

3
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>



2017
ГОД ЭКОЛОГИИ
В РОССИИ

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



2017

УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© С.Б. Фадеев, 2017

УДК 616.379-008.64-06:617.586-002.3-085

С.Б. Фадеев

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ АНТИБИОТИКОВ НА МЕЖМИКРОБНЫЕ ВЗАИМООТНОШЕНИЯ В АССОЦИАЦИЯХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНОЙНО- НЕКРОТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ II ТИПА

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия
Оренбургский государственный медицинский университет МЗ РФ, Оренбург, Россия

Цель. Определить влияние антибиотиков на межмикробные взаимоотношения в ассоциациях стафилококков и энтеробактерий – возбудителей гнойно-некротических процессов у больных сахарным диабетом II типа.

Материалы и методы. Исследование проведено на 10 парах ассоциаций микроорганизмов, изолированных из очагов хирургической инфекции мягких тканей: 4 ассоциации *Staphylococcus aureus* + *Escherichia coli*, 3 ассоциации *S. aureus* + *Klebsiella pneumoniae* и 3 ассоциации *S. aureus* + *Enterobacter cloacae* с определением влияния супернатантов микроорганизмов на рост и формирование биопленок бактериями-ассоциантами.

Результаты. Установлено, что стимулирующее действие *S. aureus* на формирование биопленок энтеробактериями-ассоциантами может усиливаться после предварительной обработки стафилококков суббактериостатическими концентрациями цефотаксима, цiproфлоксацина, азитромицина и кларитромицина. Показано, что это усиление нивелируется, если влияние супернатанта реализуется в присутствии цiproфлоксацина, азитромицина или кларитромицина и сохраняется - в присутствии цефотаксима.

Заключение. Выявленные особенности стимулирующего воздействия *S. aureus* на формирование биопленок энтеробактериями-ассоциантами следует учитывать в реализации персонализированного подхода к лечению гнойно-некротических процессов у больных сахарным диабетом II типа.

Ключевые слова: ассоциации микроорганизмов, антибиотики, рост бактерий, биопленки, сахарный диабет II типа.

S.B. Fadeev

FEATURES OF THE INFLUENCE OF ANTIBIOTICS ON INTER-MICROBIAL RE- LATIONSHIP IN ASSOCIATIONS OF PATHOGENS OF PURULENT-NECROTIC PROCESSES IN PATIENTS WITH TYPE II DIABETES MELLITUS

Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia
Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

Objective. The determination of the influence of antibiotics on intermicrobial interactions in associations of staphylococci and enterobacteria - pathogens of purulent-necrotic processes in patients with type II diabetes mellitus.

Materials and methods. The study was carried out on 10 pairs of microorganism associations isolated from foci of soft tissue surgical infection: 4 *Staphylococcus aureus* + *Escherichia coli* associations, 3 associations of *S. aureus* + *Klebsiella pneumoniae* and 3 associations of *S. aureus* + *Enterobacter cloacae*. The effect of microorganism supernatants on the growth and formation of biofilms by bacterial associates was determined.

Results. The stimulating effect of *S. aureus* on the formation of biofilms by enterobacteria-associates can be enhanced after preliminary treatment of staphylococci with sub-bacteriostatic

concentrations of cefotaxime, ciprofloxacin, azithromycin, and clarithromycin has been established. This enhancement is leveled if this effect is realized in the presence of ciprofloxacin, azithromycin or clarithromycin and is preserved in the presence of cefotaxime.

Conclusion. The revealed features of the stimulating effect of *S. aureus* on the formation of biofilms by enterobacteria-associates should be taken into account in the realization of a personified approach to the treatment of purulent-necrotic processes in patients with type II diabetes mellitus.

Keywords: association of microorganisms, antibiotics, bacterial growth, biofilms, type II diabetes mellitus.

Введение

Сложность лечения гнойных процессов у больных сахарным диабетом обусловлена не только развитием микро- и макроангиопатий, диабетической полинейропатии, но и особенностями видового состава и биологических свойств возбудителей гнойно-некротической патологии [1, 2]. В ряде работ показано, что микробных пейзаж очагов хирургической инфекции у больных сахарным диабетом II типа нередко представлен ассоциациями микроорганизмов [3, 4]. Однако традиционно антибактериальная терапия таких пациентов проводится по результатам анализа антибиотикочувствительности только одного микроорганизма, доминирующего в выделенной ассоциации бактерий и считающегося истинным возбудителем гнойного процесса [5]. При этом эффективность проводимой антибактериальной терапии остается недостаточной [6]. Есть мнение, что полимикробные инфекции можно рассматривать как небольшие микробные экосистемы, поэтому актуальность вопроса о взаимодействии бактерий в этих сообществах, о стабильности этой микробной экосистемы в условиях антимикробной терапии не вызывает сомнения [7].

