

Сравнительная оценка адгезивной активности бактерий, выделенных у больных из остеомиелитического очага и из ран открытых переломов

З. С. Науменко, И. В. Шипицына

Comparative evaluation of adhesive activity of the bacteria, isolated in patients from their osteomyelitic focus, as well as from open fracture wounds

Z. S. Naumenko, I. V. Shipitsyna

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, г. Курган (директор — д. м. н. А. В. Губин)

Исследованы адгезивные свойства 340 клинически значимых штаммов бактерий, выделенных у больных в отделениях открытой травмы и гнойной ортопедии. Все исследованные штаммы микроорганизмов обладали адгезивными свойствами. Распределение по степени адгезивности неодинаково для рассматриваемых групп. Показано, что способность к адгезии у штаммов, выделенных от больных хроническим остеомиелитом, достоверно выше по сравнению со штаммами, выделенными из ран открытых переломов. Наибольшая адгезивная активность характерна для штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и *Streptococcus spp.*

Ключевые слова: адгезивные свойства бактерий; персистенция; хронический остеомиелит; раны.

Adhesive properties of 340 clinically significant strains of the bacteria, isolated in patients of the departments of open trauma and purulent orthopedics have been studied. All the studied strains of microorganisms had adhesive properties. The distribution by adhesiveness degree is different in the groups examined. The ability to adhesion in the strains isolated from patients with chronic osteomyelitis is reliably higher in comparison with the strains isolated from open fracture wounds. The highest adhesive activity is characteristic of *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus spp.* strains.

Keywords: adhesive properties of bacteria; persistence; chronic osteomyelitis; wounds.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время известно, что от 65 до 93% инфекционных заболеваний ассоциированы со способностью их возбудителей формировать биопленку [2, 10]. Инфекционные заболевания, этиологическими агентами которых являются биопленки, могут быть вызваны как представителями одного вида, так и несколькими видами бактерий. Установлено, что одновидовые биопленки чаще развиваются на медицинских имплантатах [9]. Имеются данные об этиологической значимости биопленок в развитии остеомиелита.

Первым и наиболее важным этапом в формировании биопленок считают способность бактерий к адгезии. Изучение факторов, влияющих на процесс адгезии *in vivo* и *in vitro*, позволяет разработать профилактические меры, направленные на подавление ранних этапов инфекционного процесса. В основе специфического прикрепления бактерий к клеткам лежит сродство соответствующих фим-

бриальных адгезинов к структурам, выполняющим функцию рецепторов [11]. Адгезия как многофакторный процесс зависит от большого числа условий как со стороны бактерий, так и макроорганизма [8]. Установление взаимодействия между патогеном и клеткой-мишенью в результате бактериальной адгезии является определяющим звеном в ходе инфекционного процесса. Прикрепление и последующее размножение микроорганизмов с образованием микроколоний или пленки обеспечивает им более выгодные условия существования, связанные, в частности, с противодействием механическому удалению бактерий из макроорганизма и устойчивостью к действию бактерицидных агентов внешней среды.

Цель работы — оценка адгезивных свойств клинически значимых штаммов бактерий, выделенных у больных в отделениях открытой травмы и гнойной ортопедии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования послужили 340 клинических штаммов бактерий, принадлежащих к 4 таксонам (*Staphylococcus aureus* 154 штамма,

Staphylococcus epidermidis — 62, *Enterococcus spp.* — 46, *Pseudomonas aeruginosa* — 78), выделенных из ран больных с открытыми переломами (1-я группа) и

хроническим остеомиелитом (2-я группа) в 2009 году. Выделение и идентификацию исследуемых штаммов проводили общепринятыми классическими методами, а также использовали микротест системы «BioMerieux» (Франция): «ID 32 STAPH», «ID 32 GN», «ID 32 STREP». Адгезивную способность микроорганизмов изучали согласно методике В. И. Брилиса [3]. Смесь формализированных эритроцитов человека O(I) группы крови Rh⁺ и суспензии микроорганизма (1×10^9 кл/мл) инкубировали при 37 °С в течение 30 минут, регулярно встряхивая смесь. После этого готовили препарат, высушивали, фиксировали и окрашивали по методу Романовского–Гимза. Изучение адгезии проводили под световым микроскопом, подсчет вели, учитывая в общей сложности не менее 50 эритроцитов. При оценке адгезивных свойств использовали показатели: средний показатель адгезии (СПА) — среднее количество микроорганизмов, прикрепившихся к одному эритро-

