



Starptautiskais nefroloģijas un terapijas žurnāls

(International Journal of Nephrology & Therapeutics)

Pētniecisks raksts

E. coli planktona un bioplēves formu rezistence pret šķīstošajiem nitrofurāniem

Filips Plotņikovs¹, Vladimirs Strazdiņš^{2*}, Vitālijs Okuličs³, Endrjū Zebentajevs³,
Narine Movsesjana⁴, Arina Kabanova³ un Sergejs Senkovičs³

1 Asoc. profesors, Vitebskas Valsts medicīnas universitāte, Vitebska, Baltkrievijas Republika

2 Nefrologs, Medicīnas sabiedrība SIA Gaiļezers, Rīga, Latvija

3 Asoc. profesors, Vitebskas Valsts medicīnas universitāte, Vitebska, Baltkrievijas Republika

4 Bērnu zobārstniecības un ortodontijas katedras absolvente, beigusi kvalifikācijas paaugstināšanas un pārkvalifikācijas kursu, Vitebskas Valsts medicīnas universitāte, Vitebska, Baltkrievijas Republika

* **Korespondences adrese:** Vladimirs Strazdiņš, nefrologs, Medicīnas sabiedrība SIA Gaiļezers, Rīga, Latvija, tālr.: + 371 29 609 133; e-pasts: voldis@outlook.lv

Iesniegts 2020. gada 20. jūnijs

Apstiprināts: 2020. gada 15. jūlijs

Publicēts: 2020. gada 24. jūlijs

Citējiet šo rakstu šādi: Plotnikov P, Strazdins V, Okulich V, Zebentaev A, Movsesyan N, Kabanova A and Senkovich S. Antibiotic Resistance of Planktonic and Biofilm Forms of *E. coli* to Soluble Nitrofurans. *Int J Nephrol Ther.* 2020;5(1): 006-009.

Autortiesības: © 2020 Plotnikov P, et al. Šis ir brīvas piekļuves raksts, kas tiek izplatīts saskaņā ar *Creative Commons* attiecinājuma licenci, kura ļauj to neierobežoti izmantot, izplatīt un reproducēt jebkurā nesējā, pareizi citējot oriģinālo darbu.

KOPSAVILKUMS

Urīnceļu infekcijas (UCI) ir nozīmīgs saslimšanas cēlonis. *Escherichia coli* (*E.coli*) ir visbiežākais (aptuveni 80%) UCI izraisītājs cilvēkiem. Vairāki pētījumi ir parādījuši, ka bioplēvju (BP) šūnas ir izturīgākas pret antimikrobiāliem līdzekļiem nekā planktona tipa baktēriju šūnas, veicinot infekciju noturību. Pētījuma mērķis bija atklāt atšķirību starp planktona un BP formas UCI izraisīto *E.coli* rezistenci pret antibiotikām. Pētījums tika veikts laika periodā no 2019. gada novembra līdz 2020. gada februārim Vitebskas Valsts medicīnas Universitātē (Vitebska, Baltkrievijas Republika). Tika pārbaudīta celmu jutība pret šķīstošo furagīnu (*Furaginum solubile* = kālija N-(5'-nitro-2'-furalilidens)-1-amino-hidantoīns ar magnija karbonātu), pašlaik jaunākais nitrofurāna atvasinājums, kas sintezēts un ražots Latvijā kopš 1979. gada (Furamags®).

Rezultāti tika balstīti uz minimālo koncentrāciju, kas inhibēja 50% (MIC_{50}) un 90% (MIC_{90}) izolātu augšanu.

38 *E.coli* celmi, izdalīti no pacientiem ar nekomplīcētu UCI, spēja veidot BP. Planktona tipa *E.coli* izolātu MIC_{50} un MIC_{90} vērtības bija 4 un 8 µg/ml. MIC_{50} un MIC_{90} vērtības BP *E.coli* izolātiem bija 32 un 128 µg/ml.

