

DOI: 10.26693/jmbs05.02.104

УДК [616.61-002.3-053.4:579.842.22:579.861.2]-085.28-085.015.8

Мішина М. М.¹, Макєєва Н. І.¹, Марченко І. А.¹,
Головачова В. О.¹, Осолодченко Т. П.²

ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК ЗБУДНИКАМИ ПІЄЛОНЕФРИТІВ У ДІТЕЙ РАНЬОГО ВІКУ, ЯК ОДИН З МЕХАНІЗМІВ ВИНИКНЕННЯ СТІЙКОСТІ ДО АНТИМІКРОБНИХ ПРЕПАРАТІВ

¹Харківський національний медичний університет, Україна

²ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова
Національної академії медичних наук України», Харків, Україна

makeevanataly313@gmail.com

Актуальність обумовлена зростанням кількості дітей, хворих на пієлонефрит на тлі порушення уродинаміки, яка обумовлена як органічними, так і функціональними причинами.

Метою дослідження є вивчення здатності основних уропатогенів до утворення біоплівки та вплив похідних нітрофуранів на первинні та вторинні біоплівки ізолятів.

Зібрано матеріал для дослідження у 37 дітей віком від 1 місяця до 3 років, з них 26 дітей, хворі на гострий пієлонефрит та 11 дітей, хворі на хронічний пієлонефрит. Верифікація діагнозу проводилася згідно з протоколом діагностики та лікування дітей з інфекціями сечової системи за допомогою стандартизованих методик. Використані мікробіологічні методи дослідження.

Результати дослідження показали, що за дії похідних нітрофуранів на первинні біоплівки ізолятів *P. mirabilis* та *S. aureus* утворені нові планктонні клітини не формували щільні вторинні біоплівки: при гострій формі пієлонефриту – діаметр щілини біоплівки склав від 1,72 мкм до 6,17 мкм, а при хронічній формі пієлонефриту – від 4,47 мкм до 20,98 мкм. При дослідженні дії похідних нітрофуранів на добові первинні біоплівки мікроорганізмів, збудників гострих та хронічних пієлонефритів у дітей, встановлено, що оптична щільність їх практично не знижувалася, проте дані мікроскопії показують, що під впливом похідних нітрофуранів утворюються «пори-щілини», діаметром від 5,98 мкм до

21,66 мкм і більші через які можливе проникнення антибактеріальних препаратів у біоплівку і вплив на планктонні форми існування мікроорганізмів з наступною їх загибеллю або зниженням активної здатності утворювати щільні біоплівки, що попереджає розвиток рецидивів.

В результаті проведених досліджень встановлено, що показники оптичної щільності ізолятів у дітей, хворих на хронічний пієлонефрит вірогідно вище, ніж у дітей, хворих на гострий пієлонефрит. Похідні нітрофуранів в терапевтичній дозі ефективно діє на планктонні форми уропатогенів в активній фазі гострого і при загостренні хронічного пієлонефриту, а також запобігає утворенню вторинних біоплівок. За впливу похідних нітрофуранів утворюються «отвори», через які можливе проникнення антибактеріальних препаратів у біоплівку, що попереджає розвиток рецидивів. Похідні нітрофуранів ефективно призначати з метою профілактики розвитку пієлонефритів і в якості протирецидивної терапії хронічних пієлонефритів у дітей.

Ключові слова: пієлонефрит, діти, мікроорганізми, похідні нітрофуранів, біоплівки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дослідження проводилися відповідно до теми науково-дослідної роботи «Оптимізація діагностики і профілактики хронізації мікробно-запальних захворювань сечовивідної системи та прогресування нефропатій у дітей керуванням

взаємодією макро- та мікроорганізмів», № держ. реєстрації 0118U000945.

Вступ. У сучасному суспільстві зростає кількість дітей, хворих на рецидивуючий перебіг інфекції сечовивідної системи на тлі порушення уродинаміки, яка обумовлена як органічними, так і функціональними причинами. Рецидивування інфекції сечовивідної системи, зокрема пієлонефриту, обумовлено збільшенням резистентності до антибактеріальних препаратів. У сучасній педіатрії, зокрема, в дитячій нефрології, зростає інтерес до бактеріальних плівок та процесу біоплівкоутворення [1]. Саме мікробні біоплівки відповідалні за етіологію та патогенез багатьох гострих та хронічних бактеріальних хвороб, до них також відносяться інфекції сечовивідної системи, а саме пієлонефрит, цистит [2]. Утворення біоплівок підвищує виживання бактерій у навколишньому середовищі, у тому числі в дитячому організмі. Відмінними особливостями біоплівки, в порівнянні з колоніями мікроорганізмів, є наявність позаклітинного матриксу, наявність у бактерій генів, що контролюють біоплівкоутворення, складна архітектурна структура.

