

УДК 579.84-026.569:616.71-002

АДГЕЗИВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ, ВЫДЕЛЯЕМОЙ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ОСТЕОМИЕЛИТОМ

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*

Изучены адгезивные характеристики 95 клинических штаммов бактерий, принадлежащих к 6 таксонам (*Pseudomonas aeruginosa* – 40, *Acinetobacter baumannii* – 14, *Klebsiella pneumoniae* – 13, *Escherichia coli* – 12, *Enterobacter cloaceae* – 9, *Serratia marcescens* – 7), выделенных из свищей в дооперационном периоде и из очага воспаления, во время операции у больных хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей в период с 2013 по 2015 гг. Все изученные клинические штаммы грамотрицательных микроорганизмов обладали адгезивными свойствами. Наибольшим адгезивным потенциалом обладали штаммы *S. marcescens* (ИАМ = 3,45 ± 0,24 ед.). Среднеадгезивные свойства проявляли 64,3% штаммов *Ac. baumannii*, 57,5% штаммов *P. aeruginosa*, 55,6% штаммов *E. cloaceae*, 53,9% штаммов *K. pneumoniae*, 16,7% штаммов *E. coli*. Из исследуемых клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Ac. baumannii*, *S. marcescens*, *E. cloaceae*, *E. coli*) наилучшая способность к биопленкообразованию выявлена у неферментирующих микроорганизмов рода *P. aeruginosa*. Штаммы *E. coli*, обладая низкоадгезивными свойствами, слабо формируют биопленки.

Ключевые слова: адгезия, биопленки, хронический остеомиелит

ADHESIVE CHARACTERISTICS OF GRAM-NEGATIVE MICROFLORA ISOLATED IN PATIENTS WITH CHRONIC OSTEOMYELITIS

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 adhesive characteristics studied for 95 clinical strains of the bacteria belonging to six taxa (*Pseudomonas aeruginosa* – 40, *Acinetobacter baumannii* – 14, *Klebsiella pneumoniae* – 13, *Escherichia coli* – 12, *Enterobacter cloaceae* – 9, *Serratia marcescens* – 7) and isolated from fistulae preoperatively, as well as from an inflammatory focus intraoperatively in patients with chronic long tubular bone osteomyelitis within the period of 2013–2015. All the studied clinical strains of Gram-negative microorganisms had adhesive characteristics. *S. marcescens* strains (Index of Microorganism Adhesiveness = 3,45 ± 0,24 units) had the greatest adhesive potential. 64,3% of *Ac. Baumannii* strains, 57,5% of *P. aeruginosa* strains, 55,6% of *E. cloaceae* strains, 53,9% of *K. pneumonia* strains, 16,7% of *E. coli* strains showed moderate-adhesive characteristics. Among the studied clinical strains of Gram-negative microorganisms (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Ac. baumannii*, *S. marcescens*, *E. cloaceae*, *E. coli*), the best potential for biofilm formation was revealed in non-fermenting microorganisms of *P. aeruginosa* kind. *E. coli* strains having low-adhesive characteristics form biofilms poorly.

Keywords: adhesion, biofilms, chronic osteomyelitis

В связи с высоким процентом рецидивов инфекции, тяжелых осложнений, лечение хронического остеомиелита до сих пор остается одной из сложных проблем гнойной хирургии. Актуальным является изучение свойств возбудителей, обуславливающих инфекционный процесс при хроническом остеомиелите. Наиболее частыми возбудителями хронического остеомиелита являются грамположительные кокки рода *Staphylococcus* spp. с преобладанием штаммов *S. aureus* и грамотрицательные микроорганизмы: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, и др. [5]. Наличие у больных в очаге воспаления грамотрицательных микроорганизмов чаще всего свидетельствует о присоединении внутрибольничной фло-ры [1]. Патогенность грамотрицательных

микроорганизмов связывают с низкой проницаемостью их клеточной стенки, а также с наличием выраженной капсулы, синтезом фимбрилярных белков адгезии (фимбрии или пили I и III типа) [7]. Адгезивные свойства бактерий играют важную роль в развитии инфекционного процесса, обеспечивая колонизацию бактерий к различным клеткам и тканям микроорганизма. Благодаря образованию биопленок на живых и неживых поверхностях грамотрицательные бактерии колонизируют медицинские катетеры, трубы, протезы, а также долго сохраняются на аппаратуре и предметах больничного ухода [6].

Изучение персистентных свойств грамотрицательной микрофлоры у больных хроническим остеомиелитом, их адгезивных характеристик и антибиотикочувствитель-

ности к используемым в лечении инфекции препаратам, имеет большое практическое значение для предотвращения развития внутрибольничных инфекций.

Цель исследования

Изучить адгезивные характеристики и биопленкообразующую способность клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов, выделенных у больных хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей.