34 *E.coli* celmi, kas izdalīti no pacientiem ar komplīcētu UCI, spēja veidot BP. Planktona tipa *E.coli* izolātu MIC_{50} un MIC_{90} vērtības bija 2 un 4 µg/ml. MIC_{50} un MIC_{90} vērtības BP *E.coli* izolātiem bija 16 un 32 µg/ml.

Šķīstošajam furagīnam tika uzrādīta zemāka MIC vērtība, salīdzinot ar nitrofurantoīnu, un to var izmantot ne tikai cistīta un pielonefrīta ārstēšanai, bet arī ar katetru saistīto UCI ārstēšanai un novēršanai.

IEVADS

Urīnceļu infekcijas (UCI) ir nozīmīgs saslimšanas cēlonis, kas skar visa vecuma cilvēkus. Aptuveni 40% sieviešu kādā dzīves posmā ir bijusi UCI. *Escherichia coli* (*E.coli*) ir visbiežākais (aptuveni 80%) UCI izraisītājs cilvēkiem un viens no visizplatītākajiem gramnegatīvo nozokomiālo infekciju cēloņiem. Urīnceļu katetri sagrauj dabisko aizsargbarjeru un veicina labvēlīgas vides apstākļus infekcijai, nodrošinot substrātu bioplēvju veidošanai. Vairāki pētījumi ir parādījuši, ka bioplēvju šūnas ir izturīgākas pret antibakteriālajiem līdzekļiem nekā planktona tipa baktēriju šūnas. Bioplēvju rezistence pret antibiotikām veicina infekciju noturību, piemēram, tādu, kas saistītas ar implantētām ierīcēm.

Bioplēves veidošanās ir svarīgs process patogēno mikrobu izdzīvošanai vidē vai zīdītāja saimniekorganismā. Bioplēve ir trīsdimensiju baktēriju kopiena ar sarežģītu uzbūvi, kas dzīvo uz virsmām un ir ietverta hidratētu polisaharīdu, olbaltumvielu un DNS tīklā. Noturīgas bakteriālās infekcijas ar paaugstinātu rezistenci pret antibiotikām bieži var saistīt ar bioplēves veidošanos uz saimniekaudiem un implantiem [1]. Bioplēves veidošanās notiek pa posmiem. Pirmajā posmā notiek īslaicīga planktona veida baktēriju piesaistīšanās cietai virsmai ar raksturīgu adhēziju. Otrajā posmā notiek mikrokoloniju agregācija un veidošanās, kuras ieskauj aizsargājošas sekretētas

molekulas, saukta ārpusšūnu polimēru vielas (*Extra Polymeric Substance* (EPS)) matrica. Visbeidzot, notiek izkliedēšanās, kas ir atdalīšanās no nobriedušas bioplēves planktona baktēriju vai mikrokoloniju veidā. Šis izkļedes posms var veicināt turpmāku saimniekorganisma kolonizāciju ar bioplēvē. Šis process var labvēlīgi ietekmēt organismus ierobežotas barības vielu pieejamības un metabolisma produktu uzkrāšanās dēļ [2].

Viena no bioplēvē raksturīgajām īpašībām ir rezistence pret antibiotikām. Izturība pret antibakteriālajiem līdzekļiem ir vissvarīgākais ar bioplēvē saistīto infekciju neefektīvas terapijas cēlonis, turklāt tas ir arī daudzfaktoriāls. Bioplēves matrica var būt difūzijas barjera dažām antibiotikām; citi faktori ir izmainītā mikrobu fizioloģija un bioplēves vide. Antibiotiku aktivitāti pret bioplēves mikroorganismiem nevar precīzi noteikt, izmantojot jutības testēšanai standarta CLSI (Klīnisko un laboratorijas standartu institūts) buljona mikroaizskaidījuma metodes, jo šo metožu pamatā ir planktona tipa organismu pakļaušana antibakteriālo līdzekļu iedarbībai. Tā vietā antibakteriālā līdzekļa iedarbībai tiek pakļauta no pievienotā substrāta noņemta, homogenizēta un pēc dzīvotspējīgu šūnu skaita kvantitatīvi novērtēta bioplēve. Veidojot bioplēves paraugus sistēmu, papildus kultūras barotnei un inokulātam ir jāņem vērā tādi faktori kā substrāts un hidrodinamika.