Поширення і збільшення відсотку застосування катетерів, дренажів з одночасним призначенням антибактеріальних препаратів, до яких виявлена резистентність патогенів, призводять до розвитку біоплівкової інфекції [3, 4]. Періодичне вивільнення планктонних форм бактерій з біоплівок в потік сечі служить джерелом розвитку і підтримки хронічного інфекційного і запального процесу в нирках [5].

Збільшення резистентності до антибактеріальних препаратів пояснюється порушенням проникнення антибактеріального препарату через матрикс біоплівки [6]. Неухильне зростання резистентності мікроорганізмів до застосовуваних антибіотиків, збільшення кількості хворих на інфекції сечовивідної системи, зміна структури уропатогенів та утворення біоплівок є основними проблемами в лікуванні пієлонефритів у дітей. Для розвитку біоплівок, сформованих уропатогенами, характерно декілька етапів: адегізія планктонних форм бактерій до поверхні, потім відбувається поділ клітин, формування матриксу, утворення самої біоплівки та відокремлення нових планктонних мікроорганізмів [7]. Але детальне дослідження етапів формування біоплівки в сечовивідних шляхах не дало змоги встановити точний механізм адгезії та виживання мікроорганізмів.

Біоплівкоутворення вважається одним з факторів патогенності мікроорганізмів, а здатність до утворення біоплівок уропатогенами лежить в основі антибіотикорезистентності, що диктує необхідність активного пошуку антимікробних препаратів для пригнічення формування біоплівки мікроорганізмів.

на нинішньому етапі залишаються недостатньо вивченими механізми взаємодії між бактеріями всередині біоплівки.

Мета дослідження – вивчення здатності основних уропатогенів до утворення біоплівки та вплив похідних нітрофуранів на первинні та вторинні біоплівки ізолятів.

Матеріал та методи дослідження. Обстежено 37 дітей віком від 1 місяця до 3 років, які знаходилися на обстеженні та лікуванні у нефрологічному відділенні КЗОЗ «Харківська міська клінічна дитяча лікарня №16» Харківської міської ради, з них 28 дівчат та 9 хлопчиків. Із урахуванням тривалості захворювання, обстежені діти розподілені на групи: 1-ша група (n=26) – діти, хворі на гострий пієлонефрит та 2-га група (n=11) – діти, хворі на хронічний пієлонефрит. Верифікація діагнозу проводилася згідно з протоколом діагностики та лікування дітей з інфекціями сечової системи за допомогою стандартизованих і уніфікованих методик.

Роботу проведено відповідно до вимог Європейської конвенції по захисту хребетних тварин (Страсбург, 18.03.1986р.), директиви Ради Європейського економічного товариства по захисту хребетних тварин (Страсбург, 24.11.1986), закону України «Про лікарські засоби», 1996, ст. 7,8,12, настанові ІСНГСР (2008 р.), GLP (2002 р.), «Порядку проведення клінічних випробувань лікарських засобів та експертизи матеріалів клінічних випробувань» та «Типового положення про комісію з питань етики», затверджених наказами МОЗ України № 523 від 12.07.2012 р. та № 616 від 03.08.2012 р. Дослідження виконувалося з мінімальними психологічними втратами з боку пацієнтів. На проведення досліджень була отримана поінформована згода батьків дітей.

Використані мікробіологічні методи: бактеріологічні – ідентифікація мікроорганізмів за загальноприйнятими мікробіологічними схемами виділення та ідентифікації мікроорганізмів [8]. Визначення чутливості клінічних штамів до похідних нітрофуранів проводили у полістиролових планшетах: мінімальну пригнічувальну концентрацію (МПК 300 мкг/мл) визначали для культур клінічних штамів за допомогою метода серійних розведень [9]. В контрольні пробірки замість похідних нітрофуранів додавали ізотонічний розчин (0,5 % NaCl). Облік результатів проводили через 24 години [10].

Для отримання біоплівки використовували стерильні полімерні чашки Петрі діаметром 40 мм. У кожену чашку поміщали по 4 мл бульйону Мюллера-Хінтона і вносили добову культуру мікроорганізмів, виділених із сечі при пієлонефритах у дітей. Інкубували протягом 12-18-24 год при + 37°C. Потім скло 3-разово відмивали в 0,01 М фосфатним буфером,

заливали розчином похідних нітрофуранів, витримували годину, відмивали фосфатним буфером, висушували, фарбували 1% розчином кристаллвіолету і промивали дистильованою водою [11]. Мікроскопія препаратів проводилась за допомогою мікроскопа Granum з масляною імерсією. Цифрові зображення бактерій і їх біоплівок отримували за допомогою відеокамери (відеоокуляра) DCM310 ToupCam™ (Industrial Digital Camera UCMOS 03100KPA3.1 MP ½ APTINACMOS SENSOR; FMA050) і зберігали в форматі jpeg. При обробці результатів використані методи параметричної статистики із застосуванням програми «Statistica» й «Biostat» [12, 13].

