УДК 576.52:615.33:616.71-002.2

ОЦЕНКА ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ШТАММОВ KLEBSIELLA PNEUMONIAE, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАН БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

Шипицына И.В., Розова Л.В.

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

В работе проведено исследование биопленкообразующей способности монокультур штаммов Klebsiella pneumoniae, выделенных из ран больных хроническим остеомиелитом, и их ассоциаций со Staphylococcus aureus, полученных in vitro. Исследована чувствительность штаммов K. pneumoniae к ряду антибиотических препаратов (групп: β-лактамов, аминогликозидов, хинолонов). Штаммы K. pneumoniae характеризовались высокой частотой резистентности к используемым антибактериальным препаратам. Наибольшей эффективностью в отношении штаммов K. pneumoniae обладали имипенем и карбапенем. Показано, что штаммы K. pneumoniae обладают выраженными адгезивными свойствами. На поверхности полистироловых планшетов активно формируют биопленки. Биопленкообразующая способность ассоциации микроорганизмов (K. pneumoniae + S. aureus) через 48 ч исследования не отличается от уровня биопленкообразования монокультур штаммов K. pneumoniae.

Ключевые слова: хронический остеомиелит, биопленкообразующая способность, адгезия, антибиотикочувствительность

EVALUATION OF PATHOGENIC POTENTIAL OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE STRAINS ISOLATED FROM THE WOUNDS OF PATIENTS WITH CHRONIC OSTEOMYELITIS

Shipitsyna I.V., Rozova L.V.

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

The biofilm-forming potential of the monocultures of Klebsiella pneumoniae strains, isolated from the wound of patients with chronic osteomyelitis, as well as their associations with Staphylococcus aureus obtained in vitro examined in the work. The sensitivity of K. pneumoniae strains to some antibiotic preparations (related to the groups of β-lactames, aminoglycosides, chinolones) studied. K. pneumoniae characterized by high-frequency resistance to the antibacterial preparations used. Imipenem and Carbapenem were the most efficient against K. pneumoniae strains. K. pneumoniae strains demonstrated to have marked adhesive properties. They actively form biofilms on the surface of polystyrene plates. The biofilm-forming potential of the microorganism association (K. pneumoniae + S. aureus) after 48 hours of the study doesn't differ from the level of biofilm-formation of K. pneumoniae strain monocultures.

Keywords: chronic osteomyelitis, biofilm-forming potential, adhesion, antibiotic sensitivity

В связи с широким распространением резистентных штаммов микроорганизмов, формированием биопленок, снижением эффективности антибиотикотерапии, лечение хронического остеомиелита до сих пор остается одной из сложных и актуальных проблем гнойной хирургии [4]. Наиболее частыми возбудителями хронического остеомиелита являются грамположительные кокки рода *Staphylococcus* spp. с преобладанием *S. aureus* и грамотрицательные бактерии, в частности *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, которые, как правило, высеваются в ассоциации со стафилококком [5, 6]. Наличие у больных в очаге воспаления *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* чаще всего свидетельствует о присоединении внутрибольничной флоры. В развитии патологического процесса при грамотрицательной инфекции имеют значение как токсины и токсичные продукты, выделяемые бактериями, так и возбудитель вследствие его высокой способности к инвазии [2]. Более того, для очень многих грамотрицательных микроорганизмов, таких как *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, и др. доказана способность формировать биопленки и вызывать хронизацию инфекционного процесса [7]. Плохое проникновение антибактериальных препаратов в биопленку может приводить к отбору устойчивых штаммов, и как следствие, к возникновению рецидивов инфекции [8, 9].

Изучение этиологической роли грамотрицательной микрофлоры при хроническом остеомиелите, их биопленкообразующей способности и антибиотикочувствительности к используемым в лечении инфекции препаратам имеет большое практическое значение для оценки эффективности проводимой антибиотикотерапии, поиска новых путей диагностики и подавления роста биопленок.

Цель исследования

Изучить антибиотикочувствительность штаммов *K. pneumoniae,* выделенных из ран больных хроническим остеомиелитом, оценить биопленкообразующую способность монокультур и их ассоциаций (*K. pneumoniae* + *S. aureus*), полученных *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Исследованы 18 клинических штаммов бактерий, принадлежащих к 2 таксонам (*S. aureus* – 6, *K. pneumoniae* – 12), выделенных из свищей в дооперационном периоде и из очага воспаления во время операции у 10 пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей. Изучена биопленкообразующая способность монокультур штаммов *K. pneumoniae* и их ассоциаций, полученных *in vitro* (*K. pneumoniae* + *S. aureus – 6*).

Идентификацию и определение чувствительности исследуемых штаммов к антибактериальным препаратам проводили на бактериологическом анализаторе WalkAway-40 Plus («Siemens», США). При характеристике антибиотикочувствительности микроорганизмов использовались общепринятые показатели: «чувствительные», «умеренно резистентные» и «резистентные» штаммы.

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.

