на выявление и разрушение биоплёнки на различных этапах её формирования [3, 5, 7]. Предложено комбинированное использование нескольких антибиотиков (тобрамицина, ципрофлоксацина, тетрациклина, колистина), синергидное действие которых направлено на разрушение активных и неактивных клеток биоплёнки [16].

Выводы. Высоко- и среднеадгезивные штаммы составляли 86,1% клинических изолятов *P. aeruginosa*, выделенных из ран пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей. Высокоадгезивные штаммы устойчивы к широкому спектру антибактериальных препаратов, применяемых в клинике. Наиболее эффективные в отношении высокоадгезивных штаммов *P. aeruginosa* препараты – пиперациллин/тазобактам; среднеадгезивных штаммов – пиперациллин/тазобактам, цефтриаксон, азтреонам, меропенем; низкоадгезивных – пиперациллин/тазобактам, амикацин, гентамицин, имипенем, меропенем, ципрофлоксацин, азтреонам, цефепим, цефтазидим.

Мультирезистентность *P. aeruginosa* является серьёзной проблемой в лечении пациентов с хроническим остеомиелитом. Распространение антибиотикорезистентных штаммов *P. aeruginosa* связано с существованием бактерий в составе биоплёнки. Лечение синегнойной инфекции требует назначения препаратов с учётом спектра чувствительности конкретного изолята, и с учётом оценки эффективности его дей-

ствия на биоплёночные формы возбудителя. Поскольку адгезия – первый этап в формировании биоплёнки, важно своевременно выявлять штаммы, обладающие высоким адгезивным потенциалом.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 5-7, 10, 12, 13, 16
см. REFERENCES)

1. Булавкин В.П., Окулич В.К., Конопелько Е.А. Антибактериальная терапия хронического остеомиелита длинных трубчатых костей. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2000; (3): 48-53.
2. Шипицына И.В., Осипова Е.В., Науменко З.С. Исследование факторов персистенции: биоплёнокообразующей способности и антилизоцимной активности этиологических агентов хронического остеомиелита. *Инфекции в хирургии*. 2014; 12(2): 40-2.
3. Лазарева А.В., Чеботарь И.В., Крыжановская О.А., Чеботарь В.И., Маянский Н.А. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2015; 17(3): 170-86.
4. Воронина О.Л., Кунда М.С., Аветисян Л.Р. и соавт. Особенности штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, вызывающих госпитальные инфекции у пациентов хирургических отделений ФНЦТИО им. В.И. Шумакова. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2012; 14(2): 88-9.
8. Илюкевич Г. В. Синегнойная инфекция: в новый век со старой проблемой. *Медицинские новости*. 2004. (12): 3-8.
9. Осипова Е.В., Шипицына И.В. Исследование адгезивных характеристик уропатогенных штаммов *Escherichia coli* у пациентов с позвоночно-спинномозговой травмой. *Урология*. 2014; (2): 20-4.
11. Гайдышев И.П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++. СПб.: БХВ-Петербург; 2004.
14. Мележик И.А., Яворская Н.В., Шепелевич В.В., Козкозей В.Н. Роль биоплёнок *Pseudomonas aeruginosa* в развитии эндогенных инфекций. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН* (электронный журнал). 2013; 3.
15. Осипова Е.В., Шипицына И.В. Информационная характеристика микробных биоплёнок, формируемых *in vitro* на поверхности покровного стекла клиническими штаммами *Klebsiella pneumoniae*. *Гений ортопедии*. 2018; 24(4): 478-81.

REFERENCES

1. Bulavkin V.P., Okulich V.K., Konopelko E.A. Antibacterial therapy of chronic osteomyelitis of long tubular bones. *Immunopathology, Allergology, Infektologiya*. 2000; 3: 48-53. (in Russian)
2. Shipitsyna I.V., Osipova E.V., Naumenko Z.S. The study of

- persistence factors: biofilm-forming ability and antilysozyme activity of chronic osteomyelitis etiologic agents. *Infektsii v khirurgii*. 2014; 12(2): 40-2. (in Russian)
3. Lazareva A.V., Chebotar I.V., Kryzhanovskaya O.A., Chebotar V.I., Mayanskiy N.A. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenicity, pathogenesis and pathology. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2015; 17(3): 170-86. (in Russian)
 4. Voronina O.L., Kunda M.S., Avetisyan L.R. et al. Characteristic features of *Pseudomonas aeruginosa* strains, causing hospital infections in patients of surgical departments of Shumakov FNTsTIO. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2012; 14(2): 889. (in Russian)
 5. Pace J.L., Rupp M.E., Roger G.F., eds. *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. Taylor & Francis Group; 2006.
 6. Mah T.F., Pitts B., Pellock B., Walker G.C., Stewart P.S., O'Toole G.A. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*. 2003; 426(5): 306-10.
 7. Rybtke M., Hultqvist L.D., Givskov M., Tolker-Nielsen T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: community structure, antimicrobial tolerance and immune response. *J. Mol. Biol.* 2015; 427(23): 3628-45.
 8. Ilyukevich G.V. *Pseudomonas aeruginosa* infection: into a new century with an old problem. *Meditzinskie Novosti*. 2004; (12): 3-8. (in Russian)
 9. Osipova E.V., Shipitsyna I.V. Studying adhesive characteristics of *Escherichia coli* uropathogenic strains in patients with spinal-cerebrospinal injury. *Urologiya*. 2014; (2): 20-4. (in Russian)
 10. Stepanović S., Vuković D., Jezek P., Pavlović M., Svabic-Vlahović M. Influence of dynamic conditions on biofilm formation by staphylococci. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2001; 20 (7): 502-4.
 11. Gaydyshev I.P. The solution of scientific and engineering problems by means of Excel, VBA and C/C++. St.Petersburg: BKhV-Petersburg; 2004. (in Russian)
 12. Shimada T., Matsumura I. Immune evasion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2014; 37 (1): 33-41.
 13. Watters C., DeLeon K., Trivedi U., Griswold J.A., Lyte M., Hampel K.J., Wargo M.J., Rumbaugh K.P. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms perturb wound resolution and antibiotic tolerance in diabetic mice. *Med. Microbiol. Immunol.* 2013; 202 (2): 131-41.
 14. Melezhič I.A., Yavorskaya N.V., Shepelevich V.V., Kozkozey V.N. The role of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in the development of endogenous infections. *Byulleten' Orenburgskogo nauchnogo tsentra UrO RAN (elektronnyi zhurnal)*. 2013; 3. (in Russian)
 15. Osipova E.V., Shipitsyna I.V. Informational characteristics of microbial biofilms formed by clinical strains of *Klebsiella pneumoniae in vitro* on the surface of the cover glass. *Geniy ortopedii*. 2019; 24(4): 478-81. (in Russian)
 16. Rojo-Molinero E., Macià M.D., Rubio R., Moyà B., Cabot G., López-Causapé C., Pérez J.L., Cantón R., Oliver A. Sequential treatment of biofilms with Aztreonam and Tobramycin is a novel strategy for combating *Pseudomonas aeruginosa* chronic respiratory infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016; 60 (5): 2912-22.

Поступила 29.10.19

Принята к печати 06.11.19