

Бэлан Г. Г.

Государственный университет медицины и фармации имени Николая Тестемицану, г. Кишинев,
Республика Молдова

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ И НЕКОТОРЫЕ ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ ШТАММОВ *KLEBSIELLA* SPP., ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТРОФИЧЕСКИХ ЯЗВ

Резюме. Актуальность. Особое внимание в последнее время уделяется изучению факторов вирулентности микроорганизмов, от экспрессии которых зависит скорость их выведения из очага инфекции и прогноз заболевания. **Целью работы** является оценка факторов чувствительности к антибиотикам и факторов патогенности штаммов *Klebsiella spp.*, выделенных из трофических язв. **Материалы и методы.** В исследование были включены 76 штаммов *Klebsiella spp.*, выделенных из трофических язв. Все изолированные штаммы были идентифицированы и протестированы в соответствии с действующими руководящими принципами. Тестирование на чувствительность к антибиотикам и интерпретация результатов проводились в соответствии с EUCAST. Лецитиназная активность определяли на желточно-солевом агаре, гемолитическую активность на кровяном агаре, а антилизосимную и антикомплементарную активность определяли в соответствии с методом, описанным О. Бухариным и др. Формирование биопленки определяли количественно с помощью метода микротитрования. **Результаты.** Штаммы *Klebsiella spp.*, выделенные из трофических язв, показали высокую устойчивость к антимикробным препаратам и наличие множества факторов патогенности. Гемолитическая активность составила 53,9 %, антилизосимная активность 90,8 %, лецитиназная 56,6 %, антикомплементарная 97,4 %, и 86,8 % штаммов продуцировали детектируемую биопленку. Штаммы, выделенные в случае смешанной инфекции, показали более высокую устойчивость к антибиотикам и более высокую степень экспрессии факторов патогенности, по сравнению со штаммами, выделенными при моноинфекции. **Выводы.** *Klebsiella spp.* штаммы, выделенные из инфицированных трофических язв, обладают множеством факторов патогенности и высокой устойчивостью к антимикробным препаратам. Штаммы-продуценты биопленок показали высокую и множественную устойчивость к антибактериальным препаратам. Регулярный мониторинг факторов патогенности и их профиля устойчивости к антибиотикам может повысить эффективность лечения трофических язв.

Ключевые слова: трофические язвы; *Klebsiella spp.*; чувствительность к антибиотикам; факторы патогенности

Введение

Трофическая язва в настоящее время считается заболеванием, имеющим сильные социально-экономические последствия. Это состояние представляет собой серьезную проблему для здоровья как с точки зрения распространенности, так и с точки зрения сопутствующей заболеваемости. Социально-экономические последствия трофической язвы драматичны, они проявляются влиянием на способность пациента поддерживать социальную и профессиональную деятельность, снижением качества жизни и финансовыми ограничениями. В Западной Европе на проблему тро-

фических язв выделяется 1-2,6 % бюджета здравоохранения. Госпитализации по поводу этого заболевания длительны и повторяются, что экспоненциально увеличивает расходы на здравоохранение. Часто встречаются инвалидность и преждевременный выход на пенсию по болезни [1].

Одним из наиболее частых осложнений трофической язвы является ассоциация микробной инфекции, около 40-75 % трофических язв инфицированы смешанной бактериальной флорой [2]. Этиологический спектр этих инфекций разнообразен, часто преобладают штаммы *Staphylococcus aureus*, за которыми сле-

дуют микробы семейства *Enterobacteriaceae* или штаммы *Pseudomonas aeruginosa*. α - или β -гемолитические стрептококки и анаэробные бактерии выделяются реже, особенно из родов *Clostridium* и *Bacteroides* [3]. Даже, если некоторые бактерии не являются патогенами, их множественная ассоциация в случае трофических язв определяет эволюцию к критической колонизации, связанной с медленным развитием заживления [4].

В последние годы происходит качественная трансформация микроорганизмов, вовлеченных в эту инфекционную патологию, с тенденцией к увеличению доли смешанных инфекций, вызванных потенциально патогенными грамотрицательными и грамположительными микроорганизмами, которые характеризуются выраженным клиническим полиморфизмом из-за одновременного воздействия несколько этиологических агентов, каждый из которых обладает комплексом патогенных факторов [4].