циту; коэффициент адгезии (К) — процент эритроцитов, имеющих на своей поверхности адгезированные микроорганизмы; индекс адгезивности микроорганизмов (ИАМ) — среднее количество микробных клеток на эритроците (учитывали только участвующие в адгезивном процессе эритроциты). Микроорганизмы считали неадгезивными в случае определения ИАМ в диапазоне от 1,76 до 2,5, среднеадгезивными — от 2,51 до 4,0, высокоадгезивными — при ИАМ $\geq 4,1$. Для соблюдения стандартных условий в постановке опыта использовали эритроциты только одного донора O(I). Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы «Atte Stat» [1]. Достоверность различий между группами проверяли с помощью непараметрического критерия U (критерий Вилкоксона–Манна–Уитни). Различия между группами наблюдений считались статистически значимыми при $P_u < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что видовая принадлежность в значительной степени характеризует адгезивные свойства бактерий [5, 7]. Возбудители, наиболее часто выделяющиеся из остеомиелитического очага и из ран открытых переломов, — это различные виды стафилококков, стрептококки и *Pseudomonas aeruginosa* [4, 6].

При анализе взаимодействия исследуемых штаммов микроорганизмов с эритроцитами на поверхности последних выявляли как отдельные бактериальные клетки, так и группы клеток, объединенных между собой. Такая картина наблюдалась у среднеадгезивных штаммов (*P. aeruginosa*, *Streptococcus spp.*) (рис. 1, а, б). Если культуры микроорганизмов обладали низкой адгезией (*S. aureus* и *S. epidermidis*), то на поверхности эритроцитов бактерии либо не обнаруживались, либо встречались на единичных клетках (рис. 1, в, г).

СПА штаммов *S. aureus*, *S. epidermidis* и *Streptococcus spp.*, выделенных у больных с открытыми переломами, был меньше 2 ед., что свидетельствовало о низкой способности к адгезии перечисленных микробов. Доля эритроцитов, задействованных в адгезивном процессе, составила соответственно 41, 66 и 66% от общего количества клеток, учитываемых в реакции.

У больных хроническим остеомиелитом СПА штаммов *S. aureus*, *S. epidermidis* также был меньше двух единиц, а для штаммов *Streptococcus spp.* этот показатель составил $2,32 \pm 0,20$ ед., что свидетельство-

вало о средней адгезивной активности стрептококков. Число эритроцитов, задействованных в адгезивном процессе, составило 46%, 74% для стафилококков и 74% — для стрептококков.

Грамотрицательные бактерии характеризовались более высокими значениями СПА. Так, СПА штаммов *P. aeruginosa*, выделенных у больных острым гнойным процессом и хроническим остеомиелитом, варьировал от $2,42 \pm 0,30$ до $3,14 \pm 0,28$ ед. Число эритроцитов, задействованных в адгезивном процессе, для штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из отделений гнойной ортопедии и открытой травмы, составило 77 и 73% соответственно.

В целом у штаммов, выделенных у больных из отделения гнойной ортопедии, СПА был достоверно выше, чем у штаммов, выделенных из ран пациентов с открытыми переломами. Это относилось ко всем видам исследованных микроорганизмов (рис. 2).

Число задействованных эритроцитов в процессе адгезии в случае штаммов *S. epidermidis* и *Streptococcus spp.*, выделенных у пациентов с хроническим остеомиелитом, было на 12% выше по сравнению со штаммами этих же видов бактерий, выделенных у больных с открытыми переломами (рис. 3).