Bioplēvju rezistence pret antibiotikām ir saistīta ar vairākiem mehānismiem: iesaistītajiem mikroorganis-

miem piemītošā iekšējā rezistence, samazināta antibiotiku difūzija caur ārpusšūnu matricu, organisma augšanas samazināšanās barības vielu ierobežojuma dēļ un stresa reakcijas aktivizēšana [3].

Ir svarīgi atzīmēt, ka vairāki pētījumi parādījuši, ka dažu antibiotiku subminimālā inhibējošā koncentrācija var izraisīt bioplēves veidošanos *in vitro*; šim procesam, iespējams, ir klīniska nozīme. Lielākā daļa labi dokumentēto pētījumu, kuros pētīti antibiotiku izraisītas bioplēves veidošanās mehānismi, veikti, izmantojot ar ierīcēm saistītos patogēnus, tostarp, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.coli* un *P.aeruginosa* [4].

Pētījuma mērķis bija atklāt atšķirību starp planktona un bioplēves formas komplikētu un nekomplikētu UCI izraisīto *E.coli* rezistenci pret antibiotikām, kā noteikts EAU (Eiropas Uroloģijas asociācijas) Uroloģisko infekciju vadlīnijās [5].

MATERIĀLI UN METODES

Pētījums tika veikts laika periodā no 2019. gada novembra līdz 2020. gada februārim Vitebskas Valsts medicīnas universitātē (Vitebska, Baltkrievijas Republika). Pētījumā tika iekļauti 38 *E.coli* celmi, kas izdalīti no pacientiem ar nekomplikētu UCI, un 34 slimnīcas *E.coli* celmi, kas izdalīti no pacientiem ar komplikētu UCI. Iekļaušanas kritēriji bija UCI bez iepriekšējas ārstēšanas ar antibiotikām. Neiekļaušanas kritēriji bija iepriekšēja ārstēšana ar antibiotikām. Visi pētnieki, kas piedalās šajā pētījumā, ir izlasījuši Helsinku deklarāciju, un pētījums tika izstrādāts atbilstīgi tās vadlīnijām.

Pēc paraugu ievākšanas ar katetrizācijas metodi materiāls nekavējoties tika nogādāts laboratorijā un apstrādāts ne ilgāk kā divu stundu laikā. Paraugus 24 stundas kultivēja uz barības agara 37 °C temperatūrā. Negatīvie kontrolparaugi tika inkubēti vēl 24 h, lai panāktu, ka tie neaug. Attīrīšanu veica, kultivējot baktērijas sērijveidā uz barības agara, lai iegūtu atsevišķas tīras kultūras kolonijas. Baktēriju augšana tika uzskatīta par būtisku, ja koloniju veidojošo vienību skaits uz ml (KVV/ml), bija ≥ 103 .

Zelta standarta metode bioplēves noteikšanai tika lietota, kā aprakstīts *Christensen et al.* [6]. Īsumā, *E.coli* kolonija tika izolēta no svaiga agara trauka un inokulēta 2 ml Millera-Hintona (Mueller-Hinton) buljonā. Buljonu inkubēja vienu nakti 37 °C temperatūrā. Pēc tam kultūru atšķaidīja ar svaigu barotni līdz 1:100. Viena atsevišķa sterila polistirola paplāte ar 96 plakangala iedobēm tika piepildīta ar 200 μ l atšķaidītas kultūras. Kontroles organismi tika apstrādāti līdzīgā veidā. Paplāti inkubēja 37 °C temperatūrā 24 stundas. Pēc inkubācijas katras iedobes saturs tika izņemts, viegli uzsitot pa to. Iedobes tika mazgātas ar 200 μ l fosfāta buferšķīdumu, lai attīrītu no brīvi peldošām baktērijām. Baktēriju izveidotās bioplēves, kas palika iedobēs, nostiprināja ar 2,5% glutaraldehīda šķīdumu un iekrāsoja ar 0,25% Kristālvioleto (CV). Pārmērīgu iekrāsojumu uzmanīgi nomazgāja un paplāti izžāvēja; pēc tam iedobēs uz desmit minūtēm pievienoja 200 μ l