Микроорганизмы, участвующие в смешанных инфекциях, обычно устойчивы к антибиотикам и обладают рядом патогенных факторов, таких как наличие лецитиназной, гемолитической, антилизоцимной активности, наличие ДНКазы, способностью к адгезии и т. д. [5].

Одной из причин длительного сохранения микроорганизмов в организме хозяина является множество факторов, инактивирующих действие антимикробных механизмов иммунной системы. При различных гнойных патологиях приветствуется изучение патогенных свойств микроорганизмов, проявление которых зависит от скорости их выведения из воспалительного очага и прогноза болезни. Известно, что персистентный потенциал микроорганизмов определяет продолжительность их пребывания в макроорганизме, а его подавление с помощью лекарственных препаратов приводит к ослаблению инфекционного потенциала микроорганизма [6].

Род *Klebsiella* включает условно-патогенные грамотрицательные бактерии, вызывающие инфекции у госпитализированных лиц или лиц с ослабленным иммунитетом [7]. В настоящее время виды *Klebsiella* проявляют высокую устойчивость к широкому спектру лекарств, включая бета-лактамы антибиотики, фторхинолоны и аминогликозиды [8, 9]. Эта резистентность приводит к растущей глобальной проблеме выбора эффективных антибиотиков для лечения внутрибольничных инфекций [10].

Часто назначают β -лактамы антибиотики, включая пенициллины, цефалоспорины, монобактамы и карбапенемы [11]. Продукция ферментов β -лактамазы или активное вытеснение молекул β -лактама грамотрицательными бактериями являются основными причинами устойчивости к β -лактамам антибиотикам [12]. Карбапенемы – это β -лактамы, выбранные для лечения инфекций, вызываемых бактериями, продуцирующими бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС) [13], такими как *K. pneumoniae*. Эти антибиотики также считаются последним решением для ле-

чения опасных для жизни инфекций. К сожалению, устойчивость видов *Klebsiella* к карбапенемам возрастает [14].

Материалы и методы

В исследуемую группу вошли 76 штаммов *Klebsiella* spp., выделенных из трофических язв. Идентификация была основана на классических биохимических тестах, подтвержденных автоматической системой VITEK 2 COMPACT.

Диффузиметрический метод Кирби-Бауэра использовался для проверки чувствительности к противомикробным препаратам, а интерпретация результатов теста на антибиотики *in vitro* проводилась в соответствии с EUCAST (Европейский комитет по тестированию чувствительности к противомикробным препаратам) [15].

Штаммы *Klebsiella* spp. были исследованы на чувствительность к восьми группам препаратов: ампициллины (ампициллин), пенициллины с ингибиторами бета-лактамаз (амоксиклав), цефалоспорины (цефепим, цефтазидим, цефотаксим), аминогликозиды (гентамицин, аминопенем, имипенем, эртапенем), фторхинолоны (левофлоксацин, цiproфлоксацин), монобактам (азтреонам) и сульфаниламид (триметоприм-сульфаметоксазол). Штаммы, устойчивые к трем и более группам антибиотиков, считались полирезистентными [16].

Активность лецитиназы определяли на желточном агаре, гемолитическую активность на кровяном агаре, а антилизоцимную и антикомплементарную активность определяли в соответствии с методом, описанным О. Бухариным и др. [17, 18].

Образование биопленок штаммами *Klebsiella* spp., выделенными из трофических язв, определяли количественным методом микротитрования [19].

Для анализа результатов исследования использованы методы описательной статистики: частота, проценты. Результаты статистического анализа считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Мы проанализировали антимикробные профили чувствительности/устойчивости штаммов *Klebsiella* spp., выделенных из трофических язв (рис. 1).

Из анализа полученных результатов видно, что штаммы *Klebsiella* spp. обладают высокой устойчивостью ко многим группам антибактериальных препаратов. Из 76 штаммов 32 (42,1 %) имели множественную лекарственную устойчивость. Все штаммы были устойчивы к ампициллину и амоксиклаву. Аналогичным образом, высокие показатели устойчивости были зарегистрированы к цефалоспоринам (цефепим – 88,2 %, цефтазидим – 90,8 %, цефотаксим – 86,9 %) и фторхинолонам (ципрофлоксацин – 71,1 % и левофлоксацин – 44 %).

Более высокая чувствительность наблюдалась для азтреонама (85,5 %), эртапенема (84,2 %) и тобрамицина (80,3 %).

