

Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Влияние антимикробных препаратов на биопленкообразование *Pseudomonas aeruginosa*

У.М. Немченко¹✉, К.О. Ситникова¹, Н.Л. Белькова¹✉, Е.В. Григорова¹, Н.М. Воропаева¹, М.В. Сухорева²,
Е.С. Сухарева², Е.Д. Савилов^{1,3}

¹ Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека, Иркутск, Россия

² Городская Ивано-Матренинская детская клиническая больница, Иркутск, Россия

³ Иркутская государственная медицинская академия последипломного образования – филиал Российской медицинской академии непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иркутск, Россия

✉ umnemch@mail.ru; nlbelkova@gmail.com

Аннотация. Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) относится к наиболее проблемным патогенам в лечебных учреждениях, что может быть связано со способностью этого микроорганизма существовать в биопленке, которая повышает его устойчивость к антимикробным препаратам, а также распространённость и выживаемость во внешней среде. Цель настоящей работы – оценка чувствительности штаммов *P. aeruginosa*, находящихся в планктонной форме и форме биопленки, к воздействию антимикробных препаратов. Исследовано 20 штаммов *P. aeruginosa* из рабочей коллекции лаборатории микробиома и микроэкологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, собранной в течение 2018–2021 гг. Идентификация штаммов проведена с использованием тест-систем для дифференциации грамотрицательных неферментирующих бактерий и подтверждена масс-спектрометрическим анализом и секвенированием гена 16S рРНК. Активность антимикробных препаратов оценивали по степени ингибирования роста клеток бактерий, находящихся в планктонной форме и форме биопленки. Установлено, что все клинические штаммы *P. aeruginosa* были биопленкообразующими, 47.6% относились к слабообразующим, 52.4% – к умереннообразующим. Планктонные клетки и формирующаяся биопленка тестируемых штаммов были устойчивы к карбапенемам. Формирование биопленки в более чем 90% случаев подавляло препараты групп цефалоспоринов и аминогликозидов. Чувствительность к воздействию антимикробных препаратов у штаммов *P. aeruginosa*, находящихся в сформированной биопленке, была значимо ниже ($p < 0.05$). Карбапенемы и цефалоспорины не воздействовали на зрелые биопленки тестируемых штаммов *P. aeruginosa* более чем в 60% случаев. Только не-бета-лактамы антибиотики (ципрофлоксацин и амикацин) подавляли рост планктонных клеток и разрушали зрелую биопленку. Выявленные различия в действии испытанных препаратов на биопленку штаммов *P. aeruginosa* коррелируют с устойчивостью к целому ряду антибиотиков. Для предупреждения формирования биопленок у больничных штаммов *P. aeruginosa* может быть рекомендовано применение цефтазидима, для воздействия на зрелые биопленки *P. aeruginosa* – антимикробные препараты цiproфлоксацин и амикацин.
Ключевые слова: *Pseudomonas aeruginosa*; биопленкообразование; антимикробные препараты; антибиотикорезистентность.

Для цитирования: Немченко У.М., Ситникова К.О., Белькова Н.Л., Григорова Е.В., Воропаева Н.М., Сухорева М.В., Сухарева Е.С., Савилов Е.Д. Влияние антимикробных препаратов на биопленкообразование *Pseudomonas aeruginosa*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2022;26(5):495-501. DOI 10.18699/VJGB-22-60

Effects of antimicrobials on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation

U.M. Nemchenko¹✉, K.O. Sitnikova¹, N.L. Belkova¹✉, E.V. Grigorova¹, N.M. Voropaeva¹, M.V. Sukhoreva²,
E.S. Sukhareva², E.D. Savilov^{1,3}

¹ Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems, Irkutsk, Russia

² City Ivano-Matreninskaya Children's Clinical Hospital, Irkutsk, Russia

³ Irkutsk State Medical Academy of Postgraduate Education – Branch Campus of the Russian Medical Academy of Continuing Professional Education of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Irkutsk, Russia

✉ umnemch@mail.ru; nlbelkova@gmail.com

Abstract. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most problematic pathogens in medical institutions, which may be due to the ability of this microorganism to exist in a biofilm, which increases its resistance to antimicrobials, as well as its prevalence and survival ability in the external environment. This work aimed to evaluate the antimicrobial susceptibility of *P. aeruginosa* strains in planktonic and biofilm forms. We studied 20 strains of *P. aeruginosa* collected during 2018–2021 by specialists from the Laboratory of Microbiome and Microecology of the Scientific Centre for