Материалы и методы исследования

Исследованы адгезивные характеристики 95 клинических штаммов бактерий, принадлежащих к 6 таксонам (*Pseudomonas aeruginosa* – 40, *Acinetobacter baumannii* – 14, *Klebsiella pneumoniae* – 13, *Escherichia coli* – 12, *Enterobacter cloaceae* – 9, *Serratia marcescens* – 7), выделенных из свищей в дооперационном периоде и из очага воспаления, во время операции у больных хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей в период с 2013 по 2015 гг.

Идентификацию исследуемых штаммов проводили на бактериологическом анализаторе WalkAway-40 Plus («Siemens», США)¹. Адгезивную активность штаммов изучали на модели эритроцитов человека A (II) Rh+ по методике В.И. Брилиса [2]. 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-лучочных полистироловых планшетах проводили по методу G.O'Toole и R. Kolter [9]. 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 соответ-

ствии 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.

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 значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Как показало исследование, все изученные клинические штаммы грамотрицательных микроорганизмов обладали адгезивными свойствами. Наибольшим адгезивным потенциалом обладали штаммы *S. marcescens* (ИАМ = $3,45 \pm 0,24$ ед.).

Среднеадгезивные свойства проявляли 64,3% штаммов *Ac. baumannii*, 57,5% штаммов *P. aeruginosa*, 55,6% штаммов *E. cloaceae*, 53,9% штаммов *K. pneumoniae*, 16,7% штаммов *E. coli* (таблица).

По данным фотометрического анализа, все клинические изоляты *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *Ac. baumannii* обладали выраженной способностью к образованию биопленок. Наиболее активно биопленку на поверхности 96-лучочного полистиролового планшета в течение 24 часов эксперимента формировали штаммы *P. aeruginosa*, о чем свидетельствуют средние значения OD_{630} (рис. 1). Штаммы *E. coli* обладали слабой биопленкообразующей способностью ($OD_{630} = 0,147 \pm 0,06$ ед. опт пл.). OD_{630} штаммов *Ac. baumannii*, *S. marcescens*, *E. cloaceae*, *K. pneumoniae* была в пределах средних значений.

Адгезивная способность грамотрицательных микроорганизмов, выделенных у больных хроническим посттравматическим остеомиелитом

	НШ, %	СШ, %	ВШ, %	ИАМ, ед.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 40)	22,5	57,5	20,0	$2,74 \pm 0,19$
<i>Acinetobacter baumannii</i> (n = 14)	7,1	64,3	28,6	$2,92 \pm 0,20$
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 13)	30,7	53,9	15,4	$2,91 \pm 0,18$
<i>Escherichia coli</i> (n = 12)	75	16,7	8,3	$2,31 \pm 0,15$
<i>Enterobacter cloaceae</i> (n = 9)	44,4	55,6	—	$2,42 \pm 0,18$
<i>Serratia marcescens</i> (n = 7)	—	66,7	33,3	$3,45 \pm 0,28$

П р и м е ч а н и е . Н е А Ш – неадгезивные штаммы; Н А Ш – низкоадгезивные штаммы; С Ш – среднеадгезивные штаммы; В А Ш – высокоадгезивные штаммы; И А М – индекс адгезивности микроорганизмов.

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

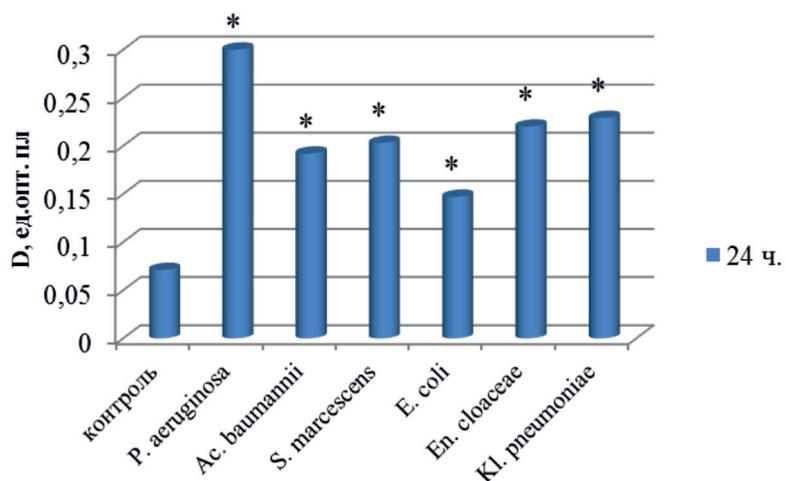


Рис. 1. Изменение средней оптической плотности красителя в лунках полистироловых планшетов, отражающей интенсивность формирования биопленки на их поверхности грамотрицательными микроорганизмами, полученными *in vitro*.
Примечание: * $P < 0,001$ – различия значимы по сравнению с контролем