Цель работы – определить *in vitro* влияние антибиотиков на межмикробные взаимоотношения в ассоциациях стафилококков и энтеробактерий – возбудителей гнойно-некротических процессов у больных сахарным диабетом II типа.

Материалы и методы

Исследование проведено на 10 парах ассоциаций микроорганизмов, изолированных из очагов хирургической инфекции мягких тканей у больных сахарным диабетом II типа: 4 ассоциации *Staphylococcus aureus*+*Escherichia coli*, 3 ассоциации *S. aureus*+*Klebsiella pneumoniae* и 3 ассоциации *S. aureus*+*Enterobacter cloacae*, с определением влияния супернатантов микроорганизмов на рост и формирование биопленок бактериями-ассоциантами. В работе использовались антибиотики гентамицин (гентамицин-АКОС), ОАО «Син-

тез», Россия), цефотаксим (цефотаксим-АКОС, ОАО «Синтез», Россия), ципрофлоксацин (ципрофлоксацин, ПРОМЕД ЭКСПОРТС ПВТ, ЛТД, Индия), азитромицин (Сумамед, Pliva Hrvatska d.o.o., Хорватия), кларитромицин (Клацид, Abbott France, Франция). Штаммы выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ), содержащем 1/2 минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотика в течение 24 часов при 37°C, после чего пересеивали в МПБ без антибиотика для культивирования в аналогичных условиях с последующим получением супернатанта. Опытные пробы содержали МПБ, супернатант и суточные бульонные культуры ассоциантов в разведении 1/10 (стерильным МПБ) в соотношении: 6:3:1 соответственно. После суточной инкубации при 37°C для оценки влияния супернатантов на ростовые характеристики ассоциантов определяли оптическую плотность проб при длине волны 540 нм (ELx808, BioTeK, США). Способность микроорганизмов формировать биоплёнки оценивали фотометрическим способом (ELx808, BioTeK, США) [8]. Опыты проведены в восьми сериях, в трех повторах. Изменение влияния супернатантов на указанные свойства бактерий оценивали при изменении показателей не менее чем на 30% по сравнению с контрольными значениями для каждой пары ассоциантов.

Результаты и обсуждение

При определении межмикробных взаимодействий бактерий-ассоциантов *in vitro* было установлено, что продукты жизнедеятельности (супернатант бульонных культур) золотистых стафилококков стимулировали рост энтеробактерий в 8 случаях и способность формировать биопленки в 9 случаях, а энтеробактерии стимулировали рост стафилококков и формирование ими биопленок только в 2 случаях.

При оценке динамики межбактериальных взаимоотношений под влиянием антибиотиков выявлено, что продукты жизнедеятельности (супернатант) золотистых стафилококков после действия цефотаксима усилили свое влияние на формирование биопленок энтеробактериями в 6 ассоциациях из 9 (в среднем на 48%), а на их ростовые характеристики – в 4 случаях (на 33%). Влияние супернатантов *S. aureus*, выращенных после контакта с гентамицином, на свойства энтеробактерий существенно не отличалось от контрольных проб. Ципрофлоксацин, азитромицин и кларитромицин также не повлияли на рост бактерий-ассоциантов, однако их влияние на формирование биопленок было другим. Супернатанты *S. aureus*, выращенных в присутствии ципр-

форксацина, усиливали стимуляцию формирования биопленок в 4 ассоциациях (на 25%), а в опытах с азитромицином и кларитромицином аналогичный эффект был отмечен в 5 и 6 ассоциациях, соответственно (в среднем на 32% и 41%). Однако это усиление стимулирующего воздействия полностью исчезло, если оценка влияния супернатантов стафилококков на формирование биопленок энтеробактериями производилась в бульоне, содержащем 1/2 МПК соответствующего антибиотика. Усиление стимулирующего влияния супернатантов золотистых стафилококков, культивированных с цефотаксимом, на рост энтеробактерий в присутствии этого же антибиотика нивелировалось, а на биопленкообразование сохранялось.

Динамика влияния супернатантов энтеробактерий на рост стафилококков и образование ими биопленок не превышала 13% от контрольных показателей, то есть была незначительной.