33% etiķskābes. Bioplēves veidošanas spēju papildus pārbaudīja ar spektrofotometriju pie OD₆₂₀. Bioplēves veidošanās robežOD spektrofotometriskajai noteikšanai tika aprēķināta kā trīs standarta novirzes virs negatīvās kontroles vidējās OD. Baktēriju adhēzija tika aprēķināta pēc dotajām formulām visām pārbaudītajām baktērijām un klasificēta kā viena no trim iespējamām kategorijām: vāja (OD_c < OD $\pm$ 2OD), mērena (2OD_c < OD $\pm$ 4OD) un spēcīga (4OD_c < OD) bioplēves veidošanās [7]. Jūtības testi pret antibiotikām tika veikti ar buljona mikroatšķaidījuma metodi, izmantojot svaigu Millera-Hintona buljonu, kā rekomendēts EUCAST (Eiropas Antimikrobiālās jutībasnoteikšanas komisija) vadlīnijās un ISO 20776-1: 2019 (Infekcijas izraisītāju jutības noteikšana un antimikrobiālās jutības testa ierīču novērtēšana – 1. daļa: Buljona mikroatšķaidījuma standartmetode antibakteriālo līdzekļu *in vitro* aktivitātes pārbaudei pret ātri augošām aerobām baktērijām, kas saistītas ar infekciju slimībām). Bioplēves MIC testi tika veikti, kad iedobes saturēja aptuveni 104 līdz 106 baktēriju, augošas kā bioplēves iepriekš aprakstītās procedūras izveidotajos apstākļos. Izmantojot lāzera skenējošo konfokālo mikroskopiju, mēs esam noskaidrojuši, ka šajā līmenī iedobēs veidojas bioplēves. Šīs bioplēves var tikt izmantotas, lai novērtētu antimikrobiālo darbību, izmantojot mikroatšķaidījuma metodi. Tika pārbaudīta celmu jutība pret šķīstošo furagīnu. Antimikrobiālās jutības pārbaudes rezultāti tika izvērtēti, ņemot vērā minimālo koncentrāciju, kas inhibēja 50% (MIC₅₀) un 90% (MIC₉₀) izolātu augšanu.

Statistiskā datu apstrāde tika veikta, izmantojot lietojumprogrammatūras paketi STATISTICA 10.0. Kvantitatīvam statistikas aprakstam tika izmantots Šapiro-Vilka (Shapiro-Wilk) tests. Kad sadalījums atšķīrās no normālā, aprēķinām izmantota mediāna (Me), apakšējā 25. (LQ) un augšējā 75. kvartile (UQ).

REZULTĀTI

Nekomplikēta UCI

38 *E.coli* celmi, kas izolēti no pacientiem ar nekomplikētu UCI, spēja veidot BP.

MIC₉₀ antibiotikām bija 16 reizes lielāks *E.coli* izolātos, kas ņemti no bioplēves populācijas, salīdzinot ar MIC₉₀ izolātiem no planktona kultūrām.

Šķīstošā furagīna MIC₅₀ un MIC₉₀ vērtības planktona *E.coli* izolātiem bija 4 un 8 μ g/ml. Šķīstošā furagīna MIC₅₀ un MIC₉₀ vērtības bioplēves *E.coli* izolātiem bija 32 un 128 μ g/ml. 87% no bioplēves *E.coli* izolātiem bija jutīgi pret šķīstošo furagīnu (1. tabula).

Komplikēta UCI

34 *E.coli* celmi, kas izolēti no pacientiem ar komplikētu UCI, spēja veidot BP.

MIC₉₀ antibiotikām bija astoņas reizes augstāka *E.coli* izolātos, kas ņemti no biofilmas populācijas, nekā MIC₉₀ izolātiem no planktona kultūrām.