Результати дослідження і їх обговорення. У результаті проведеного дослідження виявлено, що всі уропатогенні мікроорганізми мали здатність утворювати добові біоплівки. Оптична щільність ізолятів у дітей, хворих на хронічний пієлонефрит, була вірогідно ($p < 0,05$) вищою ніж у дітей, хворих на гострий пієлонефрит. Також встановлено, що найбільш щільні добові біоплівки утворювала *Klebsiella pneumoniae*, як при гострому пієлонефриті, так і при хронічному пієлонефриті (табл. 1).

Таблиця 1 – Показники оптичної щільності біоплівок, що сформовані основними уропатогенами у дітей, хворих на гострий та хронічний пієлонефрит, опт. од.

Основні збудники пієлонефритів у дітей	Групи обстежених дітей з гострим та хронічним пієлонефритом	
	Гострий пієлонефрит (1 група, n=26)	Хронічний пієлонефрит (2 група, n=11)
<i>Proteus vulgaris</i>	2,89 (2,36; 3,01)	4,18 (3,95; 4,31)*
<i>Proteus mirabilis</i>	2,65 (2,33; 3,02)	3,84 (3,62; 3,95)*
<i>Escherichia coli</i>	2,34 (2,08; 2,65)	3,68 (3,52; 3,89)*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,21 (2,89; 3,67)	4,56 (4,02; 4,87)*
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,84 (2,51; 3,13)	4,12 (4,32; 4,67)*
<i>Enterobacter spp</i>	2,14 (1,81; 2,44)	3,47 (3,29; 4,11)*
<i>Morganella morganii</i>	2,08 (1,89; 2,31)	3,26 (3,04; 3,45)*
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,81 (2,63; 3,02)	4,09 (3,86; 4,25)*
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2,97 (2,82; 3,15)	4,21 (4,01; 4,43)*

Примітка: *вірогідність ознаки ($p < 0,05$) стосовно показників дітей з 1-ї групи.

Виділені штами *Klebsiella pneumoniae* у дітей до 3 років, які лікувалися з приводу пієлонефриту, мали здатність утворювати добові біоплівки: ізоляти гострої форми пієлонефриту утворювали біоплівки з щільністю 3,21 (2,89; 3,67) опт. од., ізоляти *K. pneumoniae* хронічної форми – 4,56 (4,02; 4,87) опт. од. з активною продукцією планктонних клітин

(2,14 (1,86; 2,65) опт. од. та 3,06 (2,84; 3,31) опт. од. відповідно), які утворювали більш щільні вторинні біоплівки, що мають високу стійкість до протимікробних препаратів.

У результаті проведеного виділено штами збудників *P. mirabilis* та *S. aureus*, які мали здатність утворювати щільні добові біоплівки. Однак, слід зауважити, що ізоляти гострої форми пієлонефриту утворювали біоплівки меншої щільності (рис. 1), а ізоляти хронічної форми – утворювали більш щільні первинні біоплівки (рис. 2).

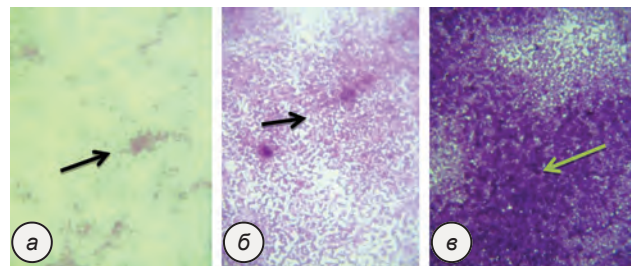


Рис. 1. Мікроскопія біоплівок, що сформовані збудниками гострого пієлонефриту у дітей (мікроскоп Granum з масляною імерсією, окуляр WF 10x/18; об'єтив 100/1.25 160/0.17):

а) через 12 годин інкубації; б) через 18 годин інкубації; в) через 24 годин інкубації

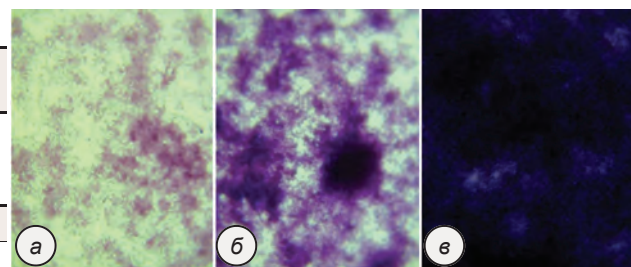


Рис. 2. Мікроскопія біоплівок, що сформовані збудниками хронічного пієлонефриту у дітей (мікроскоп Granum з масляною імерсією, окуляр WF 10x/18; об'єтив 100/1.25 160/0.17):

а) через 12 годин інкубації; б) через 18 годин інкубації; в) через 24 годин інкубації

За дії похідних нітрофуранів на первинні біоплівки ізолятів *P. mirabilis* та *S. aureus* встановлено, що утворені нові планктонні клітини не формували щільні вторинні біоплівки: при гострій формі пієлонефриту – діаметр щілини біоплівки склав від 1,72 мкм до 6,17 мкм (рис. 3), а при хронічній формі пієлонефриту - від 4,47 мкм до 20,98 мкм (рис. 4).