Оценивая полученные результаты, можно предположить, что экзацетаболиты золотистых стафилококков, выживающих в условиях воздействия на них антибиотиков, могут оказывать прямое или опосредованное воздействие на рост энтеробактерий. Как известно, антимикробная резистентность клинических штаммов нередко многофакторна [9], однако поскольку сами противомикробные препараты, ингибирующие рост бактерий, являются для них стрессорными факторами, повышающими ростовые характеристики микроорганизмов [10], возникает вопрос о возможности усиления роста бактериальных колоний как варианта преодоления этого антимикробного прессинга за счет реализации механизмов антибиотикорезистентности.

В условиях инфекционного процесса значительное количество бактериальных клеток образуют биопленки [11], которые наряду с другими преимуществами обеспечивают устойчивость микроорганизмов к противомикробным препаратам [12]. В последние годы внимание исследователей обоснованно привлекает проблема образования биопленок при полимикробных инфекциях [13]. Полученные в настоящей работе результаты, касающиеся стимуляции формирования биопленок экзацетаболитами стафилококков, культивированных в присутствии антибиотиков, отчасти объясняют сложности лечения полимикробных инфекций [14, 15]. Среди использованных в работе 10 пар бактерий-ассоциантов не было выявлено подавляющих взаимодействий или явлений микробного антагонизма. Подобные типы «негативных» межбактериальных взаимоотношений, очевидно, характерны не для

стабильных ассоциаций, а для случаев, характеризующихся сменой видового состава возбудителей в ходе заболевания [4].

Заключение

Анализ межмикробных взаимодействий в ассоциациях возбудителей гнойно-некротических процессов у больных сахарным диабетом II типа показал наличие исключительно стимулирующих взаимоотношений, а именно – усиление роста и формирования биопленок энтеробактериями под действием супернатантов *S. aureus*. Установлено, что стимулирующее действие *S. aureus* на формирование биопленок энтеробактериями-ассоциантами может усиливаться после предварительной обработки стафилококков суббактериостатическими концентрациями цефотаксима, ципрофлоксацина, азитромицина и кларитромицина. Показано, что это усиление нивелируется, если влияние супернатанта реализуется в присутствии ципрофлоксацина, азитромицина или кларитромицина и сохраняется – в присутствии цефотаксима. Выявленные особенности следует учитывать в реализации персонализированного подхода к лечению гнойно-некротических процессов у больных сахарным диабетом II типа.

(Работа выполнена в рамках проекта ИКВС УрО РАН №15-3-4-34 по Программе комплексных фундаментальных исследований УрО РАН)

ЛИТЕРАТУРА

1. Lipsky V.A., Polis A.V., Lantz K.C. et al. The value of a wound score for diabetic foot infections in predicting treatment outcome: a prospective analysis from the SIDESTEP trial. *Wound Repair Regen.* 2009. 17(5): 671-677.
2. Parvez N., Dutta P., Ray P. et al. Microbial profile and utility of soft tissue, pus, and bone cultures in diagnosing diabetic foot infections. *Diabetes Technol Ther.* 2012. 14(8): 669-674.
3. Дибиров М.Д., Завалий И.П., Чепкасова Т.В. Нестандартность хирургической инфекции пациентов с гнойно-некротическими осложнениями синдрома диабетической стопы и специфика её антибактериальной терапии. *Вестник Новгородского государственного университета.* 2015. 2(85): 41-44.
4. Тарасенко В.С., Фадеев С.Б., Бухарин О.В. Хирургическая инфекция мягких тканей (клинико-микробиологический аспект). Екатеринбург: УрО РАН, 2015. 180 с.
5. Голуб, А.В., Привольнев В.В. Местная антибактериальная терапия хирургических инфекций кожи и мягких тканей в амбулаторных условиях: слагаемые успеха. *Раны и раневые инфекции.* 2014. Т.1, №1: 33–38.
6. Dumville J.C., Lipsky V.A., Hoey C. et al. Topical antimicrobial agents for treating foot ulcers in people with diabetes. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Jun 14;6:CD011038. doi: 10.1002/14651858.CD011038.pub2.
7. de Vos M.G.J., Zagorski M., McNally A., Bollenbach T. Interaction networks, ecological stability, and collective antibiotic tolerance in polymicrobial infections. *PNAS.* 2017. 114 (40): 10666-10671.
8. Kaplan J.B. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artificial Org.* 2011. 34:737-51.
9. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol.* 2011. 2: 65.

