

Ф.В. Плотников, В.К. Окулич, А.А. Кабанова, В.Е. Шилин
Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск, Беларусь

Influence of the ability to form biofilms on sensitivity to antibiotics

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Belarus

Аннотация

Проблема профилактики и лечения инфекционных заболеваний является одной из приоритетных в здравоохранении. В общей струк-

туре хирургической заболеваемости гнойно-воспалительные процессы занимают одно из ведущих мест и наблюдаются у 40-60% всех хирургических пациентов [1, 2].

На современном этапе отмечено изменение клинической симптоматики и течения хирургической инфекции, что проявляется в увеличении числа тяжело протекающих и не поддающихся стандартному лечению осложненных форм гнойных заболеваний; удлинении сроков лечения, особенно на госпитальном этапе; учащении случаев стертых форм и атипичного течения хирургической инфекции [3].

Недостаточная эффективность проводимого лечения хирургической инфекции в определенной мере объясняется наличием у микроорганизмов действенных механизмов защиты от внешних повреждающих факторов. Повсеместное применение в медицинской практике антибактериальных (АБ) препаратов широкого спектра действия способствует селекции резистентной флоры. В последнее десятилетие изучению механизмов выживания бактерий придается особое значение [4].

В настоящее время основной частью микробиологов признано, что большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных окружающих средах существует в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ – биопленок (БП) [5]. Биопленка – микробное сообщество, характеризующееся клетками, которые прикреплены к поверхности или друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, и демонстрируют изменение фенотипа, выражающееся в изменении параметров роста и экспрессии специфических генов [6].

Характерное свойство всех микроорганизмов в составе БП – их поразительная устойчивость к физическим и биохимическим воздействиям, включающим АБ-резистентность [7]. Несмотря на то, что этот феномен признан много лет, его биологическое обоснование до сих пор до конца не объяснено. В пределах БП могут происходить физиологические изменения, включающие реакцию общего стресса, закрытие ключевых метаболических процессов и индукцию защитных механизмов [8]. Популяция клеток в составе БП гетерогенна, содержит быстро- и медленно растущие бактерии. Ряд из них устойчивы к АБ за счет экспрессии инактивирующих ферментов, другие – не экспрессируют подобные системы. Общая резистентность зависит от взаимодействия между целой популяцией клеток и терапией, направленной против мультиклеточного сообщества [7].

Применение конфокальной сканирующей лазерной микроскопии для исследования биопленок радикально изменило восприятие их структурных и функциональных особенностей. Этот метод дал возможность исследовать биопленки *in situ* без ограничений, с которыми сталкивается электронная микроскопия, хотя и при более низких увеличениях. С помощью конфокальной сканирующей лазерной микроскопии стало ясно, что структура биопленок не является гомогенным монослоем микробных клеток. Матрикс биопленки состоит из смеси полисахаридов, белков, нуклеиновых кислот и других веществ. Бактериальные экзополисахариды – главный компонент матрикса биопленки, который некоторые авторы называют также гликокаликсом или слизистым чехлом. Основным его компонентом является связанная вода. Все биопленки высоко гидратированы, некоторые до 73% состоят из внеклеточного материала, включая водные каналы и экзополисахариды. У большинства видов экзополисахаридный матрикс состоит из альгината и является преимущественно анионным. Матрикс является трехмерной структурой, которая окружает, закрепляет и защищает прикрепленные к различным поверхностям микроколонии бактерий [8, 9, 10, 11].

В химическом отношении матрикс биопленки неоднороден и различается у разных микроорганизмов [12, 13, 14]. Экстрацеллюлярный слой содержит до 40–95% полисахаридов [15, 16]. Концентрация других химических компонентов очень сильно варьирует. Доля белков может составлять до 60%, липидов до 40% и нуклеиновых кислот 1–20%. Данные соединения находятся в гидратированном состоянии, так как 80–90% объема биопленки занимает вода [14].