Šķīstošā furagīna MIC₅₀ un MIC₉₀ vērtības planktona

E.coli izolātiem bija 2 un 4 µg/ml. Šķīstošā furagīna MIC₅₀ un MIC₉₀ vērtības bioplēves *E.coli* izolātiem bija 16 un 32 µg/ml. 100% bioplēves *E.coli* izolātu bija jutīgi pret šķīstošo furagīnu (2. tabula).

DISKUSIJA

Iepriekšējie pētījumi [8–10] ir parādījuši, ka bioplēves šūnas bija izturīgākas pret pretmikrobiskiem līdzekļiem, salīdzinot ar brīvi rezidējošām šūnām. Antibiotiku lietošana rutīnas UCI ārstēšanā parasti spēj eliminēt planktona šūnas, savukārt bioplēves šūnas var turpināt izplatīties. Bioplēves veidošanās ir svarīgs *E.coli* virulences faktors.

E.coli celmi gan nekomplīcētu, gan komplīcētu UCI gadījumā spēja izveidot bioplēvi. 87% no bioplēves *E.coli* izolātiem nekomplīcēta UCI gadījumā bija jutīgi pret šķīstošo furagīnu, un 100% no bioplēves *E.coli* izolā-

tiem komplīcētas UCI gadījumā. MIC₉₀ bija augstāks bioplēvju formām gan nekomplīcētu, gan komplīcētu UCI gadījumā (attiecīgi, 16 reizes un 8 reizes augstāks), kaut arī visos gadījumos terapeitiski sasniedzamās urīna koncentrācijas diapazonā. Šķīstošajam furagīnam ir zemāka MIC, salīdzinot ar nitrofurantoīnu [11], un augsta *E.coli* jutība pat bioplēves formās.

SECINĀJUMS

Pastāv mērena atšķirība planktona un bioplēves komplīcētu un nekomplīcētu UCI izraisīto *E.coli* formu rezistencē pret šķīstošo furagīnu. Rezultāti liecina, ka šķīstošo furagīnu var veiksmīgi izmantot klīniskajā praksē ne tikai cistīta un pielonefrīta ārstēšanai [12,13], bet arī, lai ārstētu un novērstu ar katetru saistītu un citas komplīcētas UCI, kur bioplēves veidošanās varbūtība ir daudz lielāka.

1. tabula. No pacientiem ar nekomplīcētu UCI iegūto *E.coli* izolātu jutība pret šķīstošo furagīnu

Šķīstošais furagīns	S,%	I,%	R,%	MIK ₅₀ µg/ml	MIK ₉₀ µg/ml	Ģeometriskais vidējais MIK, µg/ml	Min./maks.	Kvartile
Planktona forma	100	0	0	4	8	3,39	1/8	2; 8
BP forma	87	0	13	32	128	29,21	8/128	16; 64

2. tabula. No pacientiem ar komplīcētu UCI iegūto *E.coli* izolātu jutība pret šķīstošo furagīnu

Šķīstošais furagīns	S,%	I,%	R,%	MIK ₅₀ µg/ml	MIK ₉₀ µg/ml	Ģeometriskais vidējais MIK, µg/ml	Min./maks.	Kvartile
Planktona forma	100	0	0	2	4	2,08	1/8	2; 2
BP forma	100	0	0	16	32	12,02	2/64	8; 16