При дослідженні дії похідних нітрофуранів на добові первинні біоплівки мікроорганізмів, збудників гострих (рис. 5) та хронічних (рис. 6) пієлонефритів у дітей, встановлено, що оптична щільність їх практично не знижувалася, проте дані мікроскопії показують, що під впливом похідних нітрофуранів утворюються «пори-щілини», діаметром

від 5,98 мкм до 21,66 мкм і більші через які можливе проникнення антибактеріальних препаратів у біоплівку і вплив на планктонні форми існування

мікроорганізмів з наступною їх загибеллю або зниженням активної здатності утворювати щільні біоплівки, що попереджає розвиток рецидивів.

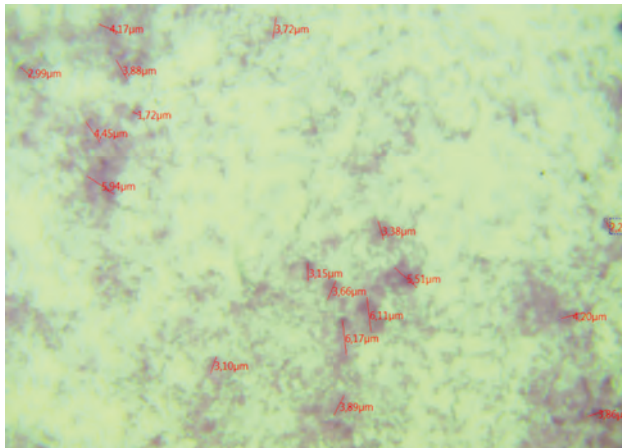


Рис. 3. Здатність планктонних клітин мікроорганізмів (збудників гострих пієлонефритів у дітей), які продукуються первинними біоплівками після дії похідних нітрофуранів, утворювати вторинні біоплівки (мікроскоп Granum з масляною імерсією, окуляр WF 10x/18; об'єтив 100/1.25 160/0.17)

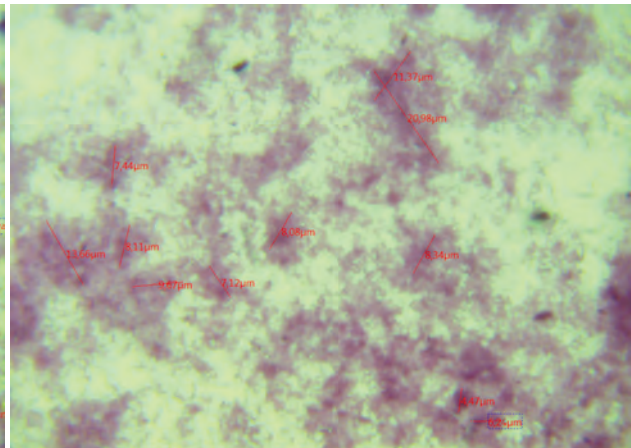


Рис. 4. Здатність планктонних клітин мікроорганізмів (збудників хронічних пієлонефритів у дітей), які продукуються первинними біоплівками після дії похідних нітрофуранів, утворювати вторинні біоплівки (мікроскоп Granum з масляною імерсією, окуляр WF 10x/18; об'єтив 100/1.25 160/0.17)

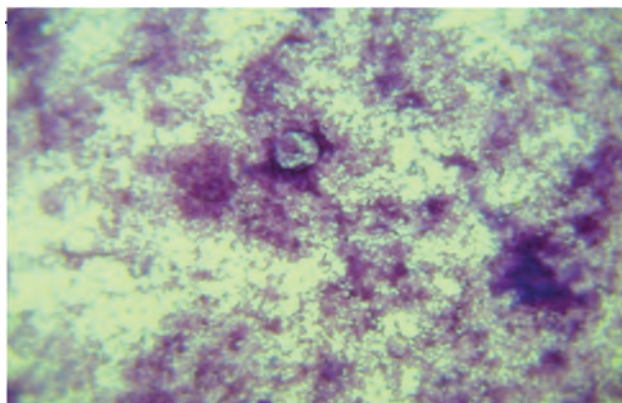


Рис. 5. Дія похідних нітрофуранів на біоплівку мікроорганізмів, збудників гострих пієлонефритів у дітей раннього віку (мікроскоп Granum з масляною імерсією, окуляр WF 10x/18; об'єтив 100/1.25 160/0.17)