Family Health and Human Reproduction Problems. The identification of strains was carried out using test systems for differentiating gram-negative non-fermenting bacteria (NEFERMtest 24 Erba Lachema s.r.o., Czech Republic), and confirmed by mass spectrometric analysis and 16S rRNA gene sequencing. Antimicrobial activity was assessed by the degree of inhibition of cell growth in planktonic and biofilm forms (on a flat-bottomed 96-well plastic immunological plate). All clinical isolates of *P. aeruginosa* were biofilm formers, 47.6 % of the isolates were weak biofilm formers, and 52.4 % of the isolates were moderate biofilm formers. Planktonic cells and the forming biofilm of the tested *P. aeruginosa* strains were carbapenems-resistant. Biofilm formation was suppressed in more than 90 % of cases by the agents of the cephalosporin and aminoglycoside groups. Antimicrobial susceptibility of *P. aeruginosa* strains in the formed biofilm was significantly lower ($p < 0.05$). Carbapenems and cephalosporins did not affect the mature biofilms of the tested *P. aeruginosa* strains in more than 60 % of cases. Only non-beta-lactam antibiotics (ciprofloxacin and amikacin) suppressed the growth of planktonic cells and destroyed the mature biofilm. The revealed differences in the effect of the tested antimicrobials on the *P. aeruginosa* strains biofilms correlate with resistance to a number of antibiotics. To prevent biofilm formation in the hospital strains of *P. aeruginosa*, the use of ceftazidime may be recommended, and antimicrobials such as ciprofloxacin and amikacin may be used to affect mature biofilms of *P. aeruginosa*.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; biofilm formation; antimicrobial drugs; antibiotic resistance.

For citation: Nemchenko U.M., Sitnikova K.O., Belkova N.L., Grigorova E.V., Voropaeva N.M., Sukhoreva M.V., Sukhareva E.S., Savilov E.D. Effects of antimicrobials on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(5):495–501. DOI 10.18699/VJGB-22-60

Введение

Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*) неизменно занимает ведущее место среди возбудителей внутрибольничных инфекций в РФ и входит в группу бактерий-оппортунистов, объединенных термином ESKAPE (Склеенова и др., 2018). Наличие широкого спектра патогенетических факторов, генетическая пластичность, способность быстро приобретать резистентность к разным группам антибиотиков делает *P. aeruginosa* одним из самых проблемных патогенов в лечебных учреждениях (Эйделъштейн и др., 2019). Основной риск развития синегнойной инфекции приходится на пациентов с ослабленной иммунной системой, ожогами и травмами глаз, а также имеющих внутренние медицинские устройства (Diggle, Whiteley, 2020). Особо опасна синегнойная инфекция у пациентов с муковисцидозом (Kosztolowicz et al., 2020; Scherz et al., 2022).

Лечение инфекций, вызываемых *P. aeruginosa*, осложняется способностью этих бактерий существовать в биопленке, что повышает их устойчивость к антибиотикам, распространенность и выживаемость (de Abreu et al., 2014; Olivares et al., 2020). Показано, что уничтожение бактериальных биопленок, образующихся в выделяемом больными муковисцидозом секрете, является серьезной проблемой, поскольку диффузия антибиотиков в структуры биопленок слабая, а их антибактериальная активность может стимулировать лекарственную устойчивость (Kosztolowicz et al., 2020). Классические методы определения чувствительности к антибиотикам (определение минимальной подавляющей концентрации и диско-диффузионный метод) применяются на неадгезивных бактериях. Результаты, полученные с помощью этих методов, не могут предсказать терапевтический успех соответствующих антибиотиков против биопленок (Olivares et al., 2020). В настоящее время не существует руководств, помогающих клиницистам лечить биопленочные инфекции, что обосновывает актуальность разработки рутинных лабораторных методов определения чувствительности биопленочных бактерий к антибиотикам (Olivares et al., 2020).

Спектр антисинегнойных антибиотиков, к которым оценивается чувствительность в условиях *in vitro*, по мнению экспертов Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) включает пенициллины, группу цефалоспоринов, карбапенемы, монобактамы, фторхинолоны, аминогликозиды и полимиксины¹. В связи с этим мы изучили влияние на рост планктонных клеток, формирующуюся и зрелую биопленку *P. aeruginosa* представителей названных выше групп антимикробных препаратов (АМП): цефтазидима, цефепима, имипенема, меропенема, цiproфлоксацина и амикацина.

Цель исследования – оценка чувствительности штаммов *P. aeruginosa*, находящихся в планктонной форме и форме биопленки, к воздействию антимикробных препаратов.

Материалы и методы

Объектами исследования были 20 штаммов *P. aeruginosa* с подтвержденной лекарственной устойчивостью к антимикробным препаратам из рабочей коллекции лаборатории микробиома и микроэкологии Научного центра проблем здоровья семьи и репродукции человека, собранной в течение 2018–2021 гг. Типовой штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Национальный биоресурсный центр Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика, Москва) использовали в качестве контроля.

Больничные штаммы были изолированы от пациентов из двух лечебных учреждений г. Иркутска по принципу «один пациент – один изолят». Восемь культур было получено из Иркутской государственной областной детской клинической больницы (Носкова и др., 2020), 12 культур – из Городской Ивано-Матренинской детской клинической больницы. Культуры получены от пациентов с различными видами заболеваний (сепсис, острый гематогенный

¹ European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [Электронный ресурс]. Clinical breakpoints – breakpoints and guidance. URL: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (дата обращения: 15.10.2021).