Одним из исследованных факторов патогенности была антилизоцимная активность *Klebsiella* spp. Антилизоцимная активность – способность микроорганизмов инактивировать мурамидазу, которая является очень важным звеном в неспецифической резистентности, широко распространена среди различных изолятов [20]. Из 76 штаммов *Klebsiella* spp., выделенных из трофических язв, антилизоцимную активность продемонстрировали 69 (90,8 %) и только 7 (9,2 %) штаммов оказались неактивными. Высокую степень выраженности антилизоцимной активности ($K > 2,5$) показали 24 (31,6 %) штамма, 35 (46,0 %) – среднюю степень ($K_{0,5} - 2,49$) и 17 (22,4 %) штаммов – низкую степень выраженности этого явления ($K < 0,49$).

Еще одним исследованным фактором персистенции был гемолизин, который, будучи экзотоксином, может быть причиной хронизации инфекционного процесса [20]. Гемолитическую активность продемонстрировал 41 (53,9 %) штамм *Klebsiella* spp., выделенный из трофических язв.

Лецитиназа, еще один важный фактор патогенности, представляет собой экзофермент, который действует на фосфолипиды (лецитин) в мембране мышечных волокон, эритроцитов и других клеток [20]. Фермент лецитиназа присутствовал у 43 (56,6 %) штаммов *Klebsiella* spp.

Способность инактивировать систему комплемента макроорганизма позволяет микроорганизмам сохраняться в очаге вспышки и приводить к хронизации процесса. Липид А и протеазы обладают антикомплемментарным действием, обеспечивая долгосрочное выживание микроорганизма в организме хозяина [20]. Из 76 изученных штаммов 74 (97,4 %) проявили антикомплемментарную активность, из которых 72 (97,3 %) штамма инактивировали комплемент при концентрации выше 15 CH50/мл и 2 (2,7 %) в концентрации от 5 до 15 CH50/мл. Только 2 штамма (2,7 %) не инактивировали комплемент.

Особое значение для выживания в макроорганизме (даже под действием антибактериальной терапии) имеет способность клинических штаммов *Klebsiella* spp. образовывать биопленки [21]. Из 76 протестированных штаммов *Klebsiella* spp. 66 (86,8 %) образовывали детектируемую биопленку. Что касается статуса биопленки, из 66 выделенных штаммов 46 (69,7 %) продуцировали прочную биопленку, 17 (25,8 %) умеренную биопленку и 3 (4,5 %) слабую биопленку.

Мы также проанализировали корреляцию между способностью к образованию биопленки и множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) штаммов (табл. 1). Из 32 штаммов *Klebsiella* spp. МЛУ – 28 (87,5 %) образовывали сильную биопленку и 4 (10,5 %) – умеренную.