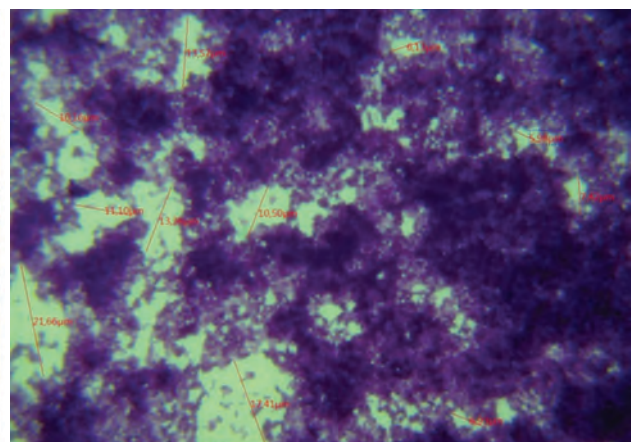
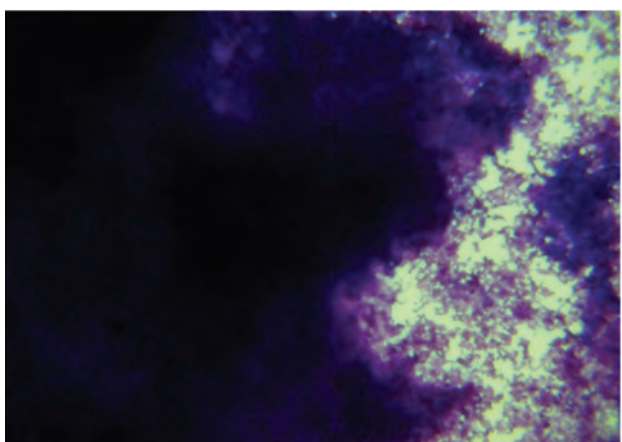
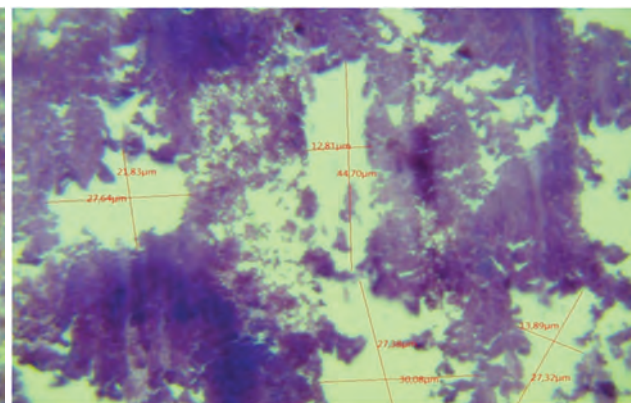


Рис. 6. Дія похідних нітрофуранів на біоплівки мікроорганізмів, збудників хронічних пієлонефритів у дітей раннього віку (мікроскоп Granum з масляною імерсією, окуляр WF 10x/18; об'єтив 100/1.25 160/0.17)

Обговорення. У цьому дослідженні встановлено, що утворення біоплівки мікроорганізмами, збудниками пієлонефритів у дітей раннього віку є постійною ознакою. Причому, спостерігається найвища активність біоплівкоутворення у дітей вікової категорії 0-3 роки з хронічною формою пієлонефриту, одночасно виявлено, що найбільш щільні біоплівки формували ізоляти *Klebsiella pneumoniae* у дітей, як з гострим, так й з хронічним пієлонефритом, що ускладнює лікування та пояснює виникнення рецидивів.

Здобути дані узгоджуються з результатами досліджень, що були проведені фахівцями Lagun LV, Atanasova IuV, Tapal'skiї DV, які вивчали інтенсивність утворення мікробних біоплівки *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, виділених при різних формах пієлонефриту та було зроблено висновок про те, що здатність утворювати біоплівки визначається як видами збудника, так і характером інфекційного процесу, в якому бере участь цей мікроорганізм. Інтенсивне утворення біоплівки кишковою паличкою, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, клінічними ізолятами *S. aureus* може бути важливим фактором хронізації інфекцій сечовивідних шляхів [14]. Вчені з Данії дослідили вплив п'ять груп антибактеріальних препаратів на бактеріальні біоплівки. Був досліджений вплив β-лактамних антибіотиків, хінолінів, аміноглікозидів, антимікробних пептидів та інших мембраноактивних біоцидів і азитроміцину з механізмом розвитку толерантності до цих препаратів. Вони повідомляють, що серед цих груп антибактеріальних препаратів до хінолінів не розвинулась набута толерантність у мікроорганізмів у складі біоплівки, проте відмічається порушена активність в анаеробних умовах [15]. Паралельно проведені аналогічні дослідження вченими з Італії, які повідомляють про неефективність антибактеріальної терапії одним антибіотиком і у своїх експериментальних дослідженнях доводять, що незважаючи на проведені дослідження антибіотикочутливості та раціонально підібрані дози і тривалість лікування, необхідно застосовувати одночасно антибактеріальні препарати з різними механізмами дії [16]. Фахівцями з Берліна було проведено експеримент, в якому досліджували антибіотикочутливість референтних і клінічних штамів *E. coli* та *P. aeruginosa* на планктонні клітини і на їх біоплівки. В результат експерименту було встановлено, що препарати першого ряду для лікування інфекцій, спричинених цими мікроорганізмами, у рекомендованих дозах діють лише на планктонні клітини, тоді як для біоплівкових форм така концентрація недостатня. Для ерадикації інфекцій, спричинених комбінацією мікроорганізмів, що утворюють біоплівки, необхідно розробити стандарти виявлення антибі-

