



<https://doi.org/10.34883/PI.2024.8.3.005>
УДК 616.716.8:616.9]:577.18:579



Мовсесян Н.А. ✉, Карпук И.Ю.

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет,
Витебск, Беларусь

Особенности чувствительности к антибиотикам биопленкообразующих возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области в присутствии нейтрофилов

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: все авторы внесли существенный вклад в написание статьи.

Благодарности: авторы выражают благодарность рецензентам и редакционной коллегии.

Подана: 04.09.2024

Принята: 30.09.2024

Контакты: narine.movsesyan@list.ru

Резюме

Введение. На протяжении последних десятилетий инфекционно-воспалительные заболевания челюстно-лицевой области и их осложнения являются одной из наиболее актуальных проблем современной медицины. Вопрос взаимодействия биопленок микроорганизмов и иммунной системы изучен недостаточно, есть представление лишь о некоторых реакциях иммунных эффекторов с компонентами биопленок *in vivo*.

Цель. Изучить чувствительность к антибиотикам биопленкообразующих микроорганизмов – возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области в присутствии нейтрофилов крови.

Материалы и методы. Объектом исследования стало раневое отделяемое 104 пациентов с инфекционно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области, находившихся на стационарном лечении в стоматологическом отделении Витебской областной клинической больницы в период 2018–2021 гг. Идентификацию аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов проводили на автоматизированном биохимическом анализаторе ATB Expression. Оценка эффективности использования антибиотиков осуществляли путем сравнения минимальной подавляющей концентрации антибактериальных препаратов для микроорганизмов, используя метод серийных разведений.

Результаты. При проведении бактериологического исследования у 104 пациентов (65,0%) с инфекционно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области выделено 68 изолятов патогенных микроорганизмов, отрицательные результаты посевов получены в 36 случаях (35,0%). Наиболее часто выделялись стафилококки, в числе которых *S. aureus* – 20 изолятов (29,4%), коагулазонегативные стафилококки – 34 изолята (50,0%).

Заключение. Среди возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области, выделяемых в ходе рутинного микробиологического

исследования, существенно преобладают грам(+) кокки (*S. aureus*, *S. epidermidis*); грам(–) бациллярная флора (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) встречается в единичных случаях. Значимое большинство (>85%) клинических изолятов патогенных микроорганизмов обладает высокой либо умеренной способностью к продукции биопленки. В присутствии аутологичных нейтрофилов крови пациентов МПК₉₀ данных антибиотиков в среднем уменьшается в 2 раза, что имеет значение для определения тактики эмпирической антибактериальной терапии.

Ключевые слова: антибиотики, инфекция, челюстно-лицевая область, иммунитет

Movsesyan N. ✉, Karpuk I.

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

Features of Sensitivity to Antibiotics of Biofilm-Forming Pathogens of Infectious and Inflammatory Diseases of the Maxillofacial Region in the Presence of Neutrophils

Conflict of interest: nothing to declare.

Author's contribution: all authors made a significant contribution to writing the article.

Gratitude: author expresses her gratitude to the reviewers and the editorial board.

Submitted: 04.09.2024

Accepted: 30.09.2024

Contacts: narine.movsesyan@list.ru

Abstract

Introduction. Over the past decades, infectious and inflammatory diseases of the maxillofacial region and their complications have been one of the most pressing problems of modern medicine. The interaction of microbial biofilms and the immune system has not been sufficiently studied; there is an idea of only some reactions of immune effectors with biofilm components in vivo.

Purpose. Investigate the sensitivity of biofilm-forming microorganisms causing infectious and inflammatory diseases of the maxillofacial region to antibiotics in the presence of blood neutrophils.

Materials and methods. The object of the study was the wound discharge of 104 patients with infectious and inflammatory diseases of the maxillofacial region who were inpatients in the dental department of the Vitebsk Regional Clinical Hospital in 2018–2021. Identification of aerobic and facultative anaerobic microorganisms was carried out on an automated biochemical analyzer ATB Expression. The effectiveness of antibiotic use was assessed by comparing the minimum inhibitory concentration (MIC) of antibacterial drugs for microorganisms using the serial dilution method.

Results. During the bacteriological study, 68 isolates of pathogenic microorganisms were isolated from 104 (65.0%) patients with intramuscular infections of the maxillofacial region; negative culture results were obtained in 36 cases (35.0%). Staphylococci were most frequently isolated, including *S. aureus* – 20 isolates (29.4%), coagulase-negative staphylococci (CNS) – 34 isolates (50.0%).