Исследования показали, что β-лактамы антибиотиков деактивируются в поверхностных слоях биопленки значительно быстрее, чем проникают через матрикс биопленок, сформированных β-лактамазопозитивными *K. pneumoniae*. Положительно заряженные молекулы аминогликозидов притягиваются к негативно заряженным полимерам матрикса, снижая скорость их проникновения, что даёт время бактериям выработать адаптивный стрессовый ответ. Исследования показали, что скорость проникновения аминогликозидов через матрикс биопленок *P. aeruginosa* значительно снижалась из-за связи с внеклеточным альгинатом, однако затем в значительной степени восста-

навливалась при добавлении альгинатлиазы. Отмечено, что слизь, полученная из БП, значительно снижает активность гликопептидов, даже по отношению к планктонным формам [17].

Таким образом, биопленка является сложной трехмерной биологической структурой высшей организации жизнедеятельности микробов, в чем-то напоминающей многоклеточный организм, обладающий очень важной особенностью – успешно противостоять внешним факторам агрессии среды.

Цель

Определить влияние способности микроорганизмов формировать биоплёнку на их чувствительность к антибиотикам.

В ходе проведённого исследования изучены свойства штаммов американской коллекции типовых культур с известной способностью формировать биоплёнку: *S.aureus* ATCC 6538, *P.aeruginosa* ATCC 9027, *E.coli* ATCC 8739, а также изучены свойства 192 клинических изолятов, полученных из микробиологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии» (РЦИХ). Забор микробиологического материала проводился в ожоговом отделении, в реанимационном отделении и в отделении гнойной хирургии УЗ «Витебская областная клиническая больница» в течение 2011-2014 года. Изучение микробных биоплёнок проводили с помощью ранее разработанных методов [18].

Для определения МПК для планктонных форм бактерий использовали метод серийных разведений в жидкой питательной среде. С целью определения МПК для бактерий в составе биоплёнки последнюю формировали в полистироловом планшете. Эмпирически выявлено, что при использовании разработанного метода [18] в лунке формируется биоплёнка с концентрацией $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл. Затем готовили раствор антибиотика в бульоне Мюллера-Хинтона в 11 последовательных разведениях. В 11 лунок планшета с биопленкой вносили по 200 мкл раствора антибиотика в последовательных разведениях. Отрицательным контролем служила 12 лунка планшета с биопленкой. Планшет с биопленкой и АБ инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 24 часов. В лунках планшета визуально определяли наличие роста. Минимальное разведение антибиотика, при котором не наблюдается роста бактерий, является МПК данного антибиотика для бактерий в составе биопленки.

С помощью разработанных методов культивирования и исследования микробных биоплёнок нами изучены свойства 192 клинических изолятов, выделенных от пациентов РЦИХ, а так же коллекционных штаммов *S.aureus* ATCC 6538, *P.aeruginosa* ATCC 9027, *E.coli* ATCC 8739. Среди изученных штаммов в той или иной степени способность формировать биоплёнку была обнаружена у 61,5% изолятов.

При изучении отдельных видов микроорганизмов обнаружено, что наиболее часто способность формировать биоплёнки встречалась у представителей *Acinetobacterspp.* (5 изолятов – 100%), *Enterobacteriaceae* (5 изолятов – 100%). Так же часто биоплёнку формировали представители *S.aureus* (37 изолятов – 65%), *P.aeruginosa* (65 изолятов – 61%). Наименее часто формировали микробные сообщества представители *S.epidermididis* (5 изолятов – 41,6%), *Streptococcusspp.* (1 изолят – 33%). Результаты представлены на рисунке 1.

При изучении результатов измерения толщины микробных биоплёнок обнаружено, что наиболее высокое значение данного параметра обнаружено в биоплёнках, сформированных изолятами *P.aeruginosa* ($79 \pm 3,2$ мкм). Изоляты *S.aureus* и *E.coli* формировали биоплёнку меньшей толщины ($56 \pm 2,3$ мкм и $41 \pm 1,9$ мкм, соответственно). Большое количество межклеточного матрикса и, соответственно, значительная толщина биопленки может существенно препятствовать проникновению антисептиков и антибиотиков к бактериям в составе биопленки, что приводит к снижению чувствительности микроорганизма к антибактериальным препаратам. Результаты определения толщины биоплёнки представлены на рисунке 2.