отикочутливості для плівок і призначати антибактеріальну терапію з урахуванням чутливості вже до біоплівкових форм, що не суперечить нашому експерименту [17].

Взагалі кажучи, багато дослідників вважають що біоплівки мікроорганізмів є важливою причиною у виникненні тяжкого перебігу захворюваності, рецидивів та ускладнень, тому вимагають ефективних заходів профілактики та контролю. Дослідження біоплівки призведе до кращого розуміння процесу захворювання і згодом призведе до розробки нових варіантів профілактики та лікування. Ідеальний підхід буде включати застосування комбінацію протимікробних препаратів для зниження ризику розвитку резистентності та низької токсичності [18, 19].

Тому наші дослідження, щодо вивчення здатності формування біоплівки збудниками пієлонефритів у дітей раннього віку та вплив похідних нітрофуранів на них показали, що за дії похідних нітрофуранів утворені нові планктонні клітини не формували щільні вторинні біоплівки, як при гострій формі пієлонефриту, так й при хронічній, а при дослідженні дії на добові первинні біоплівки мікроорганізмів було встановлено, що оптична щільність їх практично не знижувалася, проте дані мікроскопії показують, що за дії похідних нітрофуранів утворюються «пори - щілини», через які можливе проникнення антибактеріальних препаратів у біоплівку і вплив на планктонні форми існування мікроорганізмів з наступною їх деградацією або зниженням активної здатності утворювати щільні біоплівки, що попереджає розвиток рецидивів

Висновки

1. Показники оптичної щільності ізолятів у дітей, хворих на хронічний пієлонефрит вірогідно вище, ніж у дітей, хворих на гострий пієлонефрит.
2. Похідні нітрофуранів в терапевтичній дозі ефективно діє на планктонні форми уропатогенів в активній фазі гострого і при загостренні хронічного пієлонефриту, а також запобігає утворенню вторинних біоплівок.
3. За впливу похідних нітрофуранів утворюються «отвори», через які можливе проникнення антибактеріальних препаратів у біоплівку, що попереджає розвиток рецидивів.
4. Похідні нітрофуранів ефективно призначати з метою профілактики розвитку пієлонефритів і в якості протирецидивної терапії хронічних пієлонефритів у дітей.

Перспективами подальшого розвитку є пошук антибактеріальних препаратів проти бактерій у складі біоплівки та розробка методів діагностики здатності бактерій до плівкоутворення з подальшою корекцією лікування дітей, хворих на гострий та хронічний пієлонефрит.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфліктів інтересів.