остеомиелит, перитонит, пневмония и др.) и выделены из ротоглотки, ликвора, раны, эндотрахеальных трубок, трахеостомы, центрального венозного катетера (всего 14 культур). Отдельную группу составили культуры, выделенные из мокроты пациентов с таким генетическим заболеванием, как муковисцидоз (6 культур).

Идентификация штаммов *P. aeruginosa*. Первичная дифференциация штаммов *P. aeruginosa* проведена по морфологии колоний, пигменту на кровяном агаре, окрашиванию по Граму. Биохимическую идентификацию отобранных культур осуществляли с применением тест-систем для дифференциации грамотрицательных неферментирующих бактерий NEFERMtest 24 (Erba Lachema s.r.o., Чешская Республика) и подтверждали MALDI-TOF прямого белкового профилирования неспорообразующих микроорганизмов. Масс-спектрометрический анализ выполняли на приборе ultraflExtreme (Bruker Daltonics, Германия). Дополнительно культуры идентифицировали по фрагменту рибосомного оперона, содержащему V1–V4 переменные участки гена 16S рРНК. Полноразмерные фрагменты гена 16S рРНК штаммов *P. aeruginosa* зарегистрированы в международной базе данных GenBank под номерами OL616031–OL616034.

Для оценки влияния АМП на формирование биопленки и разрушение сформированных биопленок использовали антибиотики следующих групп: цефалоспорины, карбапенемы, аминогликозиды, фторхинолоны, в виде стандартных дисков индикаторных картонных с противомикробными лекарственными средствами ДИ-ПЛС-50-01 (ООО «НИЦФ» Россия), HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия).

Определение способности к биопленкообразованию и устойчивости биопленок к воздействию АМП с использованием 96-луночных пластиковых планшетов. Для анализа брали суточную культуру. Плотность инокулюма доводили в мясоептонном бульоне (МПБ) до 10^6 колониеобразующих Ед/мл. Подготовку штаммов, измерение оптической плотности культуры, окраску биопленок, определение интенсивности биопленкообразования путем измерения оптической плотности экстрактов генцианвиолет/этанол, расчет коэффициента биопленкообразования (КБП) проводили согласно описанным ранее методикам (Немченко и др., 2020; Grigороva et al., 2021).

Оценка способности АМП воздействовать на рост планктонных клеток и формирование биопленок. Для определения способности АМП воздействовать на планктонные клетки и формирующуюся биопленку в планшет одновременно с суточной культурой вносили по одному диску АМП с требуемой концентрацией антибиотика: цефтазидим – 10 мкг, цефепим – 30 мкг, имипенем – 10 мкг, меропенем – 10 мкг, ципрофлоксацин – 5 мкг, амикацин – 30 мкг. Контролем служил стерильный МПБ. Через 30 мин диски удаляли (Тапальский, Бильский, 2018), планшеты культивировали в термостате в течение 24 ч, далее эксперименты вели, как было описано ранее (Немченко и др., 2020; Grigороva et al., 2021).

Оценка способности АМП разрушать зрелые биопленки. Для определения способности АМП разрушать зрелую биопленку из планшета с исследуемыми культурами через 24 ч инкубации удаляли планктонные клетки,

трехкратно промывали стерильной дистиллированной водой и вносили в каждую лунку, включая контрольные, по 150 мкл стерильного МПБ и по одному диску АМП. Через 30 мин диски удаляли. Планшеты инкубировали еще 24 ч. Далее порядок действий был аналогичен ранее изложенному (Немченко и др., 2020; Grigороva et al., 2021).

Учет результатов эксперимента. Коэффициент биопленкообразования рассчитывали после измерения оптической плотности этанольного экстракта окрашенных лунок во всех планшетах как отношение оптическая плотность экстракта опыт/оптическая плотность экстракта контроль. При полученных значениях КБП менее 2.0 штаммы относили к слабообразующим биопленку, при значениях 2.0–3.9 – к умереннообразующим, выше 3.9 – к высокообразующим биопленку (Немченко и др., 2020; Grigороva et al., 2021).

Коэффициент влияния АМП на формирующуюся и зрелую биопленку рассчитывали по формуле

$$\text{ОП БП}_{\text{форм}}/\text{ОП БП}_{\text{без АМП}} \text{ или } \text{ОП БП}_{\text{зрел}}/\text{ОП БП}_{\text{без АМП}}$$

где ОП БП_{форм} или ОП БП_{зрел} – оптическая плотность этанольного экстракта биопленки, подвергшейся влиянию АМП, ОП БП_{без АМП} – оптическая плотность этанольного экстракта биопленок культур, не подвергавшихся влиянию АМП. При коэффициенте < 0.9 считали, что АМП влияет на биопленку; от 0.9 до 1.0 – АМП слабо влияет на биопленку; от 1.0 и выше – АМП не влияет на биопленку.