Исследование способности выделенных штаммов формировать биопленки на поверхности 96-луночных полистироловых планшетов проводили по методу G.O'Toole и R. Kolter [10]. По уровню адсорбции красителя этанолом, измеренному в единицах оптической плотности (OD630) 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. [11]: при значениях OD630 ниже 0,090 – считали, что штаммы не обладали способностью к образованию биопленки; при 0,090 < OD630 ≤ 0,180 – штаммы обладали слабой; при 0,180 < OD630 ≤ 0,360 – средней; при OD630 > 0,360 – высокой способностью к образованию биопленки.

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 считались статистически значимыми при P < 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

По результатам микробиологического исследования *K. pneumoniae* была выявлена у 4 пациентов в монокультуре, у 8 – в составе ассоциации со *S. aureus*. Штаммы *S. aureus* обладали низкоадгезивными свойствами (ИАМ – 1,85 ± 0,13 усл. ед.), штаммы *K. pneumoniae* – среднеадгезивными свойствами (ИАМ составил 2,94 ± 0,12 усл. ед.).

По данным фотометрического анализа, наиболее активно биопленку на поверхности 96-луночного полистиролового планшета формировали штаммы *K. pneumoniae*, о чем свидетельствуют средние значения оптической плотности OD_{630} (рис. 1). Штаммы *S. aureus* характеризовались низкой способностью к формированию биопленки, что согласуется с данными адгезивной способности микроорганизмов. Уже через 24 ч исследования уровень биопленкообразования штаммов *K. pneumoniae* в 3,2 раза был выше контрольных значений.

Через 48 ч наблюдали активный рост биопленок по сравнению с контролем, что подтверждается значениями оптической плотности. Уровень биопленкообразования штаммов *S. aureus* был в 1,4 раза выше по сравнению с суточными значениями монокультур. Биопленкообразующая способность штаммов *K. pneumoniae* в 2,8 раза была выше контрольных показателей и незначительно выше суточных значений.

Интенсивность биопленкообразования ассоциации микроорганизмов (*K. pneumoniae* + *S. aureus)* на первые сутки эксперимента была в 1,7 раза выше контрольных значений и в 1,2 раза ниже оптической плотности OD630 монокультур штаммов *K. pneumoniae.* Через 48 ч исследования биопленкообразующая способность ассоциации бактерий (*K. pneumoniae* + *S. aureus*) достоверно не отличалась от OD630 монокультур штаммов *K. pneumoniae.*

Характеристика чувствительности штаммов *K. pneumonia*е к антибактериальным препаратам представлена на рис. 2.

При анализе активности β-лактамных антибиотиков обращает на себя внимание высокая частота резистентности к ампициллину (90% нечувствительных штаммов), к цефепиму (60%). Неактивны в отношении *K. pneumoniae* были защищенные бета-лактамы: 90% резистентных штаммов *K. pneumoniae* к амоксициллин/клавулановой кислоте.

Из группы хинолонов устойчивость к ципрфлоксацину проявили 80% штаммов *K. pneumoniae*. Среди карбапенемов выявлен высокий процент чувствительных штаммов к имипенему и меропинему (100%).

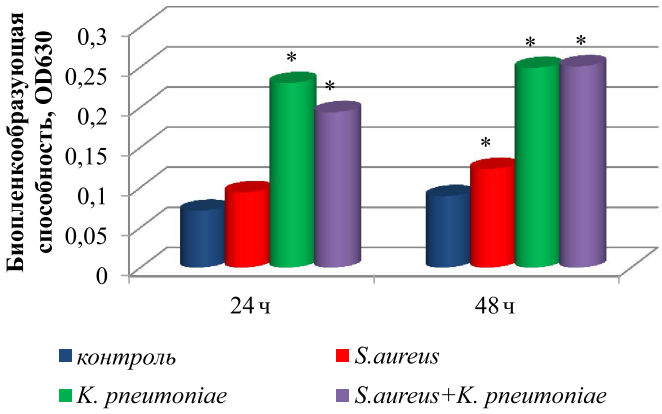

*Рис. 1. Биопленкообразующая способность штаммов S. aureus, K. pneumoniae и их ассоциации (K. pneumoniae + S. aureus), полученных in vitro. Примечание. * – уровень значимости различий по сравнению с контрольными значениями (P < 0,05)*

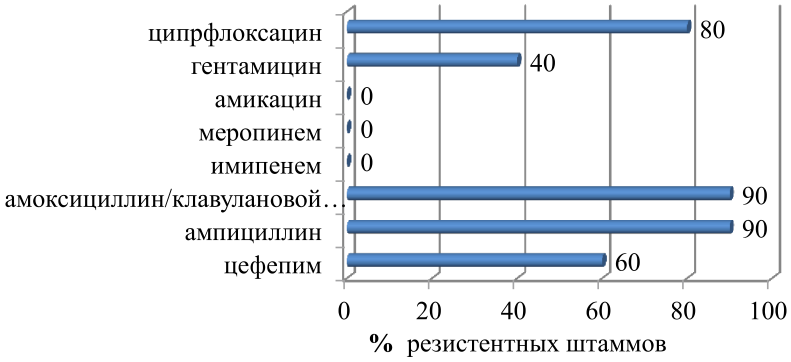

Рис. 2. Характеристика резистентных к антибиотикам штаммов Kl. pneumoniae, выделенных от больных хроническим остеомиелитом (%)

В группе аминогликозидных препаратов эффективным в отношении штаммов *K. pneumoniae* был амикацин (100 % чувствительных штаммов) и гентамицин (60 %).