References

1. Shirobokov VP, Maydannik VG, Mituryareva IO. Modern views about the importance of biofilms in the development of urinary tract infections in children. *International Journal of Pediatrics, Obstetrics and Gynecology*. 2016; 9(2): 13-8.
2. Soto SM. Importance of biofilms in urinary tract infections: new therapeutic approaches. *Advances in Biology*. 2014; 2014: 1-13. doi: 10.1155/2014/543974
3. Nedashkivska VV, Dronova ML, Vrinchanu NO. Biofilms and their role in infectious diseases. *Ukrainian scientific and medical youth J*. 2016; 4(98): 10-9.
4. Stickler DJ. Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. *J Intern Med*. 2014; 276(2): 120-9. PMID: 24635559. doi: 10.1111/joim.12220
5. Vysakh A, Midhun SJ, Jayesh K, Jyothis M, Latha MS. Studies on biofilm formation and virulence factors associated with uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patient with acute pyelonephritis. *Pathophysiology*. 2018; 25(4): 381-7. PMID: 30032909. DOI: 10.1016/j.pathophys.2018.07.004
6. Eberly AR, Floyd KA, Beebout CJ, Colling SJ, Fitzgerald MJ, Stratton CW, et al. Biofilm Formation by Uropathogenic *Escherichia coli* Is Favored under Oxygen Conditions That Mimic the Bladder Environment. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(10): pii E2077. PMID: 28973965. PMCID: PMC5666759. DOI: 10.3390/ijms18102077
7. Dobrik OO, Secunda MO, Derkach IM. Modern approaches to the treatment of urinary tract infections in children taking into account the formation of bacterial biofilms. *Child health*. 2017; 12(4): 27-37. doi: 10.22141/2224-0551.12.4.2017.107629
8. Order No. 535 USSR Ministry of Health, Part I. Methodical instructions on the application of unified microbiological (bacteriological) research methods in clinical diagnostic laboratories. 1985 April 22. 123 p. [Russian]
9. Korneva EG. Primenenie polistirolovyh plastin pri opredelenii chuvstvitelnosti bakterij k antibiotikam. *Laboratornoe delo*. 1987; 9: 709-10. [Russian]
10. Sidashenko OI, Voronkova OS, Shevchenko TM, Sirokvasha OA. Chutlivist do antibiotikov planktonnih ta bioplivkovih kultur *Staphylococcus epidermidis*. *Mikrobiologiya i biotekhnologiya*. 2014; 1: 63–71.
11. O'Toole GA, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Ann Rev Microbiol*. 2000; 54: 49–79. PMID: 11018124. DOI: 10.1146/annurev.micro.54.1.49
12. Lapach SN. *Statistical methods in medical and biological research using Excel*. K: MORION; 2000. 320 p. [Russian]
13. Osipov VP, Lukyanova EM, Antipkin YuG. The method of statistical processing of medical information in scientific research. K: Planet of people; 2002. 200 p. [Russian]
14. Lagun LV, Atanasova IuV, Tapalskiĭ DV. Formation of microbial biofilms in causative agents of acute and chronic pyelonephritis. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 2013; 3: 18-23.
15. Ciofu O, Rojo-Molinero E, Macià MD, Oliver A. Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS*. 2017; 125: 304–19. PMID: 28407419. doi: 10.1111/apm.12673
16. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 2018; 9(1): 522–54. PMID: 28362216. PMCID: PMC5955472. DOI: 10.1080/21505594.2017.1313372
17. Wang L, Di Luca M, Tkhalishvili T, Trampuz A, Gonzalez Moreno M. Synergistic Activity of Fosfomycin, Ciprofloxacin, and Gentamicin Against *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Front Microbiol*. 2019; 10: 1-11. doi: 10.3389/fmicb.2019.02522
18. Delcaru C, Alexandru I, Podgoreanu P, Grosu M, Stavropoulos E, Chifiriuc MC, et al. Microbial Biofilms in Urinary Tract Infections and Prostatitis: Etiology, Pathogenicity, and Combating strategies. *Pathogens*. 2016; 5(4): pii E65. PMID: 27916925. PMCID: PMC5198165. doi: 10.3390/pathogens5040065
19. Grumezescu AM, Chifiriuc CM. Prevention of Microbial Biofilms - The Contribution of Micro and Nanostructured Materials. *Curr Med Chem*. 2018; 21: 3311. PMID: 24606506. doi: 10.2174/0929867321666140304101314

УДК [616.61-002.3-053.4:579.842.22:579.861.2]-085.28-085.015.8

**ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНК ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ПИЕЛОНЕФРИТА
У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА, КАК ОДИН ИЗ МЕХАНИЗМОВ ВОЗНИКНОВЕНИЯ
УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ**

**Мишина М. М., Макеева Н. И., Марченко И. А.,
Головачова В. А., Осолодченко Т. П.**

Резюме. Актуальность обусловлена увеличением количества детей, больных пиелонефритом на фоне нарушений уродинамики, вызванных как органическими, так и функциональными причинами.

Целью исследования является изучение способности основных уропатогенов к образованию биопленки и влиянием производных нитрофуранов на первичные и вторичные биопленки изолятов.

Собран материал для исследования у 37 детей в возрасте от 1 месяца до 3 лет, из них 26 детей, больных острым пиелонефритом и 11 детей, больных хроническим пиелонефритом. Верификация

диагноза проводилась согласно протоколу диагностики и лечения детей с инфекциями мочевой системы с помощью стандартизированных методик. Использованы микробиологические методы исследования.

Результаты исследования показали, что при действии производных нитрофуранов на первичные биопленки изолятов *P. mirabilis* и *S. aureus* образуются новые планктонные клетки, которые не формируют плотные вторичные биопленки: при острой форме пиелонефрита (диаметр поры биопленки составил от 1,72 мкм до 6,17 мкм), а при хронической форме пиелонефрита – от 4,47 мкм до 20,98 мкм. При исследовании действия производных нитрофуранов на суточные первичные биопленки микроорганизмов, возбудителей острых и хронических пиелонефритов у детей, установлено, что оптическая плотность их практически не снижалась. Однако данные микроскопии показывают, что под влиянием производных нитрофуранов образуются «поры-щели», диаметром от 5,98 мкм до 21,66 мкм и больше через которые возможно проникновение антибактериальных препаратов в биопленку и влияние на планктонные формы существования микроорганизмов с последующей их гибелью или снижением активной способности образовывать плотные биопленки, что предупреждает развитие рецидивов.