Прирост планктонных клеток в лунках планшета определяли как отношение оптической плотности суспензии планктонных клеток бактерий через 24 ч культивирования к исходной плотности, результат интерпретировали, как было описано ранее (Немченко и др., 2020; Grigороva et al., 2021).

Статистическая обработка данных произведена при помощи лицензионных прикладных программ MS Excel 2007 for Windows 7. Для оценки значимости различий между двумя группами по уровню какого-либо признака применяли непараметрические критерии: χ^2 , *U*-критерий Манна–Уитни. Для качественных переменных рассчитывались абсолютные и относительные (процентные) величины. Уровень значимости при проверке статистических гипотез (*p*) принят равным 0.05.

Результаты

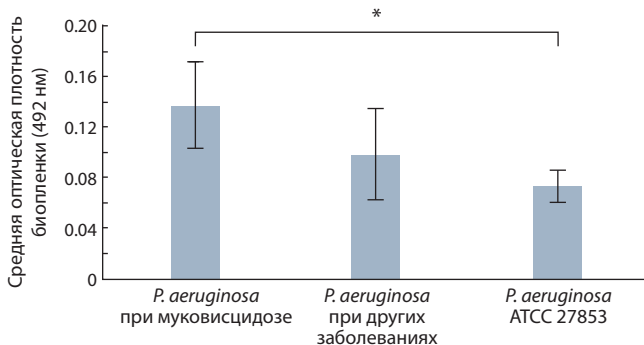
Установлено, что в лабораторных условиях без воздействия АМП планктонные клетки *P. aeruginosa* обладают значительной скоростью роста (табл. 1). Плотность микробных клеток увеличилась за 24 ч культивирования более чем в 10 раз по сравнению с начальной ($U_{\text{эмп}} = 0$, различия, значимые между исходной плотностью и плотностью через 24 ч, критерий Манна–Уитни).

Оптическая плотность биопленки культур *P. aeruginosa*, выделенных из мокроты при таком тяжелом генетически обусловленном заболевании, как муковисцидоз, была значительно больше, чем типового штамма ($p < 0.01$) и культуры, изолированных при других заболеваниях (см. рисунок). Аналогичная закономерность отмечается и при сравнении КБП. В среднем КБП МВ *P. aeruginosa* 2.79 ± 0.78 ; *P. aeruginosa* при других заболеваниях 2.01 ± 0.69 ; *P. aeruginosa* ATCC 27853 – 1.56.

Таблица 1. Характеристика тестируемых штаммов *P. aeruginosa* по скорости роста и интенсивности биопленкообразования

Показатель	Градация показателя	Штаммы, %	
Интенсивность прироста	Отсутствует	0	
	Слабая	0	
	Значительная	100	
Биопленкообразование	Отсутствует	0	
	Слабое	47.6	
	Умеренное	52.4	
Параметр	<i>P. aeruginosa</i> при муковисцидозе	<i>P. aeruginosa</i> при других заболеваниях	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Среднее значение оптической плотности биопленки ¹	0.137	0.098	0.073
Среднее значение оптической плотности МПБ (контроль)	0.047	0.047	0.047
Среднее значение КБП	2.79	2.01	1.56

Примечание. ¹ Разница значима между оптической плотностью экстрактов генцианвиолет/этанол культур при муковисцидозе и оптической плотностью экстрактов генцианвиолет/этанол *P. aeruginosa* ATCC 27853, $U_{эмп} = 1$ критерий Манна–Уитни, $p < 0.01$. МПБ – мясо-пептонный бульон; КБП – коэффициент биопленкообразования.



Среднее значение оптической плотности биопленки тестируемых штаммов *P. aeruginosa*.

* Разница значима между оптической плотностью биопленки культур при муковисцидозе и оптической плотностью биопленки *P. aeruginosa* ATCC 27853, $U_{эмп} = 1$ критерий Манна–Уитни, $p < 0.01$.

Оценка способности к биопленкообразованию по количеству красителя, связавшегося с биопленкой, показала, что исследуемые штаммы, в том числе типовой штамм *P. aeruginosa* ATCC 27853, в 47.6 % были слабообразующими биопленку, в 52.4 % случаев – умереннообразующими биопленку (см. табл. 1).

Сравнение оптической плотности культур, рост которых происходил без воздействия и под воздействием АМП, выявило, что планктонные клетки были устойчивы к АМП имипенему (5 % чувствительных культур, $U_{эмп} = 46$) и меропенему (5 % чувствительных культур, $U_{эмп} = 64.5$; есть разница между начальной и плотностью через 24 ч, критерий Манна–Уитни, $p < 0.05$). Остальные препараты подавляли рост планктонных клеток, наиболее эффективными были амикацин (60 % чувствительных культур, $U_{эмп} = 180.5$) и цiproфлоксацин (50 % чувствительных

культур, $U_{эмп} = 191.5$), цефепим воздействовал на 40.0 % культур ($U_{эмп} = 191.5$), цефтазидим в 35 % случаев подавлял рост культур *P. aeruginosa* ($U_{эмп} = 179.0$) (нет разницы между начальной и плотностью через 24 ч, критерий Манна–Уитни, $p > 0.05$).