Штаммы *K. pneumoniae* характеризовались высокой частотой резистентности к используемым антибактериальным препаратам. Различий в антибиотикочувствительности между штаммами *K. pneumoniae,* выделенными в монокультуре и в составе ассоциации со *S. aureus* не наблюдалось. Наибольшей эффективностью в отношении штаммов *K. pneumoniae* обладали имипенем и карбапенем.

Возросшая антибиотикорезистентность и развитие биопленок являются огромной проблемой в лечении хронических инфекций. Так, например, показана неэффективность использования ампициллина и ципрофолксацина при лечении инфекций, вызванных штаммами *K. pneumoniae* [8]. Одной из негативных характеристик биопленок является то, что они, как правило, проявляют устойчивость одновременно ко многим антибиотикам из разных групп [12]. В связи с этим возникает необходимость поиска новых подходов в лечении биопленочных инфекций.

Выводы

Штаммы *K. pneumoniae* обладают выраженными адгезивными свойствами. На поверхности полистироловых планшетов активно формируют биопленки. Биопленкообразующая способность ассоциации микроорганизмов (*K. pneumoniae* + *S. aureus*) через 48 ч исследования не отличается от уровня биопленкообразования монокультур штаммов *K. pneumoniae.*

В целом, выделенные штаммы *K. pneumoniae* характеризуются низким уровнем чувствительности к большинству антибактериальных препаратов.

Несмотря на низкий процент выделения штаммов *K. pneumoniae* из ран больных хроническим остеомиелитом, высокая способность к биопленкообразованию и возросшая резистентность к антибактериальным препаратам может быть одной из причин низкой эффективности лечения инфекции, вызванной данным возбудителем.

Полученные данные важно учитывать при лечении хронического остеомиелита, вызванного бактериями *K. pneumoniae.*

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. Бондаренко В.М. Генетические маркеры вирулентности условно патогенных бактерий / В.М. Бондаренко // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 3. – С. 94–99.

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. Anderl J.N., Franklin M.J., Stewart P.S. Role of antibiotic penetration limitation in Klebsiella pneumoniae biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:1818–24.

9. Mandsberg L.F, Ciofu O., Kirkby N., Christiansen L.E., Poulsen H.E., Høiby N. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. Antimicrob Agents Chemother 2009.

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

11. 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.

12. Weigel L.M., Donlan R.M., Shin D.H., et al. High-level vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolates associated with a polymicrobial biofilm. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:231–8.

References

1. Brillis V.I., Brilene T.A., Lencner H.P. i soavt. Metodika izuchenija adgezivnogo processa mikroorganizmov // Laboratornoe delo. 1986. no. 4. pp. 210–212.

2. Bondarenko V.M. Geneticheskie markery virulentnosti uslovno patogennyh bakterij / V.M. Bondarenko // Zhurn. mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii. 2011. no. 3. pp. 94–99.

3. Gajdyshev I.P. Reshenie nauchnyh i inzhenernyh zadach sredstvami Excel, VBA i C/C++. SPb.: VHV Peterburg, 2004. 505 p.

4. Leonova S.N. Prichiny i profilaktika hronicheskogo travmaticheskogo osteomielita // Travmatol. i ortopedija Rossii. 2006. no. 2. pp. 186–187.

5. Phkadze T.Ja., Okropiridze G.G., Malysheva Je.S. Mikrobiologicheskij kontrol v sovremennoj vysokotehnologichnoj travmatologii i ortopedii. // Klinicheskaja laboratornaja diagnostika. 2007. no. 9. pp. 22a–22.

6. Rozova L.V., Godovyh N.V. Sravnitelnaja harakteristika vidovogo sostava mikroorganizmov pri hronicheskom posttravmaticheskom i gematogennom osteomielite // Genij ortopedii. 2014. no. 2. pp. 56–59.

7. Romanova Ju.M., Didenko L.V., Tolordava Je.R. i soavt. Bioplenki patogennyh bakterij i ih rol v hronizacii infekcionnogo processa. Poisk sredstv borby s bioplenkami. // Vestnik RAMN. 2011. no. 10. pp. 31–39.

8. Anderl J.N., Franklin M.J., Stewart P.S. Role of antibiotic penetration limitation in Klebsiella pneumoniae biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:1818–24.

9. Mandsberg L.F, Ciofu O., Kirkby N., Christiansen L.E., Poulsen H.E., Høiby N. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. Antimicrob Agents Chemother 2009.

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

11. 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. no. 20. pp. 502–504.

12. Weigel L.M., Donlan R.M., Shin D.H., et al. High-level vancomycin-resistant Staphylococcus aureus isolates associated with a polymicrobial biofilm. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51:231–8.