Conclusion. Among the causative agents of infectious and inflammatory diseases of the maxillofacial region isolated during routine microbiological studies, gram (+) cocci (*S. aureus*, *S. epidermidis*) significantly predominate; gram (–) bacillary flora (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) is found in isolated cases. A significant majority (>85%) of clinical isolates of pathogenic microorganisms have a high or moderate ability to produce biofilm. In the presence of autologous neutrophils from patients' blood, the MIC₉₀ of these antibiotics decreases by an average of 2 times, which is important for determining the tactics of empirical antibacterial therapy.

Keywords: antibiotics, infection, maxillofacial area, immunity

■ ВВЕДЕНИЕ

Инфекционно-воспалительные заболевания составляют основную группу наиболее часто встречающихся болезней челюстно-лицевой области. Актуальность проблемы профилактики, диагностики и лечения гнойно-воспалительных заболеваний остается высокой [1, 2]. Это объясняется ростом числа воспалительных процессов, увеличением количества случаев тяжелого течения инфекции с распространением процесса на несколько анатомических областей и развитием таких угрожающих осложнений, как сепсис, медиастинит, септический шок, асфиксия [3].

Сегодня нет сомнений в том, что следует пересмотреть концепцию патогенеза различных хронических инфекций, введя в нее существующие данные о биопленках, которые требуют использования новых методов диагностики и лечения. Биопленки играют важную роль в этиологии заболеваний полости рта, которые влияют на качество жизни и вызывают системные болезни человека [3, 4].

Одной из причин осложненного течения биопленочных инфекций является повышенная устойчивость биопленочных бактерий к иммунным эффекторам. Нарушение регуляции процесса воспаления неизбежно приводит к существенному изменению его течения и снижает защитный потенциал макроорганизма. Практически все авторы связывают основную причину снижения эффективности нейтрофильного фагоцитоза у биопленочных бактерий с антифагоцитарными структурами внеклеточного матрикса биопленок. Матрикс биопленки *P. aeruginosa* (даже в отсутствие клеток) избирательно блокирует направление хемотаксиса нейтрофилов, однако при этом сохраняется возможность миграции последних [1, 4, 5].

Таким образом, вопросы регуляции механизмов иммунной системы против патогенов биопленок остаются открытыми и предполагают необходимость дальнейших исследований.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить чувствительность к антибиотикам биопленкообразующих микроорганизмов – возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области в присутствии нейтрофилов крови.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были обследованы 104 пациента (50 женщин (48,1%) и 54 мужчины (51,9%)) с инфекционно-воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области (ИВЗ ЧЛО),

находящихся на стационарном лечении в стоматологическом гнойном отделении Витебской областной клинической больницы с 2018 по 2021 г. Критериями включения пациентов в исследование были: диагноз – острый одонтогенный инфекционно-воспалительный процесс челюстно-лицевой области и шеи; возраст старше 18 лет; наличие добровольного информированного согласия на участие в исследовании. Критериями исключения являлись: возраст младше 18 лет; беременность; сопутствующие заболевания в стадии обострения; присутствие в анамнезе злоупотребления алкоголем и наркотическими средствами; отсутствие добровольного информированного согласия.

Идентификацию аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов проводили на автоматизированном биохимическом анализаторе ATB Expression (BioMerieux, Франция) с применением тест-систем производства BioMerieux (Франция): rapid ID 32 STREPT – для стрептококков, ID 32 STAPH – для стафилококков, ID 32 C – для грибов, rapid ID 32 A – для анаэробов.

Определение способности микроорганизмов, выделенных из раневого отделяемого в исследуемой группе пациентов, к образованию биопленки проводили с помощью 96-луночного полистиролового планшета с окраской генцианвиолетом. Оценку эффективности использования антибиотиков осуществляли путем сравнения минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибактериальных препаратов для микроорганизмов в планктонной форме (ПФ) и в составе бактериальной пленки, используя метод серийных разведений. Чувствительность выделенных микроорганизмов к антибактериальным препаратам анализировали, используя рекомендации Европейского комитета по тестированию антимикробной резистентности (EUCAST 11.1).