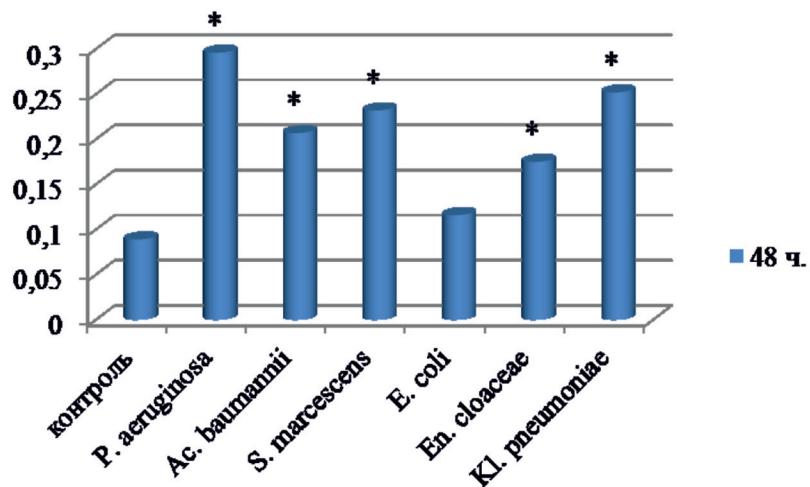


Рис. 2. Изменение средней оптической плотности красителя в лунках полистироловых планшетов, отражающей интенсивность формирования биопленки на их поверхности грамотрицательными микроорганизмами, полученными *in vitro*.
Примечание: * $P < 0,001$ – различия значимы по сравнению с контролем

Через 48 ч эксперимента активнее всего биопленку формировали штаммы *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, что подтверждается средними значениями OD_{630} . Уровень биопленкообразования штаммов *E. coli* достоверно не отличался от контрольных значений.

Как показало исследование, грамотрицательные микроорганизмы (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *Ac. baumannii*) сохраняют высокую активность формирования биопленки на поверхности 96-луночного планшета как на первые, так и на вторые

сутки эксперимента. Среди энтеробактерий наибольшим средством к биопленкообразованию обладают штаммы *S. marcescens*, *K. pneumoniae*.

Недооценка роли грамотрицательной микрофлоры у больных хроническим остеомиелитом может привести к утяжелению течения заболевания, развитию внутрибольничной инфекции. Наибольшее клиническое значение имеет выраженная устойчивость госпитальных штаммов *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* к большинству антибиотиков [4, 8]. Универсальным фак-

тором патогенности грамотрицательных условно-патогенных бактерий является белково-липополисахаридный комплекс клеточной стенки – эндотоксин. Мишенью для него служат клетки почти всех органов человека, что определяет многогранность и идентичность вызванных им поражений [7].

Заключение

Из исследуемых клинических штаммов грамотрицательных микроорганизмов (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Ac. baumannii*, *S. marcescens*, *E. cloaceae*, *E. coli*), наилучшая способность к биопленкообразованию выявлена у неферментирующих микроорганизмов рода *P. aeruginosa*. Штаммы *E. coli*, обладая низкоадгезивными свойствами, слабо формируют биопленки. Учитывая, что количественные параметры биопленочной активности микроорганизмов могут варьироваться, перспективным для клиники будет использование методов, оценивающих активность биопленкообразования микроорганизмами и ингибиции биопленок.

Список литературы

1. Алексеев Д.Г. Особенности микрофлоры очага воспаления у больных хроническим остеомиелитом / Д.Г. Алексеев, И.В. Ишутов, С.В. Ладонин // Материалы пятого конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке». – Томск, 2004. – С. 145–146.
2. Бриллис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П. и др. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. – 1986. – № 4. – С. 210–212.
3. Гайдышев И.П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++. – СПб.: ВХВ Петербург, 2004. – 505 с.
4. Кузнецова М.В. Формирование биопленок нозокомиальными штаммами *Pseudomonas aeruginosa* // Журн. микробиол. – 2011. – № 4. – С. 8–14.
5. Розова Л.В., Лапынин А.И., Клюшин А.М. и др. Микробный пейзаж при хроническом остеомиелите в условиях чрескостного остеосинтеза // Гений ортопедии. – 2002. – № 1. – С. 81–84.
6. Романова Ю.М., Диденко Л.В., Толордова Э.Р. и др. Биопленки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками // Вестник РАМН. – 2011. – № 10. – С. 31–39.
7. Руководство по медицинской микробиологии. Книга 3. Том первый. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика. / Под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой – М.: Издательство БИНом. 2013. – 752 с.
8. Aridesi J.N., Zahller E., Roe F., et al. Role of nutrient limitation and stationary phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin // Antimicrob. Agents Chemother. – 2003. – Vol. 47. – P. 1251–1256.
9. O'Toole G.F., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development // Mol. Microbiol. – 1998. – № 30. – P. 295–304.
10. Stepanovic S., Vuković 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.