ATSAUCES

1. Delphine Dufour, Vincent Leung, Celine M Levesque. Bacterial biofilm: Baktēriju bioplēve: Struktūra, funkcija un pretmikrobisko līdzekļu rezistence, angļu val. (Structure, function, and antimicrobial resistance) Endodont Top. 2010; 22: 2-16. DOI: 10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x
2. Tejpreet Chadha. Bacterial biofilms: Baktēriju bioplēves: Izdzīvošanas mehānismi un rezistence pret antibiotikām, angļu val. (Survival mechanisms and antibiotic resistance) J Bacteriol Parasitol. 2014; 5: 190. DOI: 10.4172/2155-9597.1000190
3. Sudha Moorthy, Paula I Watnick. Ģenētiski pierādījumi, ka *Vibrio cholerae* monolānis ir atsevišķs posms bioplēves attīstībā, angļu val. (Genetic evidence that the *Vibrio cholerae* monolayer is a distinct stage in biofilm development) Mol Microbiol. 2004–52 573-587. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04000.x
4. Jeffrey B Kaplan. Antibiotiku izraisīta bioplēves veidošanās, angļu val. (Antibiotic induced biofilm formation) Int J Artif Organs. 2011; 34: 737-751. DOI: 10.5301/ijao.5000027
5. G Bonkat, R Bartoletti, F Bruyère, T Cai, SE Geerlings, B Koves, et al. EAU Uroloģisko infekciju vadlīnijas, angļu val. (EAU Urological Infections Guideline) EAU vadlīnijas. Edn. Prezēntēts EAU ikgadējā kongresā Amsterdamā, Nīderlande 2020. ISBN 978-94-92671-07-3. <https://bit.ly/2BrR1V3>
6. G D Christensen, WA Simpson, JJ Younger, L M Baddour, FF Barrett, D M Melton, et al. Koagulāzes negatīvo stafilokoku adhēzija plastmasas audu kultūru plāksnēs: (Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates:) Kvantitatīvs modelis stafilokoku adhēzijai pie medicīnas ierīcēm, angļu val. (A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices) J Clin Microbiol. 1985; 22: 996-1006. PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3905855/>
7. Lucie Kubistova, Lukas Dvoracek, Jan Tkadlec, Oto Melter, Irena Licha. Vides stress ietekmē pret antibiotikām izturīgo staphylococcus aureus veidošanos, angļu val. (Environmental stress affects the formation of staphylococcus aureus persister tolerant to antibiotics) Microb Drug Resist. 2018; 24: 547-555. DOI: 10.1089/mdr.2017.0064
8. RM Donlan. Bioplēvju loma antimikrobiālā rezistencē, angļu val. (Role of biofilms in antimicrobial resistance) ASAIO J. 2000; 46: 47-52. DOI: 10.1097/00002480-200011000-00037
9. PS Stewart, JW Costerton. Bioplēvju baktēriju rezistence pret antibiotikām, angļu val. (Antibiotic resistance of bacteria in biofilms) Lancet. 2001; 358: 135-138. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)05321-1
10. Anahit Penesyan, Stephanie S Nagy, Staffan Kjelleberg, Michael R Gillings, Ian T Paulsen. Bioplēvju šūnu ātra mikroevolūcija, reaģējot uz antibiotikām, angļu val. (Rapid microevolution of biofilm cells in response to antibiotics) NPJ Biofilms Microbiomes. 2019; 5: 34. DOI: 10.1038/s41522-019-0108-3
11. Fiona Fransen, Maria JB Melchers, Joseph Meletiadis, Johan W. Mouton. Pharmacodynamics and differential activity of nitrofurantoin against ESBL-positive pathogens involved in urinary tract infections. (Nitrofurantoina farmakodinamika un diferenciālā aktivitāte pret ESBL-pozitīviem patogēniem, kas iesaistīti urīnceļu infekcijās, angļu val.), J Antimicrob Chemother. 2016; 71: 2883-2889. DOI: 10.1093/jac/dkw212
12. Strazdins V, Cernevskis H. Atkārtota pieaugušo urīnceļu infekcija Latvijā: 2014. gada novērojuma pētījums. (Recurrent urinary tract infection in adults in Latvia: 2014 observational study) J Nephrol Ther. 2015; 5: 4. DOI: 10.4172/2161-0959.1000208
13. Vladimirs Strazdins, Harijs Cernevskis. Soluble nitrofurans in recurrent urinary tract infections: Unexpected findings from the 2014 Latvian study. Top 5 Contributions in Nephrology. (Šķīstošie nitrofurāni atkārtotu urīnceļu infekciju gadījumā: Negaidīti 2014. gada Latvijas pētījuma atklājumi. 5 galvenie ieguldījumi nefroloģijā). J Nephrol Ther. 2019; 8: 309. DOI: 10.4172/2161-0959.1000309