Для изучения выраженности способности формировать микробные биоплёнки в полистироловом планшете были изучены 57 изолятов *P.aeruginosa*, способных формировать микробные биоплёнки. При проведении учёта результатов выявлено, что 30% изолятов слабо формировали биоплёнку ($n=17$), 23% изолятов формировали биоплёнку в средней степени ($n=13$), 47% изолятов интенсивно формировали микробное сообщество ($n=27$). Результаты исследования представлены на рисунке 3.

Для изучения эффективности применения антибактериальных препаратов проведено сравнение МПК антибиотиков для планктонных форм бактерий и микроорганизмов в со-

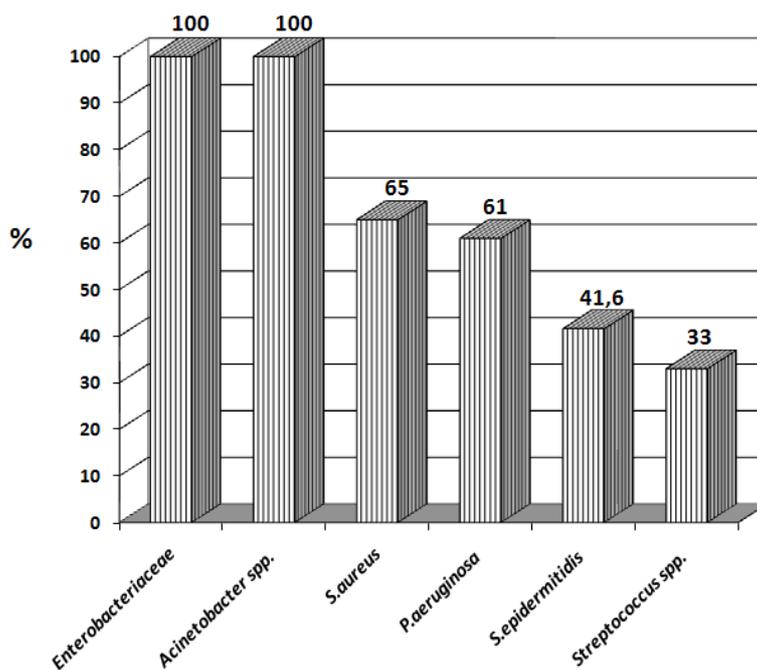


Рис. 1. Частота встречаемости способности микроорганизмов формировать биоплёнку

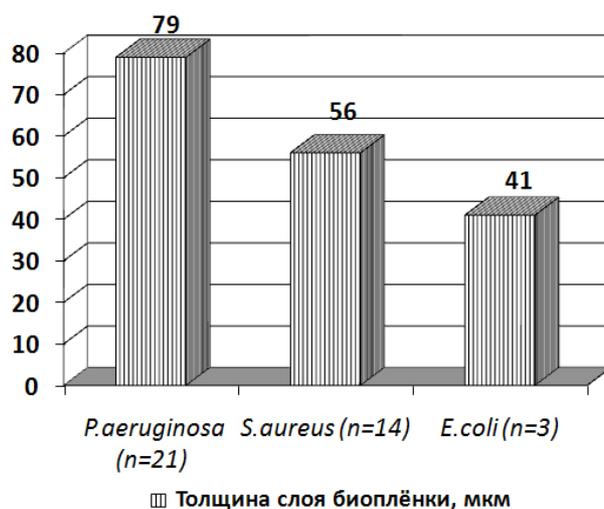


Рис. 2. Толщина матрикса микробных биоплёнок

ставе биоплёнок. В качестве критериев чувствительности изолята к антибиотикам использовались рекомендации Европейского комитета по тестированию антимикробной резистентности (EUCAST).