Полученные в ходе исследования данные обрабатывались с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0 фирмы StatSoft Inc. (США). Достоверность различий между исследуемыми группами определялась методом Краскела – Уоллиса. Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении бактериологического исследования у 104 пациентов с ИВЗ ЧЛО было выделено 68 изолятов патогенных микроорганизмов, отрицательные результаты посевов получены в 36 случаях (35,0%). Наиболее часто выделялись стафилококки, в числе которых *S. aureus* – 20 изолятов (29,4%), коагулазонегативные стафилококки – 34 изолята (50,0%). Последние были представлены исключительно *S. epidermidis*. Стрептококки составили 10,3% (7 изолятов). Энтеробактерии (1,45%) идентифицированы как *E. coli* – 1 изолят (1,95%) и *K. pneumoniae* – 1 изолят (1,45%). Было выделено 2 изолята *P. aeruginosa* (2,9% исследований). Энтерококки были представлены *E. faecalis* – 3 изолята (4,5%).

Таким образом, среди выделенных патогенов существенно преобладают грам(+) кокки (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*); грам(–) бациллярная флора (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) встречается в единичных случаях. Указанные результаты, вероятно, отражают не истинную этиологическую структуру ИВЗ ЧЛО, а ту часть возбудителей соответствующих заболеваний, которая может быть выделена и идентифицирована в условиях обычной микробиологической лаборатории многопрофильного стационара.



Таблица 1

Масса биопленки, формируемой клиническими изолятами микроорганизмов – возбудителей ИВЗ ЧЛО**Table 1****Mass of biofilm formed by clinical isolates of microorganisms – pathogens of infectious inflammatory disease of maxillofacial region**

Микроорганизм	N	Оптическая плотность (Me; LQ–UQ)	Масса биопленки, мкг/лунку (Me; LQ–UQ)
<i>S. aureus</i>	20	0,18 (0,16–0,19)	24,2 (22,02–27,23)
<i>S. epidermidis</i>	34	0,12 (0,11–0,13)	15,1 (13,9–16,6)
<i>P. aeruginosa</i>	2	0,21 (0,20–0,21)	30,8 (30,1–31,5)
<i>S. viridans</i>	7	0,14 (0,13–0,15)	18,4 (17,1–19,3)

Определена способность формировать биопленку у 68 клинических изолятов патогенных микроорганизмов. Масса биопленки, формируемой изученными изолятами, представлена в табл. 1.

Выявлены статистически значимые различия способности исследованных изолятов формировать биопленку. Так, было показано, что *P. aeruginosa* обладает более выраженной способностью формировать биопленку, чем *S. aureus* ($p=0,007$), *S. viridans* ($p<0,001$) и *S. epidermidis* ($p<0,001$). При этом *S. aureus* формирует биопленку с большей интенсивностью, чем *S. epidermidis* ($p<0,001$) и *S. viridans* ($p<0,001$). Отмечено, что *P. aeruginosa* обладает наибольшей способностью формировать биопленку *in vitro*, в то время как наименьшей способностью характеризуется *S. epidermidis*.

Показано, что 13,4% изолятов обладали низкой способностью к продукции биопленки, а 86,6% изолятов *S. aureus* – умеренной способностью. 46,2% изолятов *S. epidermidis* продемонстрировали низкую способность формировать биопленку, 50,0% – умеренную способность, в 3,8% наблюдений биопленки не формировалось. Способность клинических изолятов *S. viridans* формировать биопленку в 40,0% случаев была оценена как низкая, в 60,0% – как умеренная. 50,0% выделенных изолятов *P. aeruginosa* имели высокую способность к продукции биопленки, остальные 50,0% – умеренную способность.

При использовании стандартных методов определения резистентности к антибиотикам изоляты *S. epidermidis* в ПФ оказались наиболее чувствительны к тигециклину и меропенему (100%), менее чувствительны к фторхинолонам: к ломефлоксацину и левофлоксацину – 94% изолятов, к ципрофлоксацину – 88%. К ванкомицину оказались чувствительны 88% выделенных изолятов. Наибольшая резистентность обнаружена к цефалексину (35% чувствительных изолятов *S. epidermidis*).