Изучение способности АМП воздействовать на формирующиеся и разрушать зрелые биопленки

Способность АМП воздействовать на формирование биопленок культурами *P. aeruginosa* оценивали по соотношению оптической плотности биопленок, подвергшихся влиянию АМП, к оптической плотности биопленок без воздействия АМП.

Проведенные исследования показали, что не все АМП препятствовали образованию биопленки (табл. 2). Цiproфлоксацин не влиял на биопленкообразование в 23.8 % случаев, имипенем и меропенем – в 33.3 и 38.1 % случаев соответственно; наиболее эффективно подавляли образование биопленок цефтазидим, цефепим и амикацин. Значимые различия установлены только для цефтазидима, который наиболее действенно подавлял образование биопленок по сравнению с имипенемом ($\chi^2 = 5.62$) и меропенемом ($\chi^2 = 7.03$) ($p < 0.05$).

Чувствительность к воздействию АМП клеток *P. aeruginosa*, находящихся в зрелой биопленке, была ниже, чем у формирующихся биопленок (критерий Манна–Уитни, разница значима между оптической плотностью формирующейся биопленки и зрелых биопленок, $p < 0.05$). АМП цефтазидим, цефепим, имипенем и меропенем слабо воздействовали или не воздействовали на биопленки *P. aeruginosa*, соотношение БП_{зрел}/БП_{без АМП} было от 0.9 и выше в более 60 % случаев. На сформированную биопленку воздействовали только такие не-бета-лактамы антибиотиками, как амикацин и цiproфлоксацин (табл. 3). Сравнение действия АМП между собой показало, что

Таблица 2. Способность АМП воздействовать на формирование биопленки тестируемых штаммов *P. aeruginosa* (абсолютное значение/%)

Антимикробный препарат	Соотношение ОП БП _{форм} /ОП БП _{без АМП}		
	< 0.9	от 0.9 до 1.0	от 1.0 и выше
Цефтазидим ¹	19/95	1/5	–
Цефепим ²	18/90	–	2/10
Амикацин ²	18/90	–	2/10
Ципрофлоксацин ²	15/75	–	5/25
Имипенем ²	13/65	2/10	5/25
Меропенем ²	12/60	2/10	6/30

¹ Цефтазидим воздействует на биопленкообразование при сравнении с имипенемом и меропенемом, $p < 0.05$; ² нет разницы при сравнении воздействия между другими АМП, $p > 0.05$. ОП БП_{форм} – оптическая плотность формирующейся биопленки под воздействием АМП/ОП БП_{без АМП} – оптическая плотность биопленки без воздействия АМП; АМП – антимикробные препараты.

амикацин был наиболее эффективен, чем цефтазидим ($\chi^2 = 5.01$) и меропенем ($\chi^2 = 10.98$), ципрофлоксацин эффективнее, чем меропенем ($\chi^2 = 7.62$).

Коэффициент биопленкообразования штаммов *P. aeruginosa*, находящиеся в сформированной биопленке, был значимо выше, чем КБП культур, подвергшихся воздействию АМП на этапе формирования биопленки, что также подтверждает устойчивость зрелой биопленки. Коэффициент биопленкообразования для цефтазидима_{форм/зрел} $U_{эмп} = 48.5$; цефепима_{форм/зрел} $U_{эмп} = 58$; имипенема_{форм/зрел} $U_{эмп} = 94$; меропенема_{форм/зрел} $U_{эмп} = 79$; ципрофлоксацина_{форм/зрел} $U_{эмп} = 97$; амикацина_{форм/зрел} $U_{эмп} = 50$. Есть разница между значениями КБП формирующейся и КБП зрелой биопленки, критерий Манна–Уитни, $p < 0.01$.

Обсуждение

В эксперименте показано, что не все АМП подавляли рост планктонных клеток клинических изолятов *P. aeruginosa*. Резистентность к антисинегнойным цефалоспорином (цефтазидиму и цефепиму) проявляли соответственно 65 и 60 % тестируемых штаммов. Резистентность к карбапенемам (имипенему и меропенему) была отмечена практически у всех изолятов. К не-бета-лактамам антибиотикам (амикацину и ципрофлоксацину) были устойчивы 40 и 50 % штаммов соответственно. Полученные данные согласуются как с нашими предыдущими работами (Носкова и др., 2020), так и с проведенным многоцентровым эпидемиологическим исследованием антибиотикорезистентности возбудителей нозокомиальных инфекций («МАРАФОН» 2015–2016 гг.), в котором отмечался рост резистентности внутрибольничных штаммов *P. aeruginosa* к большинству АМП, включая карбапенемы (Эйдельштейн и др., 2019).