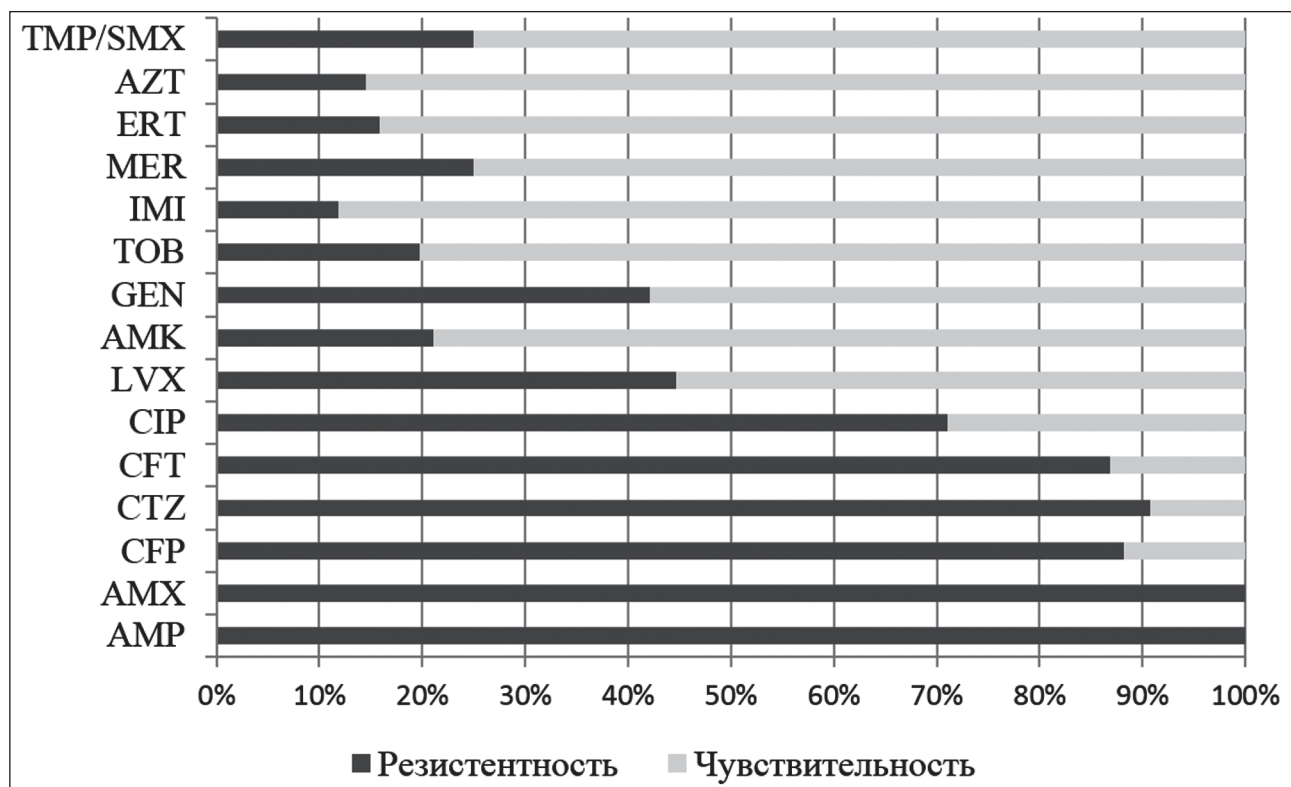


Рис. 1. Чувствительность и устойчивость к антибиотикам штаммов *Klebsiella* spp.
 AMP – ампициллин, AMX – амоксилав, CFP – цефепим, CTZ – цефтазидим, CFT – цефотаксим, GEN – гентамицин, AMK – амикацин, TOB – тобрамицин, MER – меропенем, IMI – имипенем, ERT – эртапенем, LVX – левофлоксацин, CIP – ципрофлоксацин, AZT – азтреонам, TMP/SMX – триметоприм/сульфаметоксазол.

Таблица 1. Корреляция между МЛУ и не обладающими МЛУ штаммами *Klebsiella spp.* и их способностью образовывать биопленки

Штаммы по типу образования биопленок	МЛУ n=32 (P±m,%)	Не МЛУ n=44 (P±m,%)	Всего n=76 (P±m,%)
Сильно продуцирующие	28 (87,5%±5,8)	18 (40,9%±7,4)	46 (60,5%±5,6)
Умеренно продуцирующие	4 (12,5%±5,8)	13 (29,5%±6,9)	17 (22,4%±4,8)
Слабо продуцирующие	0 (0%)	3 (6,8%±3,8)	3 (3,9%±2,2)
Не продуцирующие	0 (0%)	10 (22,7%±6,3)	10 (13,2%±3,9)

Очевидна значительная связь между МЛУ штаммами и их способностью к образованию биопленок ($P<0,001$).

Выводы

Результаты наших исследований подчеркивают необходимость эффективного мониторинга устойчивости штаммов *Klebsiella spp.* к противомикробным препаратам и предполагают, что необходимо применять противомикробные препараты с максимальной осторожностью, чтобы предотвратить появление устойчивых к ним штаммов.

Исследование показало, что штаммы *Klebsiella spp.*, выделенные из трофических язв, обладают огромным арсеналом патогенных факторов, которые позволяют этим возбудителям сохраняться в инфекционном процессе. Выявление факторов вирулентности и устойчивости поможет врачам эффективно управлять этими инфекциями, обеспечивая более эффективный контроль, что приведет к снижению смертности и заболеваемости пациентов.

На основании этих результатов оправдана разработка новых стратегий профилактики и лечения инфекций, вызываемых *Klebsiella spp.*

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов при подготовке данной статьи.

Список литературы

1. Szewczyk MT, Mościcka P, Jawień A, Cwajda-Bialasik J, Cierznikowska K, Ślusarz R, Hancke E. Quality of life in patients with leg ulcers or skin lesions - a pilot study. *Postepy Dermatol Alergol.* 2015; 32(6):465-9. doi: 10.5114/pdia.2014.40983.