Изоляты *S.aureus* оказались наиболее чувствительны к ванкомицину и амикацину (100% чувствительных изолятов), а также к фторхинолонам: моксифлоксацин, ле-

вофлоксацин по 100% чувствительных изолятов, ципрофлоксацин - 93% чувствительных изолятов, ломефлоксацин - 86% чувствительных изолятов. Несколько большая резистентность была обнаружена к антибактериальным препаратам цефалоспоринового ряда. Так, чувствительность к цефалексину составила 79%, а к цефотаксиму - 72%. Результаты представлены в таблице 1.

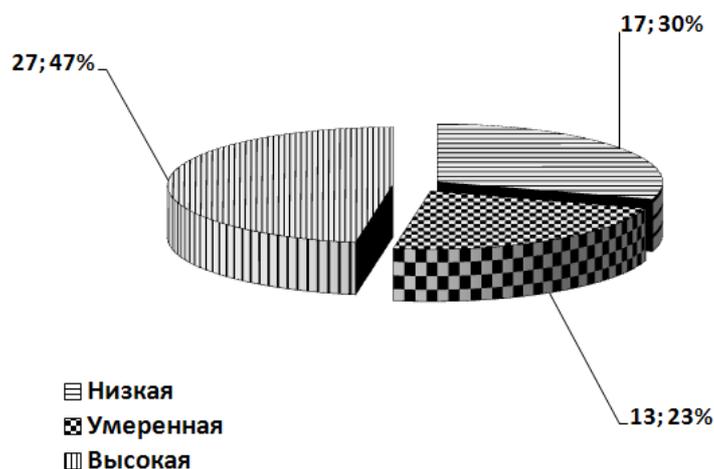


Рис. 3. Способность формировать биоплёнку изолятами *P. aeruginosa*

Таблица 1. Чувствительность клинических изолятов *S. aureus*, планктонные формы

	S, %	I, %	R, %	МПК ₅₀	МПК ₉₀	Средне-геометрическая МПК	Min/max	Квартили
Ломефлоксацин	86	7	7	0,5	2	0,48	0,1/5	0,2;1
Цефалексин	79	0	21	0,5	16	1,05	0,25/16	0,25; 8
Моксифлоксацин	100	0	0	0,1	0,2	0,134	0,1/0,2	0,1; 0,2
Левифлоксацин	100	0	0	0,1	0,5	0,15	0,05/0,5	0,1; 0,5
Амикацин	100	0	0	1	1,5	1,06	0,4/8	0,8; 1,5
Ципрофлоксацин	93	0	7	0,1	0,2	0,15	0,05/8	0,1; 0,2
Цефотаксим	72	0	28	1	16	2,2	0,5/32	1; 16
Ванкомицин	100	0	0	1	2	0,9	0,5/2	0,5; 2

Изоляты *S. aureus* в составе биоплёнки оказались наиболее чувствительны к фторхинолонам: ципрофлоксацин – 86%, левофлоксацин – 64%, моксифлоксацин и ломефлоксацин по 43% чувствительных изолятов. В значительной степени снизилась чувствительность микроорганизмов в составе биоплёнки по сравнению с планктонными формами для амикацина (со 100% до 36% чувствительных изолятов) и ванкомицина (со 100% до 0% чувствительных изолятов). Результаты представлены в таблице 2.

Изоляты *P. aeruginosa* оказались наиболее чувствительны к колистину, а так же комбинации пиперациллин+клавулат по 92% чувствительных изолятов. В меньшей степени были эффективны фторхинолоны: моксифлоксацин и ципрофлоксацин по 67% чувствительных изолятов, левофлоксацин – 58%. Наименьшая эф-

фективность в отношении клинических изолятов была выявлена у амикацина – 50% чувствительных изолятов и комбинации цефоперазон+клавулат – 33% чувствительных изолятов. Результаты представлены в таблице 3.