Исследуемые штаммы, особенно выделенные от больных с муковисцидозом, были биопленкообразующими (см. табл. 1). Это послужило нам основанием для оценки эффективности воздействия АМП на формирующуюся биопленку нозокомиальных патогенов. В ходе экспе-

Таблица 3. Способность различных АМП воздействовать на зрелую биопленку тестируемых штаммов *P. aeruginosa* (абсолютное значение/%)

Антимикробный препарат	Соотношение ОП БП _{зрел} /ОП БП _{без АМП}		
	< 0.9	от 0.9 до 1.0	от 1.0 и выше
Амикацин ¹	12/60	3/15	5/25
Ципрофлоксацин ²	10/50	–	10/50
Цефтазидим	5/25	3/15	12/60
Цефепим	8/40	–	12/60
Имипенем	6/30	–	14/70
Меропенем	2/10	4/20	14/70

¹ Амикацин разрушает зрелую биопленку при сравнении с цефтазидимом ($p = 0.02$) и меропенемом ($p < 0.001$); ² ципрофлоксацин разрушает зрелую биопленку при сравнении с меропенемом ($p < 0.05$). ОП БП_{зрел} – оптическая плотность зрелой биопленки под воздействием АМП/ОП БП_{без АМП} – оптическая плотность биопленки без воздействия АМП; АМП – антимикробные препараты.

римента установлено, что по сравнению с другими антибиотиками самым эффективным препаратом, препятствующим биопленкообразованию, был цефтазидим (см. табл. 2).

Как свидетельствуют последние исследования, кроме классических механизмов устойчивости, бактерии способны выдерживать воздействие высоких концентраций антибиотика, проявляя так называемую толерантность (Brauner et al., 2016; Yan, Bassler, 2019). Толерантные бактерии растут медленнее, чем их нетолерантные аналоги, и могут избежать гибели при лечении антибиотиками (Brauner et al., 2016). Другую форму толерантности, проявляющуюся не в результате наследственных мутаций, а, скорее, в ходе фенотипической дифференциации, принято называть персистенцией. Зависимое от времени уничтожение бактериальной популяции антибиотиками показывает, что активно растущие клетки погибают первыми, тогда как клетки-персистеры гибнут во второй фазе с гораздо меньшей скоростью. Именно эта подгруппа микроорганизмов выживает во время лечения антибиотиками и восстанавливается после их отмены (Balaban et al., 2004).

Предполагается, что способность биопленок содержать толерантные и персистирующие клетки лежит в основе трудностей, возникающих при устранении биопленок (Lewis, 2012). Вероятно, повышенная толерантность к антибиотикам возникает из-за измененной физиологии клеток биопленок. Считается также, что клетки внутри биопленок могут находиться в стационарной фазе, когда проникновение питательных веществ и кислорода ограничено из-за потребления периферически расположенными клетками (Yan, Bassler, 2019). Наличие клеток-персистеров может быть опасно для определенных групп пациентов, например с муковисцидозом, когда мутанты с высокой персистирующей способностью выделяются после длительного лечения антибиотиками (Lewis, 2012).

Представленные исследования выявили, что чувствительность к воздействию АМП клеток, находящихся в зрелых биопленках, была значимо ниже; тестируемые антибиотики в основном не разрушали биопленки культур *P. aeruginosa*, ББП у культур в зрелых биопленках был выше, чем у культур, на которые АМП действовал во время формирования биопленки ($p < 0.01$).

Из всех протестированных АМП только не-бета-лактамы антибиотики (ципрофлоксацин и амикацин) подавляли рост планктонных клеток и разрушали зрелую биопленку, что может быть связано с механизмом действия разных классов антибиотиков. Находящиеся в биопленке клетки снижают скорость деления клеток, вследствие чего они менее чувствительны к воздействующим на клеточную стенку бета-лактамам антибиотикам, тогда как действие цiproфлоксацина и амикацина не требует активно делящихся клеток, поскольку нацелено на транскрипционные и трансляционные процессы (Сидоренко и др., 2013; Thieme et al., 2021).

Самым эффективным подходом для предотвращения образования биопленки будет ингибирование адгезивной способности клеток (Olivares et al., 2020). Так, в исследовании (Otan et al., 2018) показано, что субингибирующие минимальные подавляющие концентрации цефтазидима уменьшают массу биопленки, подавляют подвижность и экспрессию генов, участвующих в бактериальной адгезии и продукции матрикса *P. aeruginosa* PAO1. Ранее S. Roudashti с коллегами (2017) заметили влияние цефалоспоринов на системы QS *P. aeruginosa*, обеспечивающие подвижность и образование биопленок у этих микроорганизмов. В нашей работе цефтазидим также проявлял наибольшую антибиопленочную активность по сравнению с другими АМП. Однако механизм устойчивости биопленок к АМП сложен, многофакторен и противоречив. Подтверждением высказанного положения служат многочисленные исследования, демонстрирующие, что низкие дозы противомикробных препаратов в очаге инфекции могут увеличивать риск мутагенеза и инициируют образование биопленок (Kaplan, 2011; Ciofu et al., 2015; Olivares et al., 2020).