2. Strohal R, Mittlböck M, Hämmerle G. The Management of Critically Colonized and Locally Infected Leg Ulcers with an Acid-Oxidizing Solution: A Pilot Study, *Advances in Skin & Wound Care.* 2018; 31(4):163-171 doi: 10.1097/01.ASW.0000530687.23867.bd.

3. Cheng CF, Sahu D, Tsen F, Zhao Z, Fan J, Kim R, Wang X, O'Brien K, Li Y, Kuang Y, Chen M, Woodley DT, Li W. A fragment of secreted Hsp90 α carries properties that enable it to accelerate effectively both acute and diabetic wound healing in mice. *J Clin Invest.* 2011; 121(11):4348-61. doi: 10.1172/JCI46475.

4. Donald W, Robert D. Wound care. *Grabb and Smith's Plastic Surgery.* 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2006; 20-28.

5. Gairabekov R, Gairabekova R, Gubchanova S, et al. Antilizotsimnaia, antiinterferonovaiia i antikomplementarnaia aktivnost' nekotorykh bakterii semeistva Enterobacteriaceae. [Anti-lysozyme, anti-interferon and anti-complementary activity of some bacteria of the Enterobacteriaceae family]. *Mejdunarodnii jurnal prikladnih i fundamentalnih issledovanii.* 2016; 7-1: 63-64. Russian.

6. Cohen N, Lobritz M, Collins J. Microbial persistence and the road to drug resistance. *Cell Host Microbe.* 2013; 13(6): 632-642. doi: 10.1016/j.chom.2013.05.009.

7. Gorrie C, Mirceta M, Wick R, Edwards D, Thomson N, Strugnell R. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 65:208-215. doi: 10.1093/cid/cix270.

8. Fair R, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st Century. *Perspect. Med. Chem.* 2014; 6:25-64. doi: 10.4137/PMC.S14459.

9. Dsouza R, Pinto N, Hwang I, Cho Y, et al. Panel strain of *Klebsiella pneumoniae* for beta-lactam antibiotic evaluation: their phenotypic and genotypic characterization. *PeerJ.* 2017; 5:e2896. doi: 10.7717/peerj.2896.

10. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010; 74:417-433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10.

11. Ur Rahman S, Ali T, Ali I, Khan N, Han B, Gao J. The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. *Biomed. Res. Int.* 2018; 26:9519718. doi: 10.1155/2018/9519718.

12. Wilke M, Lovering A, Strynadka N. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* 2005; 8: 525-533. doi: 10.1016/j.mib.2005.08.016.

13. Okoche D, Asiimwe B, Katabazi F, Kato L, Najjuka C. Prevalence and characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolated from mulago national referral hospital. Uganda. *PLoS.* 2015; One 10:e0135745. doi: 10.1371/journal.pone.0135745.

14. Amjad A, Mirza I, Abbasi S, Farwa U, Malik N, Zia, F. (2011). Modified Hodge test: a simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iran J. Microbiol.* 2011; 3:189-193.

15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 9.0, valid from 2019-01-01.

16. Magiorakos A., Srinivasan A., Carey R., Carmeli Y., Falagas M., Giske C., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international

expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. In: *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:268–281.

17. Bukharin OV, Chelpachenko OE, et al. Effect of medicinal plants on the antilysozyme activity of microorganisms. *Antibiot Khimioter.* 2003; 48(5): 11-14.

18. Bukharin OV, Brudastov IuA, Deriabin DG. Izucenie anticomplementarnoi aktivnosti stafilococov. [Studying the anti-complement activity of staphylococci]. *Klin. lab. diagnostica.* 1992; 11:68-71. Russian.

19. Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatima T, Rattan, A. Detection of biofilm formation among the

clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol.* 2006; 24. 25-29.

20. Buiuc D, Neguț M. *Tratat de microbiologie clinică [Manual of clinical microbiology].* Bucharest: Editura Medicală; 2017. 1250 p. Romanian.

21. Seifi K, Kazemian H, Heidari H, Rezagholizadeh F, Saei Y, Shirvani F, Hourri H. Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur J Microbiol.* 2016; 9(1):e30682. doi: 10.5812/ijm.30682.

Получено 01.09.2020 ■

Белан Г. Г.