Изоляты *P. aeruginosa* в составе биоплёнки оказались резистентными ко всем изученным антибактериальным препаратам, что указывает на высокие защитные функции биоплёнки. В случае образования данными изолятами биоплёнки *in vivo* вероятное снижение эффективности применения данных антибиотиков в клинической практике. Результаты представлены в таблице 4.

При изучении чувствительности бактерий в составе биоплёнки выявлено, что МПК₉₀ изученных антибиотиков увеличилась от 2,5 до 300 раз по сравнению с планктонными формами

Таблица 2. Чувствительность клинических изолятов *S. aureus* в составе биоплёнки

	S, %	I, %	R, %	МПК ₅₀	МПК ₉₀	Средне-геометрическая МПК	Min/max	Квартили
Ломефлоксацин	43	0	57	2,2	4,8	2,07	0,6/19	0,25; 1,5
Цефалексин	14	0	86	112,5	300	45,8	2,4/600	4,8; 150
Моксифлоксацин	43	21	36	0,8	2,2	0,58	0,025/3,1	0,5; 1,1
Левифлоксацин	64	21	15	0,5	2,2	0,58	0,2/4,5	1,1; 4,5
Амикацин	36	28	36	9	19	8,4	0,5/38	4,8; 19
Ципрофлоксацин	86	0	14	1,1	1,5	0,9	0,2/19	0,4; 1,1
Цефотаксим	28	0	72	4,5	128	8,8	0,6/300	1,2; 64
Ванкомицин	0	0	100	19	600	37,6	4,5/600	4,8; 300

	S, %	I, %	R, %	МПК ₅₀	МПК ₉₀	Средне-геометрическая МПК	Min/max	Квартили
Амикацин	50	8	42	8	60	5,75	0,38/100	0,38; 60
Левифлоксацин	58	0	42	0,2	30	1,12	0,09/30	0,14; 24,5
Колистин	92	0	8	2	4	1,88	0,5/16	1; 3
Моксифлоксацин	67	0	33	0,2	16	0,8	0,04/16	0,19; 16
Ципрофлоксацин	67	8	25	0,04	16	0,15	0,005/16	0,02; 8,37
Цефоперазон+ клавуланат	33	0	67	32	128	30	4/128	8; 96

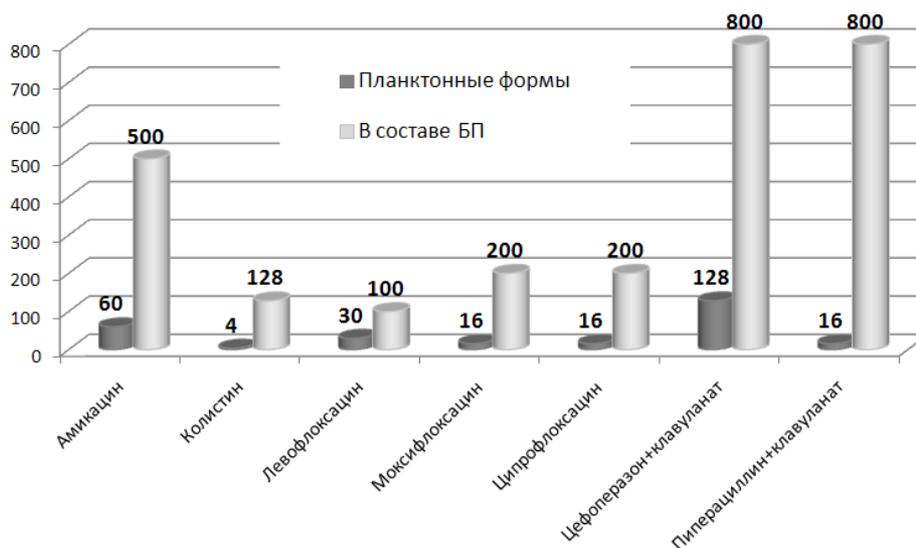
	S, %	I, %	R, %	МПК ₅₀	МПК ₉₀	Средне-геометрическая МПК	Min/max	Квартили
Амикацин	0	0	100	100	500	92	16/500	46,5; 162,5
Левифлоксацин	0	0	100	50	100	41,7	6/400	25; 75
Колистин	0	0	100	32	128	28,5	8/128	12; 48
Моксифлоксацин	0	0	100	62	200	61,3	16/500	40,5; 62
Ципрофлоксацин	0	0	100	62	200	38,5	2/500	12; 162
Цефоперазон+ клавуланат	0	0	100	800	800	800	400/800	800; 800
Пиперациллин+ клавуланат	0	0	100	800	800	800	800/800	800; 800