10. Poole K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012. 67(9): 2069-2089.
11. Lopez D., Vlamakis H., Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010. 2: a000398.
12. Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010. 35: 322-32.
13. Murray J.L., Connell J.L., Stacy A., Turner K.H., Whiteley M. Mechanisms of synergy in polymicrobial infections. *J. Microbiol.* 2014. 52: 188-199.
14. Курлаев П.П., Гриценко В.А., Белозерцева Ю.П. Современные подходы к антибактериальной терапии гнойно-некротических осложнений синдрома диабетической стопы. 2016. 2: 13с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/KPP-2016-2.pdf>)
15. Percival S.L., Hill K.E., Malic S., Thomas D.W., Williams D.W. Antimicrobial tolerance and the significance of persister cells in recalcitrant chronic wound biofilms. *Wound Repair and Regeneration*. 2011. 19: 1-9.

Поступила 19.09.2017

(Контактная информация: **Фадеев Сергей Борисович** – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией экологии микроорганизмов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11; тел. 8 (3532) 77-54-17, профессор кафедры госпитальной хирургии Оренбургского государственного медицинского университета; ; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6. e-mail: sergfsb@mail.ru)

LITERATURA

1. Lipsky B.A., Polis A.B., Lantz K.C. et al. The value of a wound score for diabetic foot infections in predicting treatment outcome: a prospective analysis from the SIDESTEP trial. *Wound Repair Regen*. 2009. 17(5): 671-677.
2. Parvez N., Dutta P., Ray P. et al. Microbial profile and utility of soft tissue, pus, and bone cultures in diagnosing diabetic foot infections. *Diabetes Technol Ther*. 2012. 14(8):669-674..
3. Dibirov M.D., Zavalij I.P., Шеркасова Т.В. Nestandardnost' hirurgicheskoy infekcii pacientov s gnojno-nekroticheskimi oslozhneniyami sindroma diabeticheskoy stopy i specifika eyo antibakterial'noj terapii. *Vestnik Novgorodskogo gosudarstvennogo universiteta*. 2015. №2 (85): 41-44.
4. Tarasenko V.S., Fadeev S.B., Buharin O.V. Hirurgicheskaja infekcija m'jagkih tkanej (kliniko-mikrobiologicheskij aspekt). Ekaterinburg: UrO RAN, 2015. 180 s.
5. Golub, A.V., Privol'nev V.V. Mestnaya antibakterial'naya terapiya hirurgicheskikh infekcij kozhi i myagkih tkanej v ambulatornyh usloviyah: slagaemye uspekha. *Rany i ranevye infekcii*. 2014. T.1, №1: 33–38.
6. Dumville J.C., Lipsky B.A., Hoey C. et al. Topical antimicrobial agents for treating foot ulcers in people with diabetes. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Jun 14;6:CD011038. doi: 10.1002/14651858.CD011038.pub2. [Epub ahead of print] Review.
7. de Vos M. G. J., Zagorski M., McNally A., Bollenbach T. Interaction networks, ecological stability, and collective antibiotic tolerance in polymicrobial infections. *PNAS*. 2017. 114 (40): 10666-10671.
8. Kaplan J.B. Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artificial Org*. 2011. 34:737-51.
9. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol* 2011. 2: 65.
10. Poole K. Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012. 67(9): 2069–2089.
11. Lopez D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010; 2: a000398.

12. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2010. 35: 322–32.
13. Murray, J. L., Connell, J. L., Stacy, A., Turner, K. H. & Whiteley, M. Mechanisms of synergy in polymicrobial infections. *J. Microbiol.* 2014. 52: 188–199.
14. Kurlaev P.P., Gritsenko V.A., Belozerceva YU.P. *Covremennye podhody k antibakterial'noj terapii gnojno-nekroticheskij oslozhnenij sindroma diabeticheskoj stopy*. 2016. 2: 13s. [Elektr. resurs] (URL: [http:// elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016- 2/Articles/KPP-2016-2.pdf](http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-2/Articles/KPP-2016-2.pdf))
15. Percival, S. L., Hill, K. E., Malic, S., Thomas, D. W. and Williams, D. W. (2011), Antimicrobial tolerance and the significance of persister cells in recalcitrant chronic wound biofilms. *Wound Repair and Regeneration*. 2011. 19: 1–9.

Образец ссылки на статью:

Фадеев С.Б. Особенности влияния антибиотиков на межмикробные взаимоотношения в ассоциациях возбудителей гнойно-некротических процессов у больных сахарным диабетом II типа. *Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН*. 2017. 3: 6 с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2017-3/Articles/FSB-2017-3.pdf>).