Изоляты *S. epidermidis* в составе биопленок оказались наиболее чувствительны к тигециклину – 100%, менее чувствительны к фторхинолонам: ципрофлоксацину – 71,1%, левофлоксацину – 53%, ломефлоксацину – 47,2%. В значительной степени снизилась чувствительность данных микроорганизмов в составе биопленки к меропенему – 29%. *S. epidermidis* в составе биопленки также оказались устойчивы к цефалексину и ванкомицину – 0% чувствительных изолятов.

Изоляты *S. epidermidis* в составе биопленок в присутствии аутологичных нейтрофилов крови пациентов оказались наиболее чувствительны к тигециклину – 100%; при этом выросла и их чувствительность к фторхинолонам: в частности,

к ципрофлоксацину были чувствительны 79% изолятов, к левофлоксацину – 69%, к ломефлоксацину – 56%. Более низкой оказалась чувствительность микроорганизмов к меропенему (33% изолятов) и к цефалексину (9% изолятов). Микроорганизмы в составе биопленки в присутствии нейтрофилов сохранили полную резистентность к ванкомицину – 0% чувствительных изолятов.

При использовании стандартных методов определения резистентности к антибиотикам изоляты *S. aureus* в ПФ оказались наиболее чувствительны к тигециклину, ванкомицину, левофлоксацину, ципрофлоксацину (100%), но менее чувствительны к ломефлоксацину (94,1%) и цефалексину (13%).

Изоляты *S. aureus* в составе биопленок оказались наиболее чувствительны к тигециклину, левофлоксацину – 100%, менее чувствительны к фторхинолонам: ципрофлоксацину – 63,3%, ломефлоксацину – 47,1%. Микроорганизмы в составе биопленки оказались totally резистентны к цефалексину и ванкомицину – нами было выявлено 0% чувствительных изолятов.

Изоляты *S. aureus* в составе биопленок в присутствии аутологичных нейтрофилов крови пациентов также оказались наиболее чувствительны к тигециклину и левофлоксацину – 100% изученных изолятов. Менее чувствительны *S. aureus* были к фторхинолонам: к ципрофлоксацину – 83% изолятов, к ломефлоксацину – 53%. К цефалексину оказались чувствительны 9% изученных изолятов. Микроорганизмы в составе биопленки в присутствии нейтрофилов крови сохранили резистентность к ванкомицину – 0% чувствительных изолятов.

Планктонные формы *S. aureus* и *S. epidermidis* характеризуются высокой чувствительностью к тигециклину, меропенему, фторхинолонам и ванкомицину, но высоким уровнем устойчивости к цефалексину. При этом те же микроорганизмы в составе биопленок демонстрируют высокую чувствительность к тигециклину, но существенное снижение чувствительности к фторхинолонам (примерно в 1,5–2 раза) и резкое снижение чувствительности к меропенему и ванкомицину (в 5 и более раз, вплоть

Таблица 2
Сравнительные показатели МПК₉₀ изученных антибиотиков клинических изолятов *S. aureus* и *S. epidermidis* (планктонных форм (ПФ) в сравнении с микроорганизмами в составе биопленок)
Table 2
Comparative indices of MIC₉₀ of studied antibiotics of clinical isolates of *S. aureus* and *S. epidermidis* (planktonic forms in comparison with microorganisms in biofilms)

Антибиотик	<i>S. epidermidis</i> (ПФ) МПК ₉₀ , мкг/мл	<i>S. epidermidis</i> (биопленка) МПК ₉₀ , мкг/мл (биопленки/ ПФ)	<i>S. aureus</i> (ПФ) МПК ₉₀ , мкг/мл	<i>S. aureus</i> (био- пленка) МПК ₉₀ , мкг/мл (биопленки/ ПФ)
Тигециклин	0,5	0,5 (1)	0,5	0,5 (1)
Ципрофлоксацин	2,0	8,0 (4)	1,0	4,0 (4)
Цефалексин	4,0	128,0 (32)	4,0	128,0 (32)
Ванкомицин	4,0	512,0 (128)	2,0	16,0 (8)
Левофлоксацин	2,0	8,0 (4)	0,5	1,0 (2)
Ломефлоксацин	2,0	8,0 (4)	2,0	8,0 (4)
Меропенем	0,125	2,0 (16)	–	–
Ср. геом. биопленки/ПФ	–	8,8	–	4,5