Заключение

Таким образом, изучение влияния АМП групп цефалоспоринов, карбапенемов, фторхинолонов и аминогликозидов на биопленки тестируемых больничных штаммов *P. aeruginosa* показало, что антисинегнойные препараты в основном препятствовали образованию биопленки, но не разрушали уже сформированную биопленку. Выявленные значительные различия в действии испытанных АМП как на зрелую биопленку штаммов *P. aeruginosa*, так и на процесс ее формирования в определенной степени коррелируют с устойчивостью данного микроорганизма к целому ряду антибиотиков (Эйдельштейн и др., 2019; Аджиева и др., 2021). Для выяснения задействованных механизмов необходимы дополнительные исследования, направленные на обнаружение толерантных и персистирующих клеток, что позволит оптимизировать общее использование противомикробных препаратов при лечении инфекций, связанных с биопленками (Yan, Bassler, 2019). Для предупреждения формирования биопленок

у больничных штаммов *P. aeruginosa* может быть рекомендовано применение цефтазидима, для воздействия на зрелые биопленки *P. aeruginosa* – АМП амикацина и цiproфлоксацина.

Список литературы / References

- Аджиева А.А., Данилова Т.А., Данилина Г.А., Шевлягина Н.В., Минко А.Г., Жуховицкий В.Г. Влияние антибиотиков на образование биопленки *Streptococcus pyogenes* в условиях *in vitro*. *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2021; 98(1):59-64. DOI 10.36233/0372-9311-64.
- [Adzhieva A.A., Danilova T.A., Danilina G.A., Shevlyagina N.V., Minko A.G., Zhukhovitsky V.G. Influence of antibiotics on biofilm formation by *Streptococcus pyogenes* in vitro. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(1):59-64. DOI 10.36233/0372-9311-64. (in Russian)]
- Немченко У.М., Кунгурцева Е.А., Григорова Е.В., Белькова Н.Л., Маркова Ю.А., Носкова О.А., Чemezova Н.Н., Савилов Е.Д. Моделирование бактериальных биопленок и оценка чувствительности возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, к дезинфицирующему средству Секусепт актив. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020;65(10):652-658. DOI 10.18821/0869-2084-2020-65-10-652-658.
- [Nemchenko U.M., Kungurtseva E.A., Grigороva E.V., Belkova N.L., Markova Y.A., Noskova O.A., Chemezova N.N., Savilov E.D. Simulation of bacterial biofilms and estimation of the sensitivity of healthcare-associated infection pathogens to bactericide Sekusept active. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*. 2020;65(10):652-658. DOI 10.18821/0869-2084-2020-65-10-652-658. (in Russian)]
- Носкова О.А., Савилов Е.Д., Чemezova Н.Н., Белькова Н.Л. Антибиотикорезистентность возбудителей генерализованных гнойно-септических инфекций у детей. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2020;19(6):56-61. DOI 10.31631/2073-3046-2020-19-6-56-61.
- [Noskova O.A., Savilov E.D., Chemezova N.N., Belkova N.L. Antibiotic resistance of pathogens of generalized purulent septic infections in children. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2020;19(6):56-61. DOI 10.31631/2073-3046-2020-19-6-56-61. (in Russian)]
- Сидоренко С.В., Партина И.В., Агеевец В.А. Имипенем: 30 лет терапии. *Антибиотики и химиотерапия*. 2013;58(5-6):55-61.
- [Sidorenko S.V., Partina I.V., Ageevets V.A. Imipenem: 30-year experience in therapy. *Antibiotiki i Khimioterapiya = Antibiotics and Chemotherapy*. 2013;58(5-6):55-61. (in Russian)]
- Склеенова Е.Ю., Азизов И.С., Шек Е.А., Эйдельштейн М.В., Козлов Р.С., Дехнич А.В. *Pseudomonas aeruginosa* в РФ: история одного из наиболее успешных нозокомиальных патогенов. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018;3:164-171. DOI 10.36488/cmac.2018.3.164-171.
- [Skleenova E.Yu., Azizov I.S., Shek E.A., Edelstein M.V., Kozlov R.S., Dekhnich A.V. *Pseudomonas aeruginosa*: the history of one of the most successful nosocomial pathogens in Russian hospitals. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;3:164-171. DOI 10.36488/cmac.2018.3.164-171. (in Russian)]
- Тапальский Д.В., Бильский И.А. Определение чувствительности к антибиотикам методом микроразведений в бульоне: модификация, доступная для всех. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018;1:62-67. DOI 10.36488/cmac.2018.1.62-67.
- [Tapalskiy D.V., Bilskiy I.A. Antimicrobial susceptibility testing by broth microdilution method: widely available modification. *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;1:62-67. DOI 10.36488/cmac.2018.1.62-67. (in Russian)]