Державний університет медицини та фармації імені Миколи Тестеміцану, м. Кишинів, Республіка Молдова

ЧУТЛИВІСТЬ ДО АНТИБІОТИКІВ І ДЕЯКІ ФАКТОРИ ПАТОГЕННОСТІ ШТАМІВ *KLEBSIELLA* SPP., ВИДІЛЕНИХ З ТРОФІЧНИХ ВИРАЗОК

Резюме. Актуальність. Особлива увага останнім часом приділяється вивченню факторів вірулентності мікроорганізмів, від експресії яких залежить швидкість їх виведення з вогнища інфекції і прогноз захворювання. **Метою роботи** є оцінка факторів чутливості до антибіотиків і факторів патогенності штамів *Klebsiella* spp., виділених з трофічних виразок. **Матеріали та методи.** У дослідження були включені 76 штамів *Klebsiella* spp., виділених з трофічних виразок. Усі ізольовані штами були ідентифіковані і протестовані відповідно до діючих керівних принципів. Тестування на чутливість до антибіотиків та інтерпретація результатів проводилися відповідно до EUCAST. Лецитиназна активність визначали на желточно-сольовому агарі, гемолітичну активність – на кров'яному агарі, а антилізоцимну та антикомплементарну активність визначали відповідно до методу, описаного О. Бухарінін та ін. Формування біоплівки визначали кількісно за допомогою методу мікротитрування. **Результати.** Штами *Klebsiella* spp., виділені з трофічних ви-

разок, показали високу стійкість до антимікробних препаратів і наявність численних факторів патогенності. Гемолітична активність складала 53,9 %, антилізоцимна активність 90,8 %, лецитиназна – 56,6 %, антикомплементарна – 97,4 %, і 86,8 % штамів продукували детектуємих біоплівку. Штами, виділені в разі змішаної інфекції, показали більш високу стійкість до антибіотиків і більш високу ступінь експресії факторів патогенності, у порівнянні зі штамми, виділеними при моноінфекції. **Висновки.** Штами *Klebsiella* spp., виділені з інфікованих трофічних виразок, мають численні фактори патогенності і високу стійкість до антимікробних препаратів. Штами-продуценти біоплівок показали високу і множинну стійкість до антибактеріальних препаратів. Регулярний моніторинг факторів патогенності та їх профілю стійкості до антибіотиків може підвищити ефективність лікування трофічних виразок.

Ключові слова: трофічні виразки; *Klebsiella* spp.; чутливість до антибіотиків; фактори патогенності

G. G. Balan

Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy of the Republic of Moldova

ANTIBIOTIC SUCCEPTABILITY AND SOME VIRULENCE FACTORS OF *KLEBSIELLA* SPP. STRAINS ISOLATED FROM TROPHIC ULCERS

Abstract. Background. Recently, a particular attention has been drawn to the study of the microbial virulence factors and their correlation with the rate of elimination from the source of infection, as well as the prognosis of the disease progression. The purpose of this study was to assess the factors affecting antibiotic susceptibility and virulence factors of *Klebsiella* spp. strains isolated from trophic ulcers. **Materials and methods.** The study was conducted on 76 strains of *Klebsiella* spp. isolated from trophic ulcers. The isolated strains were identified and tested according to the current guidelines. Antibiotic susceptibility testing and interpretation of the results were performed in accordance with EUCAST. Lecithinase activity was assayed on the egg yolk salt agar, hemolytic activity – on blood agar, and antilysozyme and anti-complementary activity was determined according to O. Bukharin et al. method. The microtiter method was applied for quantitative biofilm formation assays. **Results.** *Klebsiella*

spp. strains, isolated from trophic ulcers, showed both high resistance to antimicrobial drugs and presence of many pathogenicity factors. Hemolytic activity was found in 53.9%, antilysozyme activity– in 90.8%, lecithinase activity– in 56.6%, anticomplementary activity – in 97.4% and 86.8% of strains produced a detectable biofilm. The strains isolated from mixed infection showed a greater antibiotic susceptibility and a higher virulence factor expression compared to those isolated within mono-infections. **Conclusions.** *Klebsiella* spp. strains isolated from infected trophic ulcers exhibit a range of pathogenicity factors and a greater resistance to antimicrobial drugs. The biofilm-producing strains showed a high and multiple antibacterial susceptibility. Regular monitoring of the virulence factors and their antibiotic resistance profile can increase efficacy in the treatment of trophic ulcers.

Keywords: trophic ulcers; *Klebsiella* spp.; antibiotic susceptibility and virulence factors