УДК 616.717/.718–018.46–002:616–022.7–026.569

БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАН БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ ШТАММОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS И PSEUDOMONAS AERUGINOSA И ИХ АССОЦИАЦИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ IN VITRO

Шипицына И.В., Осипова Е.В.

ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. акад. Г.А. Илизарова Минздрава России», Курган, e-mail: office@ilizarov.ru

Исследована биопленкообразующая способность 12 клинических штаммов бактерий, принадлежащих к 2 таксонам, выделенных у 6 пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей из свищей в дооперационном периоде и из очага воспаления во время операции. Уровень биопленкообразования зависел от адгезивной способности бактерий, населяющих биопленку. Штаммы S. aureus и P. aeruginosa с различной степенью интенсивности формировали биопленку на поверхности 96-луночного планшета и стекла. В составе ассоциации (S. aureus + P. aeruginosa) адгезивная активность исследуемых микроорганизмов увеличивалась, что приводило к росту биопленки.

Ключевые слова: биопленка, адгезия, ассоциации микроорганизмов, хронический остеомиелит

BIOFILM-FORMING POTENTIAL OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND PSEUDOMONAS AERUGINOSA STRAINS FROM THE WOUNDS OF PATIENTS WITH CHRONIC OSTEOMYELITIS AND THEIR ASSOCIATIONS OBTAINED IN VITRO

Shipitsyna I.V., Osipova E.V.

FSBI «Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopaedics» (RISC «RTO») of the RF Ministry of Health, Kurgan, e-mail: office@ilizarov.ru

Biofilm-forming potential has been studied for 12 clinical strains of bacteria belonging to two taxons and isolated in 6 patients with chronic osteomyelitis of long tubular bones from fistulas preoperatively and from inflammation focus – intraoperatively. The level of biofilm-formation depended on adhesive ability of the bacteria occupying biofilm. S. aureus and P. aeruginosa strains formed biofilm on the surface of 96-hole plate and glass with different degree of intensity. When comprising association (S. aureus + P. aeruginosa) the adhesive activity of the microorganisms under study increased, thereby leading to the biofilm growth.

Keywords: biofilm, adhesion, association of microorganisms, chronic osteomyelitis

Лечение хронического остеомиелита длинных трубчатых костей относится к одной из сложных и актуальных проблем гнойной хирургии [3, 6]. Наиболее частыми возбудителями хронического остеомиелита являются грамположительные кокки рода *Staphylococcus* spp. с преобладанием штаммов *S. aureus*, и грамотрицательные микроорганизмы (*Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Pseudomonas aeruginosa* и др.), имеющие более высокую устойчивость к антибактериальным препаратам по сравнению с грамположительными бактериями. Состав микрофлоры при хроническом остеомиелите изменчив и зависит от формы и продолжительности заболевания. Микроорганизмы могут быть представлены как в монокультурах, так и в аэробно-анаэробных ассоциациях, в которых они приобретают новые качества, отсутствующие у составляющих ее видов [4, 5, 6]. Комплекс биологических свойств бактерий-ассоциантов определяет их способность к образованию биопленки, в составе которой микроорганизмы намного устойчивее к неблагоприятным воздействиям и недоступны для фагоцитоза [7, 9], что свидетельствует о большом практическом значении исследований, посвященных этиологической роли микробных сообществ и их биопленкообразующей способности.

Цель работы – изучение биопленкообразующей способности выделенных из ран больных хроническим остеомиелитом штаммов *S. aureus и P. aeruginosa* и их ассоциаций, полученных *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Исследована биопленкообразующая способность 12 клинических штаммов бактерий, принадлежащих к 2 таксонам (*S. aureus* – 6, *P. aeruginosa* – 6), выделенных в ассоциациях (*S. aureus* + *P. aeruginosa* – 6) у 6 пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей из свищей в дооперационном периоде и из очага воспаления во время операции.

Выделение и идентификацию исследуемых штаммов проводили общепринятыми методами[1].

Адгезивную активность штаммов изучали на модели эритроцитов человека А (II) Rh+ по методике В.И. Брилиса [1]. При оценке адгезивных свойств

[1] Выполнено м.н.с. Л.В. Розовой и Н.В. Годовых

использовали индекс адгезивности микроорганизмов (ИАМ). Исследование проводили под световым микроскопом, учитывая в общей сложности не менее 50 эритроцитов. Микроорганизмы считали неадгезивными при ИАМ – до 1,75; низкоадгезивными – от 1,76 до 2,5; среднеадгезивными – от 2,51 до 4,0; высокоадгезивными – ≥4,1.

Способность к образованию биопленки клиническими штаммами на поверхности 96-луночных полистироловых планшетов проводили по методу G.O. Toole и R. Kolter [8]. По уровню адсорбции красителя этанолом, измеренному в единицах оптической плотности (OD_{630}) на фотометре ELx808 (BioTek, США) при длине волны 630 нм оценивали активность формирования биопленки. Для интерпретации полученных данных определяли способность штаммами формировать биопленки в соответствии с критериями, разработанными Stepanovic S. et al. [10]: при значениях OD_{630} ниже 0,090 – считали, что штаммы не обладали способностью к образованию биопленки; при $0{,}090 < OD_{630} \leq 0{,}180$ – штаммы обладали слабой; при $0{,}180 < OD_{630} \leq 0{,}360$ – средней; при $OD_{630} \leq 0{,}360$ – высокой способностью к образованию биопленки.

Для визуальной и количественной оценки способности бактерий формировать биопленки на поверхности покровного стекла использовали стерильные стеклянные чашки Петри диаметром 100 мм. В каждую чашку помещали стерильное покровное стекло размером 24x24 мм, на поверхность которого осторожно наливали 200 мкл суточной культуры штамма с концентрацией клеток 10^7 кл/мл и помещали в термостат при 37 °С. Через 3 часа добавляли мясопептонный бульон до 2 мл и помещали в термостат при 37 °С. Через 24 и 48 часов после инкубации питательную среду сливали, поверхность стекол трижды промывали 1,15 М фосфатным буфером, фиксировали 96 ° спиртом, высушивали, окрашивали раствором генциан-виолета в течение 2 минут при комнатной температуре, после чего промывали фосфатным буфером.

Ассоциации микроорганизмов *in vitro* получали путем смешивания суточных культур штаммов в соотношении 1:1 в лунках планшетов и на покровном стекле.

Цифровые изображения полей зрения получали с помощью микроскопа Axio Lab.A1 и модульного программного обеспечения ZEN («Carl Zeiss», Германия). Для определения количественных характеристик использовали программу ImageJ (США). На цифровых изображениях препаратов измеряли площадь поля зрения и площадь, занимаемую единичными адгезированными клетками и микроколониями. Рассчитывали доли единичных адгезированных клеток и микроколоний в площади поля зрения. С каждого препарата вводили не менее 20 случайных полей зрения, полученные результаты усредняли.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения анализа данных AtteStat, версия 13.0 [2]. Значимость различий между группами проверяли с помощью непараметрических критериев Вилкоксона и Манна-Уитни. Различия между группами наблюдений считали статистически значимыми при $P < 0{,}05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При определении ИАМ установлено, что штаммы *S. aureus* обладали низкоадгезивными (2,24 усл. ед.), штаммы *P. aeruginosa* – среднеадгезивными свойствами (2,50 усл. ед.).

По данным фотометрического анализа наиболее активно биопленку на поверхности 96-луночного полистиролового планшета формировали штаммы *P. aeruginosa*, о чем свидетельствуют средние значения OD_{630} (рис. 1). Штаммы *S. aureus* характеризовались низкой способностью к формированию биопленки, что согласуется с данными адгезивной способности микроорганизмов.

Через 48 ч наблюдали активный рост биопленок по сравнению с контролем, что подтверждается значениями оптической плотности. Интенсивность биопленкообразования ассоциации микроорганизмов (*S. aureus* + *P. aeruginosa)* была в 1,6 раза выше по сравнению с уровнем биопленкообразования чистыми культурами исследуемых клинических штаммов.

В отличие от полистирола на поверхности покровного стекла способность к образованию биопленки была более выражена у штаммов *S. aureus*, о чем свидетельствует доля их микроколоний в площади поля зрения через 24 и 48 часов (рис. 2). В тоже время, у штаммов *P. aeruginosa* наблюдали более выраженную адгезию единичных клеток, доля которых в площади поля зрения в 3 раза превышала долю единичных адгезированных клеток штаммов *S. aureus*.

Отмечены различия и в структуре биопленок, определяемой размерами и долей микроколоний в площади поля зрения. Так, через 24 ч в биопленке, образованной штаммами *S. aureus* на поверхности стекла преобладали микроколонии размером до 10 мкм^2, в биопленках штаммов *P. aeruginosa* и ассоциации микроорганизмов большую часть площади занимали микроколонии размером от 10 до 100 мкм^2. Кроме того, в биопленках штаммов *P. aeruginosa* отсутствовали микроколонии размером от 1000 до 10 000 мкм^2, имеющихся в составе биопленок у штаммов *S. aureus* и ассоциации бактерий.

Через 48 ч происходило уменьшение доли микроколоний, образованных штаммами *S. aureus* и увеличение доли микроколоний, образованных штаммами *P. aeruginosa*, способность к образованию биопленки ассоциацией микроорганизмов оставалась прежней, что было связано с изменением соотношения микроколоний различного размера. Так, в биопленках штаммов *S. aureus* наблюдали уменьшение доли

микроколоний всех размеров. В биопленках, образованных штаммами *P. aeruginosa,* напротив, происходило увеличение долей микроколоний всех размеров и появление микроколоний размером от 1000 до 10 000 мкм^2. В биопленках, образованных ассоциацией микроорганизмов (*S. aureus* + *P. aeruginosa)* уменьшалась доля микроколоний размером до 100 мкм^2 и одновременно, в 3,7 раза, увеличивалась доля микроколоний размером от 1000 до 10 000 мкм^2, которые и занимали большую часть поверхности стекла.

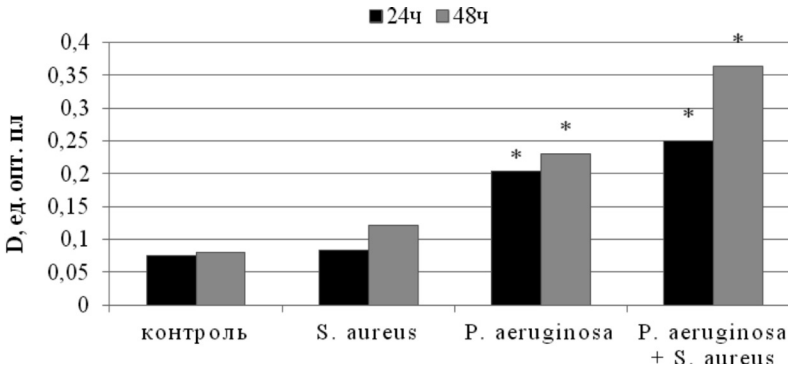

Рис. 1. Изменение средней оптической плотности красителя в лунках полистироловых планшетов, отражающей интенсивность формирования биопленки на их поверхности, штаммами S. aureus и P. aeruginosa и их ассоциациями, полученными in vitro.
** P < 0,001 – различия значимы по сравнению с контролем*

Необходимо отметить, что доли микроколоний, образованные чистыми культурами штаммов на данном сроке наблюдения, были меньше доли микроколоний, образованных ассоциацией микроорганизмов.

Известно, что микробные биопленки ответственны за этиологию и патогенез многих острых и хронических бактериальных инфекций у человека, в том числе и при хроническом остеомиелите.

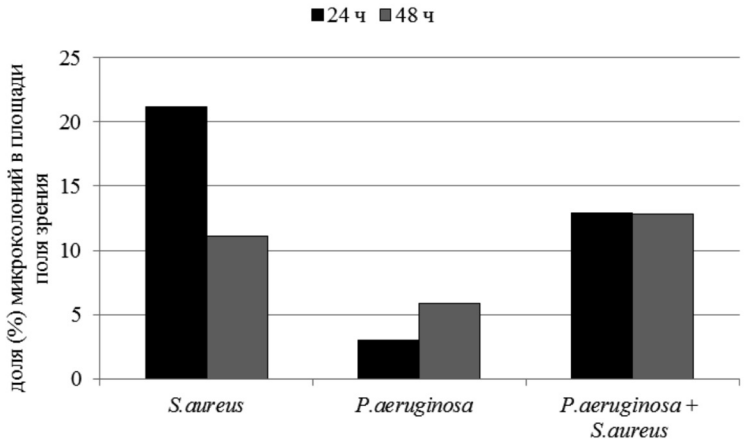

Рис. 2. Соотношение долей микроколоний, образованных штаммами S. aureus и P. aeruginosa и их ассоциациями, полученными in vitro, на поверхности покровного стекла через 24 и 48 часов.
** P < 0,005 – различия значимы по сравнению с предыдущим сроком наблюдения*

При формировании биопленок у многих бактерий происходит переключение систем метаболизма от свободноживущего к организованному «общественному» образу жизни (Quorum Sensing), более характерному для многоклеточных микроорганизмов. В составе таких сообществ микроорганизмы приобретают устойчивость к антибактериальным препаратам и факторам иммунной защиты макроорганизма [5, 7, 9].

Выводы

Результаты проведенного исследования показали, что уровень биопленкообразования зависит не только от адгезивной способности штаммов, населяющих биопленку, но

и от поверхности, к которой прикрепляются бактерии. Так, несмотря на низкоадгезивные свойства, штаммы *S. aureus* активно формировали микроколонии на поверхности стекла. Среднеадгезивные штаммы *P. aeruginosa* обладали более выраженной способностью к образованию микроколоний на поверхности полистиролового планшета. Данный факт свидетельствует о том, что микроорганизмы адаптируются к новым условиям за счет набора вирулентных свойств, определяющих адгезию бактериальных клеток к различным поверхностям. Биопленкообразующая способность ассоциации микроорганизмов: *S. aureus* + *P. aeruginosa*, была выше по сравнению с чистыми культурами исследуемых штаммов, что объясняется определенными взаимоотношениями, характер которых зависит от физиологических особенностей и потребностей совместно развивающихся микробов [9]. Способность клинических штаммов бактерий формировать биопленки *in vitro* на поверхности различных носителей, свидетельствует об их возможности колонизировать ткани организма и вызывать хронизацию инфекционного процесса при остеомиелите.

Список литературы

1. Бриллис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П. и др. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. – 1986. – № 4. С. 210–212.

2. Гайдышев И.П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++. – СПб.: BXB Петербург, 2004. – 505 с.

3. Кирдей Е.Г., Барабаш А.П., Данилов Д.Г. и др. Иммунный статус больных с различными формами остеомиелитов // Сибирский медицинский журнал. – 1997. – № 1–2. – С. 19–21.

4. Миллер Г.Г. Биологическое значение ассоциаций микроорганизмов // Вестник РАМН – 2000. – № 1. – С. 45–51.

5. Науменко З.С., Шипицына И.В. Сравнительная оценка адгезивной активности бактерий, выделенных у больных из остеомиелитического очага и из ран открытых переломов // Гений ортопедии. – 2011. – № 4. – С. 31–34.

6. Столяров Е.А., Батаков Е.А., Ишутов И.В., Ладонин С.В. Хронический остеомиелит – современное состояние проблемы // Самарский медицинский журнал. – 2004. – № 5–6. – С. 28–30.

7. Olson M.E. et al. Biofilm bacteria: formation and compararive susceptibility of antibiotics // Can J Vet Res. – 2002, April. – № 66 (2). – P. 86-92.

8. OToole G.F., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development // Mol. Microbiol. – 1998. – № 30. – P. 295–304.

9. Ryder M.A. Catheter-Related Infections: It's All About Biofilm // Topics in Advanced Practice Nursing eJournal. – 2005. – № 5 (3). – P. 21.

10. Stepanovic S., Vukovi ć D., Jezek P. et al. Influence of dynamic conditions on biofilm formation by staphylococci // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2001. – № 20. – P. 502–504.