- Эйделштейн М.В., Шек Е.А., Сухорукова М.В., Скленова Е.Ю., Иванчик Н.В., ... Звонарева О.В., Корнилова П.А., Крянга В.Г., Портнягина У.С., Шамаева С.Х. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «МАРАФОН 2015–2016». *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019;21(2):160-170. DOI 10.36488/смас.2019.2.160-170.
- [Edelstein M.V., Shek E.A., Sukhorukova M.V., Skleenova E.Yu., Ivanchik N.V., ... Zvonaryova O.V., Kornilova P.A., Kryanga V.G., Portnyagina U.S., Shamaeva S.Kh. Antimicrobial resistance, carbapenemase production and genotypes of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "MARATHON 2015–2016". *Klinicheskaya Mikrobiologiya i Antimikrobnaya Khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;21(2):160-170. DOI 10.36488/смас.2019.2.160-170. (in Russian)]
- Balaban N.Q., Merrin J., Chait R., Kowalik L., Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. *Science*. 2004;305(5690):1622-1625. DOI 10.1126/science.1099390.
- Brauner A., Fridman O., Gefen O., Balaban N.Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* 2016;14(5):320-330. DOI 10.1038/nrmicro.2016.34.
- Ciofu O., Tolker-Nielsen T., Jensen P.O., Wang H., Hoiby N. Antimicrobial resistance, respiratory tract infections and role of biofilms in lung infections in cystic fibrosis patients. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015;85:7-23. DOI 10.1016/j.addr.2014.11.017.
- de Abreu P.M., Farias P.G., Paiva G.S., Almeida A.M., Morais P.V. Persistence of microbial communities including *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital environment: a potential health hazard. *BMC Microbiol.* 2014;14:118. DOI 10.1186/1471-2180-14-118.
- Diggle S.P., Whiteley M. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology*. 2020;166(1):30-33. DOI 10.1099/mic.0.000860.
- Grigorova E.V., Nemchenko U.M., Voropaeva N.M., Bel'kova N.L., Noskova O.A., Savilov E.D. Effect of disinfectants with different active ingredients on biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021;171(6):745-749. DOI 10.1007/s10517-021-05308-y.
- Kaplan J.B. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int. J. Artif. Organs*. 2011;34(9):737-751. DOI 10.5301/ijao.5000027.
- Kosztolowicz T., Metzler R., Waşik S., Arabski M. Modelling experimentally measured of ciprofloxacin antibiotic diffusion in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formed in artificial sputum medium. *PLoS One*. 2020;15(12):e0243003. DOI 10.1371/journal.pone.0243003.
- Lewis K. Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. In: Coates A. (Ed.). *Antibiotic Resistance. Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin; Heidelberg: Springer, 2012; 211:121-133. DOI 10.1007/978-3-642-28951-4_8.
- Olivares E., Badel-Berchoux S., Provot C., Prévost G., Bernardi T., Jehl F. Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *Front Microbiol.* 2020;10:2894. DOI 10.3389/fmicb.2019.02894.
- Otani S., Hiramatsu K., Hashinaga K., Komiya K., Umeki K., Kishi K., Kadota J.-I. Sub-minimum inhibitory concentrations of ceftazidime inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J. Infect. Chemother.* 2018;24(6):428-433. DOI 10.1016/j.jiac.2018.01.007.
- Roudashti S., Zeighami H., Mirshahabi H., Bahari S., Soltani A., Haghi F. Synergistic activity of sub-inhibitory concentrations of curcumin with ceftazidime and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing related genes and virulence traits. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2017;33(3):50. DOI 10.1007/s11274-016-2195-0.
- Scherz V., Caruana G., Taffé P., Brouillet R., Bertelli C., Jatton K., Asner S.A. Unexpected associations between respiratory viruses and bacteria with Pulmonary Function Testing in children suffering from Cystic Fibrosis (MUCOVIB study). *J. Cyst. Fibros.* 2022;21(2):e158-e164. DOI 10.1016/j.jcf.2021.10.001.
- Thieme L., Hartung A., Tramm K., Graf J., Spott R., Makarewicz O., Pletz M.W. Adaptation of the Start-Growth-Time method for high-throughput biofilm quantification. *Front. Microbiol.* 2021;12:631248. DOI 10.3389/fmicb.2021.631248.
- Yan J., Bassler B.L. Surviving as a community: antibiotic tolerance and persistence in bacterial biofilms. *Cell Host Microbe*. 2019;26(1):15-21. DOI 10.1016/j.chom.2019.06.002.

ORCID ID

U.M. Nemchenko orcid.org/0000-0002-7656-342X
K.O. Sitnikova orcid.org/0000-0001-7717-906X
N.L. Belkova orcid.org/0000-0001-9720-068X
E.V. Grigorova orcid.org/0000-0001-6588-2591
N.M. Voropaeva orcid.org/0000-0001-7026-2522
E.D. Savilov orcid.org/0000-0002-9217-6876

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.03.2022. После доработки 30.06.2022. Принята к публикации 30.06.2022.