S. aureus. Результаты представлены на рисунке 4. Так же обнаружено, что МПК₉₀ изученных антибиотиков увеличилась от 10 до 50 раз для синегнойной палочки в составе биоплёнок по сравнению с планктонными формами. Результаты представлены на рисунке 5.

Выявлена достоверная сильная положительная корреляция между толщиной сформированной биоплёнки и количеством антибактериальных препаратов, к которым микроорганизм резистентный ($r=0,72$, $p<0,05$). Так же обнаружена достоверная положитель-



90 антибиотиков для планктонных форм



90 антибиотиков для планктонных форм

ная корреляция между толщиной биоплёнки и значением МПК для амикацина ($r=0,61$, $p<0,05$), левифлоксацина ($r=0,77$, $p<0,05$), ципрофлоксацина ($r=0,69$, $p<0,05$) и моксифлоксацина ($r=0,72$, $p<0,05$).

При оценке чувствительности *S.aureus* к антибактериальным препаратам выявлено, что моксифлоксацин и левифлоксацин оказались более эффективными препаратами для планктонных форм бактерий, чем

ципрофлоксацин, однако при определении чувствительности *S.aureus* в составе биоплёнки ципрофлоксацин оказался до 2 раз более эффективным препаратом. Полученные данные указывают, что определение чувствительности бактерий в составе биоплёнки к антибиотикам влияет на выбор антибактериального препарата, а так же на формирование протоколов эмпирической антибактериальной терапии.

1. Основные возбудители хирургической инфекции, выделенные из гнойных ран, в большинстве случаев (более 60%) обладают способностью формировать микробные сообщества – биоплёнки. При этом среди изученных микроорганизмов у представителей *Acinetobacterspp.* и *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* данная способность наиболее выражена, а у *S. epidermididis* и *Streptococcus spp.* наименее выражена.
2. Среди изученных возбудителей хирургической инфекции биоплёнку наибольшей толщины формируют представители *P. aeruginosa* (79±3,2 мкм). Изоляты *S. aureus* и *E. coli* формируют биоплёнку меньшей толщины (56±2,3 мкм и 41±1,9 мкм, соответственно). При этом обнаружена достоверная сильная корреляция между толщиной биопленки и резистентностью к антибиотикам.
3. Минимальная подавляющая концентрация-изученных антибиотиков для 90% изолятов

увеличивается до 300 раз для бактерий в составе биоплёнок по сравнению с их планктонными формами, что снижает их клиническую эффективность.

4. Изоляты *S. aureus* в составе биоплёнки наиболее чувствительны к представителям фторхинолонов, в то время как изоляты *P. aeruginosa* в составе биоплёнки резистентны ко всем изученным антибактериальным препаратам.
5. Определение чувствительности к антибактериальным препаратам бактерий в составе биоплёнки необходимо для назначения рациональной антибактериальной терапии пациенту с хирургической инфекцией, а также с целью разработки протоколов эмпирической антибактериальной терапии.

Работа выполнена в рамках грантов Белорусского фонда фундаментальных исследований M12M-071 от 15.04.2012г. и M14M-093 от 23.05.14г.