В результате проведенных исследований установлено, что показатели оптической плотности изолятов у детей с хроническим пиелонефритом значительно выше, чем у детей с острым пиелонефритом. Производные нитрофуранов в терапевтической дозе эффективно воздействуют на планктонные формы уропатогенов в активной фазе острого периода и при обострении хронического пиелонефрита, а также предотвращает образование вторичных биопленок. При воздействии производных нитрофуранов образуются «отверстия», сквозь которые возможно проникновение антибактериальных препаратов в биопленку, что предотвращает развитие рецидивов. Производные нитрофуранов эффективно применяли с целью профилактики развития пиелонефритов и в качестве противорецидивной терапии хронических пиелонефритов у детей.

Ключевые слова: пиелонефрит, дети, микроорганизмы, производные нитрофуранов, биопленки.

UDC [616.61-002.3-053.4:579.842.22:579.861.2]-085.28-085.015.8

Biofilms Formation by Pyelonephritis Causative Agents in Infants as a Mechanism of Resistance to Antimicrobial Agents

Mishyna M. M., Makieieva N. I., Marchenko I. A., Golovachova V. A., Osolodchenko T. P.

Abstract. In recent years, the number of children suffering from pyelonephritis on the background of disturbance of urodynamics has significantly increased, which is due to both organic and functional reasons.

The purpose of this research is to study the ability of major uropathogens to form biofilms and the effect of the preparation of nitrofurantoin series "Furamag" on primary and secondary biofilms of isolated bacteria.

Material and methods. We examined 37 children aged from 1 month to 3 years, including 26 children with acute pyelonephritis and 11 children with chronic pyelonephritis. The diagnosis was verified according to the protocol for diagnosis and treatment of children with urinary tract infections using standardized methods. Microbiological research methods were used.

Results and discussion. The study revealed that all uropathogenic microorganisms had the ability to form daily biofilm. The optical density of the isolated bacteria in children with chronic pyelonephritis was significantly ($p < 0.05$) higher than in children with acute pyelonephritis. We also found out that the densest daily biofilms were formed by *Klebsiella pneumoniae*, both in acute pyelonephritis and in chronic pyelonephritis. The strains of *Klebsiella pneumoniae*, which were isolated in children under 3 years of age who were treated for pyelonephritis had the ability to form daily biofilms: isolates of acute pyelonephritis form biofilms with a density of 3.21 (2.89; 3.67) opt. un., *K. pneumoniae* isolates of chronic form – 4.56 (4.02; 4.87) opt. un. with the active production of planktonic cells (2.14 (1.86; 2.65) opt. un. and 3.06 (2.84; 3.31) opt. un., respectively, which formed denser secondary biofilms having high resistance to antimicrobials agents. The study highlighted that strains of *P. mirabilis* and *S. aureus* had the ability to form dense daily biofilm. However, it should be noted that causative agents of acute pyelonephritis formed lower density biofilms than causative agents of chronic pyelonephritis. At the same time causative agents of chronic pyelonephritis formed thicker primary biofilms. For nitrofurantoin derivative action on primary biofilm formed by *P. mirabilis* and *S. aureus* determined that created new planktonic cells do not form the dense secondary biofilm. Biofilms formed by acute pyelonephritis causative agents had gap with diameter ranged from 1.72 μm to 6.17 μm , and chronic pyelonephritis – from 4.47 μm to 20.98 μm . In the study nitrofurantoin derivative action on daily primary biofilm microbial pathogens of acute and chronic pyelonephritis in children found that the optical density of almost not decreased, but the data show microscopy formed "pores-gap" with a diameter from 5.98 μm to 21.66 μm and larger due to which the penetration of antibacterial drugs into the biofilm

and the impact on planktonic forms of existence of microorganisms with their subsequent death or decrease in the active ability to form dense biofilms to prevent the development of relapses.

Conclusion. The optical density of isolates in children with chronic pyelonephritis is significantly higher than in children with acute pyelonephritis. Nitrofurantoin derivatives in therapeutic dose effectively act on planktonic forms of uropathogens in the active phase of acute and exacerbation of chronic pyelonephritis, as well as prevent the formation of secondary biofilms. Under the influence of nitrofurantoin derivatives, "holes" are formed through which the penetration of antibacterial drugs into the biofilm is possible, which prevents the development of relapses. Nitrofurantoin derivatives are effectively prescribed for the prevention of pyelonephritis and for the treatment of chronic pyelonephritis in children.

Keywords: pyelonephritis, children, microorganisms, nitrofurantoin derivatives, biofilms.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 10.11.2019 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування