УДК 576.52:579.84:616.71-001-002.2

БИОПЛЕНКООБРАЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ КЛИНИЧЕСКИ ЗНАЧИМЫХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ, 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, выделенных у 64 пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей из свищей в дооперационном периоде и из очага воспаления во время операции, 93 клинических штаммов бактерий, принадлежащих к 6 таксонам и их ассоциаций, полученных in vitro. Среди грамотрицательных микроорганизмов чаще встречаются средне- и высокоадгезивные штаммы, в группе грамположительных микроорганизмов – низкоадгезивные штаммы. Штаммы P. aeruginosa, Kl. pneumonia, S. marcescens активнее формируют биопленку на поверхности 96-и луночных планшетах в отличие от штаммов S. aureus, S. epidermidis, Enterococcus sp., что согласуется с данными адгезивной активности исследуемых культур.

Ключевые слова: *биопленки, хронический остеомиелит, адгезия*, *ассоциации микроорганизмов*

BIOFILM-FORMING POTENTIAL OF CLINICALLY SIGNIFICANT STRAINS OF THE BACTERIA, ISOLATED IN PATIENTS WITH CHRONIC POSTTRAUMATIC OSTEOMYELITIS, AND THEIR IN VITRO-OBTAINED ASSOCIATIONS

Shipitsyna I.V., Osipova E.V.

Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopedics» of the RF Ministry of Health, Kurgan, e-mail: office@ilizarov.ru

The work deals with studying the biofilm-forming potential of 93 clinical strains of the bacteria related to six taxa, and there in vitro-obtained associations isolated from the fistulae preoperatively, as well as from the focus of inflammation during surgery in 64 patients with long tubular bone osteomyelitis. The strains of medium and high adhesion are more common among gram-negative microorganisms, while low-adhesive strains are more common in gram-positive microorganism group. P. aeruginosa, Kl. pneumonia, S. marcescens strains form the biofilm on the surface of 96-well plates more actively unlike S. aureus, S. epidermidis, Enterococcus sp. strains which is consistent with adhesive activity data of the studied cultures.

Keywords: biofilms, chronic osteomyelitis, adhesion, microorganism associations

Хронический остеомиелит остается одной из сложных и актуальных проблем гнойной хирургии [4]. В успешном лечении остеомиелита наряду с традиционными хирургическими методами немаловажную роль играет своевременная микробиологическая диагностика, позволяющая выявить возбудителя инфекции. 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. [5, 6]. В последние годы наблюдается тенденция к повышению удельного веса ассоциаций микроорганизмов, вызывающих инфекционный процесс при остеомиелите. Совместное развитие микроорганизмов в микс-популяции может приводить к усилению патогенного потенциала, ассоциированного с персистентными свойствами бактерий [2]. Комплекс биологических свойств бактерий-ассоциантов определяет их способность к образованию биопленки, в составе которой микроорганизмы намного устойчивее к антимикробным препаратам и факторам иммунной защиты макроорганизма [7, 9]. Изучение этиологической роли микробных сообществ, их биопленкообразующей способности имеет большое практическое значение для оценки эффективности проводимой антибиотикотерапии, поиска новых путей диагностики и подавления роста биопленок.

Цель исследования. Изучить адгезивный потенциал клинически значимых штаммов микроорганизмов, выделенных у больных хроническим посттравматическим остеомиелитом, и оценить биопленкообразующую способность монокультур микроорганизмов и их ассоциаций, полученных *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Исследованы 93 клинических штаммов бактерий, принадлежащих к 6 таксонам (Staphylococcus aureus – 30, Staphylococcus epidermidis – 18 Enterococcus sp. – 18, Pseudomonas aeruginosa – 11, Klebsiella

pneumonia. – 10, Serratia marcescens – 6), выделенных из свищей в дооперационном периоде и из очага воспаления во время операции у 64 пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей. Изучена биопленкообразующая способность монокультур и их ассоциаций, полученных in vitro (S. aureus + P. aeruginosa – 6; S. aureus + Kl. pneumonia – 5; S. aureus +S. marcescens – 6; S. aureus + S. epidermidis – 2; S. aureus+ Enterococcus sp. – 2).

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 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 $OD_{630}>0{,}360$ – высокой способностью к образованию биопленки. Ассоциации микроорганизмов in vitro получали путем смешивания суточных культур штаммов в соотношении 1:1 в лунках планшетов.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения анализа данных AtteStat, версия 13.0 [3]. Значимость различий между группами проверяли с помощью непараметрических критериев Вилкоксона и Манна-Уитни. Различия между группами наблюдений считали статистически значимыми при $P< 0{,}05$.

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

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенное исследование показало, что распределение по степени адгезивности неодинаково для рассматриваемых групп микроорганизмов. Так, в группе грамположительных бактерий ИАМ изменялся от 1,92 ± 0,18 ед. у штаммов Enterococcus sp. до 2,20 ± 0,12 ед. у штаммов S. aureus. Среднеадгезивными свойствами обладали 23 % штаммов грамположительных микроорганизмов. Высокоадгезивных штаммов выявлено не было.

Все штаммы грамотрицательных микроорганизмов обладали адгезивной способностью. Большую часть грамотрицательных бактерий составили среднеадгезивные штаммы (70 % штаммов Kl. pneumonia, 46 % штаммов Ps. aeruginosa, 50 % штаммов S. marcescens). ИАМ изменялся от 2,74 ± 0,19 ед. у штаммов Ps. aeruginosa до 3,45 ± 0,24 ед. у штаммов Kl. pneumonia. В группе грамотрицательных микроорганизмов 20 % штаммов Kl. pneumonia, 18 % штаммов P. aeruginosa, 33 % штаммов S. marcescens обладали высокоадгезивными свойствами (таблица).

По данным фотометрического анализа наиболее активно биопленку на поверхности 96-луночного полистиролового планшета формировали грамотрицательные микроорганизмы, о чем свидетельствуют средние значения OD_{630} (рисунок).

Штаммы грамположительных микроорганизмов характеризовались низкой биопленкообразующей способностью, что согласуется с данными их адгезивной активности.

Адгезивная способность клинически значимых штаммов бактерий, выделенных у больных хроническим посттравматическим остеомиелитом

Штаммы	НеАШ, %	НАШ, %	САШ, %	ВАШ, %	ИАМ, ед.
S. aureus (n=30)	19	52	29	-	2,20 ±0,12
S. epidermidis (n= 18)	24	52	24	-	1,97±0,23
Enterococcus sp. (n=18)	28	56	17	-	1,92±0,18
Kl. pneumonia (n=10)	-	10	70	20	3,45±0,24
P. aeruginosa (n=11)	-	36	46	18	2,74±0,19
S. marcescens (n=6)	-	17	50	33	3,45±0,28

Примечание. НеАШ – не адгезивные штаммы; НАШ – низкоадгезивные штаммы; СШ – среднеадгезивные штаммы; ВАШ – высокоадгезивные штаммы; ИАМ – индекс адгезивности микроорганизмов.

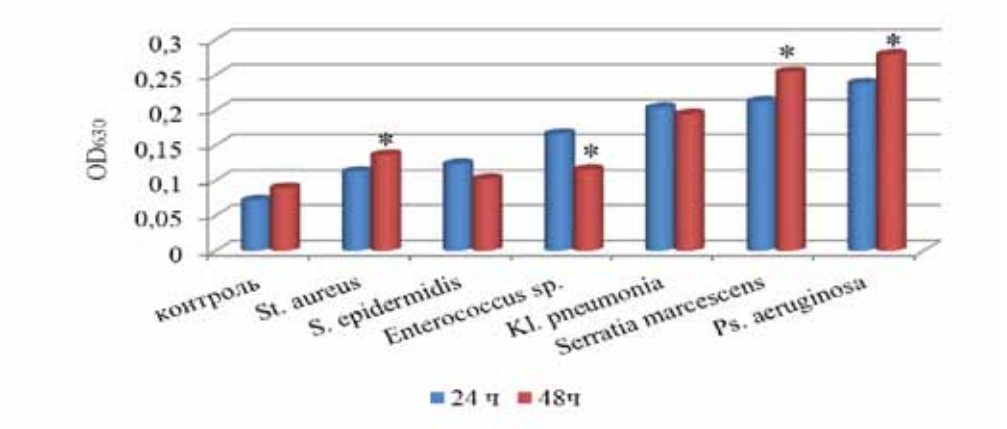

*Рис. 1. Биопленкообразующая способность клинически значимых штаммов микроорганизмов, выделенных у больных хроническим посттравматическим остеомиелитом. Примечание. * – уровень значимости различий по сравнению с 24 ч (p<0,05)*

Через 48 ч наблюдали активный рост биопленок, образованных штаммами S. aureus, P. aeruginosa, S. marcescens по сравнению со значениями, полученными через 24 ч.

Биопленкообразующая способность штаммов Enterococcus sp. через 48 ч. была в 1,4 раза ниже суточных результатов.

Ассоциации микроорганизмов S. aureus + P. aeruginosa и S. aureus + S. marcescens обладали средней биопленкообразующей способностью, S. aureus + Kl. pneumonia – слабым биопленкообразованием. Микс – культуры грамположительных микроорганизмов (S. aureus + S. epidermidis, S. aureus + Enterococcus sp.) не формировали биопленки на поверхности 96-и луночных планшетах (рис. 2).

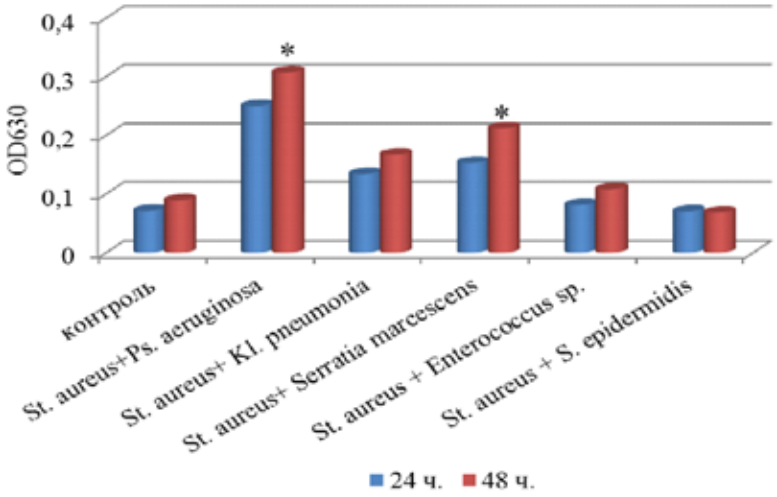

*Рис. 2. Биопленкообразующая способность микс – культур микроорганизмов полученных in vitro через 24ч /48 ч. Примечание. * – уровень значимости различий по сравнению с 24 ч. (p<0,05)*

Уровень биопленкообразования микс-культур микроорганизмов через 48 ч. эксперимента был выше по сравнению с результатами на первые сутки, однако значения оптической плотности, в большинстве случаев, не превышали уровни биопленкообразования монокультур исследуемых штаммов. Биопленкообразующая способность ассоциаций микроорганизмов S. aureus + P. aeruginosa через 48 ч. была в 1,2 раза выше по сравнению с уровнем биопленкообразования монокультур штаммов P. aeruginosa. Рост биопленок, образованных ассоциациями микроорганизмов: S. aureus + Kl. pneumonia, S. aureus + S. marcescens был незначительным по сравнению с биопленкообразующей способностью монокультур штаммов Kl. pneumonia, S. marcescens соответственно.

Высокая биопленкообразующая способность ассоциации микроорганизмов: S. aureus + P. aeruginosa по сравнению с чистыми культурами исследуемых штаммов объясняется взаимоотношениями, характер которых зависит от физиологических особенностей и потребностей совместно развивающихся микробов [10].

Заключение

Таким образом, у больных с хроническим остеомиелитом среди грамотрицательных микроорганизмов чаще встречаются средне- и высокоадгезивные штаммы, а в группе грамположительных микроорганизмов – низкоадгезивные штаммы. Штаммы P. aeruginosa, Kl. pneumonia, S. marcescens активнее формируют биопленку на поверхности 96-и луночных планшетах в отличие от штаммов S. aureus, S. epidermidis, Enterococcus sp., что согласуется с данными адгезивной активности исследуемых культур. Проведенное исследование показало, что межмикробные взаимоотношения в ассоциациях микроорганизмов в зависимости от индивидуальных свойств каждого ассоцианта могут быть направлены как на стимуляцию роста биопленки, так и на его ослабление. Со временем свойства образующих ассоциации штаммов могут изменяться, соответственно, будет изменяться и способность микс-культуры к образованию биопленки.

Список литературы

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

2. Габидуллин З.Г., Габидуллин Ю.З., Ахтариева А.А. и соавт. Характеристика свойств, определяющих персистенцию моно- и ассоциированных культур условно-патогенных энтеробактерий // Журн. микробиол. – 2006. – № 4. – С. 62-64.

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

4. Леонова С.Н. Причины и профилактика хронического травматического остеомиелита // Травматол. и ортопедия России. – 2006. – № 2. С. 186 – 187.

5. Пхкадзе Т.Я., Окропиридзе Г.Г., Малышева Э.С. Микробиологический контроль в современной высокотехнологичной травматологии и ортопедии. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – №9. – С.22а-22.

6. Розова Л.В., Годовых Н.В. Сравнительная характеристика видового состава микроорганизмов при хроническом посттравматическом и гематогенном остеомиелите // Гений ортопедии. – 2014. – №2. – С. 56-59.

7. Романова Ю.М., Диденко Л.В., Толордава Э.Р. и соавт. Биопленки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками. // Вестник РАМН. – 2011. – № 10. – С. 31-39.

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

9. Ryder MA. Catheter-related infections: It›s all about biofilm. // Topics in Advanced Practice Nursing Journal.- 2005. № 5. – P. 3-21.

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.