Таблица 3
Сравнительные показатели МПК₉₀ изученных антибиотиков клинических изолятов *S. aureus* и *S. epidermidis* в составе биопленки (в нативных условиях и в присутствии аутологических нейтрофилов крови пациентов)
Table 3
Comparative MIC₉₀ values of studied antibiotics of clinical isolates of *S. aureus* and *S. epidermidis* in biofilm (under native conditions and in the presence of autologous neutrophils from patients' blood)

Антибиотик	<i>S. epidermidis</i> МПК ₉₀ , мкг/мл	<i>S. epidermidis</i> МПК ₉₀ , мкг/мл в присутствии нейтро- филов (% от исходной)	<i>S. aureus</i> МПК ₉₀ , мкг/мл	<i>S. aureus</i> МПК ₉₀ , мкг/мл в присутствии нейтро- филов (% от исходной)
Ципрофлоксацин	8,0	4,0 (50%)	4,0	4,0 (100%)
Цефалексин	128,0	64,0 (50%)	128,0	64,0 (50%)
Ванкомицин	512,0	256,0 (50%)	16,0	8,0 (50%)
Левифлоксацин	8,0	4,0 (50%)	1,0	0,5 (50%)
Ломефлоксацин	8,0	4,0 (50%)	8,0	4,0 (50%)
Меропенем	2,0	1,0 (50%)	–	–

до полной устойчивости к соответствующим препаратам), параллельно сохраняя полную резистентность к цефалексину.

При изучении антибиотикочувствительности наиболее часто выделяемых патогенных микроорганизмов (*S. aureus* и *S. epidermidis*) было обнаружено, что МПК₉₀ изученных антибиотиков, характерная для микроорганизмов в составе биопленки, в среднем в 2–128 раз выше (среднее геометрическое нарастание МПК₉₀ – 8,8 для *S. epidermidis*, 4,5 – для *S. aureus*), чем соответствующий показатель для ПФ (табл. 2). Не увеличилась лишь МПК₉₀ тигециклина, поскольку к нему оказалось чувствительно 100% изолятов микроорганизмов, как ПФ, так и в составе биопленки. В наибольшей степени в составе биопленки выросла МПК₉₀ цефалексина и ванкомицина.

При этом в присутствии аутологических нейтрофилов крови пациентов МПК₉₀ изученных антибиотиков в среднем уменьшилась приблизительно в 2 раза (табл. 3), что может иметь существенное клиническое значение и должно учитываться в ходе микробиологических исследований, а также при назначении эмпирической антибактериальной терапии пациентам с ИВЗ ЧЛО.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Среди возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области, выделяемых в ходе рутинного микробиологического исследования, существенно преобладают грам(+) кокки (*S. aureus*, *S. epidermidis*); грам(–) бациллярная флора (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) встречается в единичных случаях. Значимое большинство (>85%) клинических изолятов патогенных микроорганизмов обладает высокой либо умеренной способностью к продукции биопленки. Планктонные формы *S. aureus* и *S. epidermidis* характеризуются высокой чувствительностью к тигециклину, меропенему, фторхинолонам и ванкомицину. Те же микроорганизмы в составе биопленок сохраняют высокую чувствительность к тигециклину, но демонстрируют существенное (в 1,5–2 раза) снижение чувствительности к фторхинолонам и резкое (в 5 и более раз) снижение чувствительности к меропенему и ванкомицину. При этом в присутствии аутологических нейтрофилов крови пациентов МПК₉₀ данных

антибиотиков в среднем уменьшается в 2 раза, что имеет значение для определения
тактики эмпирической антибактериальной терапии.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Fulaz S., Vitale S., Quinn L., et al. Nanoparticle-biofilm interactions: the role of the EPS matrix. *Trends in Microbiology*. 2019;27:915–926.
2. Sidorenko S.V. The infectious process as a 'dialogue' between host and parasite. *Klin. mikrobiologiya i antimikrob. himiya*. 2001;4:301–315. (in Russian)
3. Fomichev E.V. The problem of antibacterial therapy in purulent infection of the maxillofacial region. *Aktual'nye voprosy stomatologii*. M., 2003. 149–150 pp. (in Russian)
4. Lee K., Yoon S.S. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2017;27:1053–64.
5. Stadler A.F., et al. Gingival crevicular fluid levels of cytokines/chemokines in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J. Clin. Periodontol.* 2016;43:727–745. doi: 10.1111/jcpe.12557
6. Storoe W., Haug R.H., Lillich T.T. The changing face of odontogenic infections. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* 2001;59(7):748–749.