1. Скала Л.З., Сидоренко С.В., Нехорошева А.Г. и соавт. Практические аспекты современной клинической микробиологии. Москва, 2004: 15-78.
2. Яковлев В.П., Яковлев С.В. Изучение цефепима в России. Антибиотики и химиотерапия. 2004; 49 (10): 30-38.
3. Оболенский В.Н., Аронов Л.С., Родосан Г.В. и соавт.- Антибиотикопрофилактика, антибиотикотерапия и микробиологическая ситуация в хирургическом стационаре. Антибиотики и химиотерапия. 2004;49(10): 13-19.
4. Palmer RJ Jr, Stoodley P. Biofilms 2007: broadened horizons and new emphases. J Bacteriol. 2007; 189(22):7948-7960.
5. Davey ME, O'Toole GA. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2000; 64(4): 847-867.
6. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms Clinical Microbiology Reviews. 2002; 15(2):167-193.
7. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet. 2001; 358: 135-8.
8. Mah T-FC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends Microbiol. 2001;9:34-9.
9. Dongari-Bagtzoglou A. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. Exp. Rev. Anti. Infect. Ther. 2008; 6 (2): 201-208.
10. Кропец А., Maira-Litran T., Jefferson K.K. et al. Poly-N-acetyl-glucosamine production in *Staphylococcus aureus* is essential for virulence in murine models of systemic infection. Infect. Immun. 2005; 73 (10): 6868-6876.
11. Cerca N., Jefferson K.K., Oliveira R. et al. Comparative antibody-mediated phagocytosis of *Staphylococcus epidermidis*

cells grown in a biofilm or in the planktonic state. Infect. Immun. 2006; 74 (8): 4849-4855.

12. Fredheim E.G., Granslo H.N., Flaegstad T. et al. *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin activates complement. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2011; 63 (2): 269-280.
13. Steinberg D., Poran S., Shapira L. The effect of extracellular polysaccharides from *Streptococcus mutans* on the bactericidal activity of human neutrophils. Arch. Oral. Biol. 1999; 44 (5): 437-444.
14. Kharazmi A. Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*. Immunol. Lett. 1991; 30 (2): 201-205.
15. Katragkou A., Kruhlak M.J., Simitsopoulou M. et al. Interactions between human phagocytes and *Candida albicans* biofilms alone and in combination with antifungal agents. J. Infect. Dis. 2010; 201 (12): 1941-1949.
16. Meluleni G.J., Grout M., Evans D.J. et al. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm in vitro are killed by opsonic antibodies to the mucoidexopolysaccharide capsule but not by antibodies produced during chronic lung infection in cystic fibrosis patients. J. Immunol. 1995; 155 (4): 2029-2203.
17. Shanahan CA, Strobel SA. The bacterial second messenger c-di-GMP: probing interactions with protein and RNA binding partners using cyclic dinucleotide analogs. Org. Biomol. Chem. 2012; Vol. 10 (46): 9113-29.
18. Кабанова А.А., Плотников Ф.В. Метод определения способности микроорганизмов-возбудителей гнойно-воспалительных процессов челюстно-лицевой области формировать биопленки. Современная стоматология. – 2013. – №1. – С.82-84.

Сведения об авторах:

Плотников Филипп Викторович, магистр медицинских наук, аспирант кафедры хирургии ФПК и ПК УО «Витебский государственный медицинский университет».

Окулич Виталий Константинович, кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической микробиологии УО «Витебский государственный медицинский университет».

Кабанова Арина Александровна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры стоматологии детского возраста и ЧЛХ УО «Витебский государственный медицинский университет».

Шилин Владимир Евгеньевич, кандидат медицинских наук, старший преподаватель кафедры клинической микробиологии УО «Витебский государственный медицинский университет».

Адрес для корреспонденции: 210023г. Витебск, пр.Фрунзе, 27 Плотникову Ф.В. тел. +375-29-591-21-70, e-mail: dr.plotnikov@mail.ru, Плотников Ф.В.

Поступила 17.05.2014 г.