В группе грамположительных микроорганизмов, выделенных у больных хроническим остеомиелитом, колебания ИАМ находились в пределах от $2,32 \pm 0,19$ у *S. epidermidis* до $3,01 \pm 0,36$ у *Streptococcus spp.*

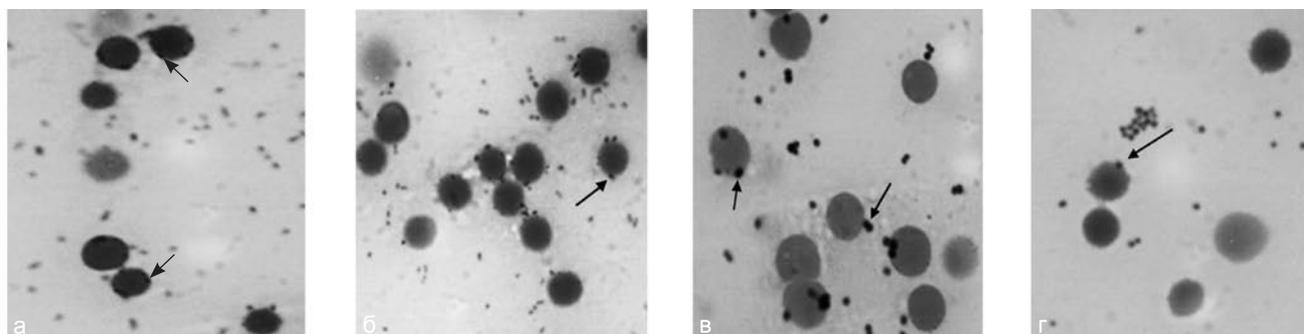


Рис. 1. Адгезия микроорганизмов на эритроцитах: а — *P. aeruginosa*; б — *Streptococcus spp.*; в — *S. epidermidis*; г — *S. aureus*; стрелками указаны адгезированные на поверхности эритроцитов бактерии

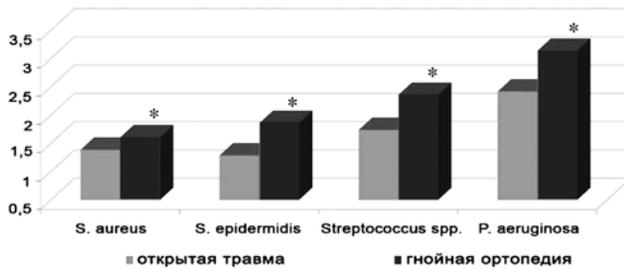


Рис. 2. Среднее количество бактерий, прикрепившихся к эритроциту (СПА): * — уровень значимости различий по сравнению с данными СПА штаммов микроорганизмов, выделенных у больных с острой гнойной инфекцией, по U-критерию Вилкоксона–Манна–Уитни, при $P_u < 0,05$

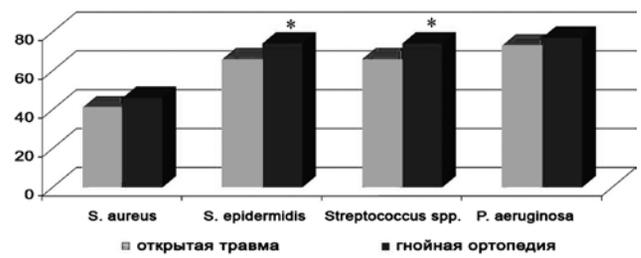


Рис. 3. Количество эритроцитов, участвующих в адгезивном процессе: * — уровень значимости различий по сравнению с показателем К штаммов микроорганизмов, выделенных у больных с острой гнойной инфекцией, по U-критерию Вилкоксона–Манна–Уитни, при $P_u < 0,05$

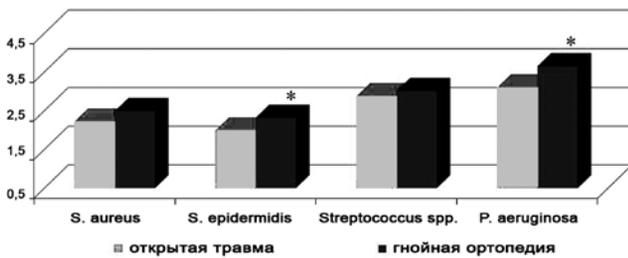


Рис. 4. Индекс адгезивности микроорганизмов (ИАМ): * — уровень значимости различий по сравнению с данными ИАМ штаммов микроорганизмов, выделенных у больных с острой гнойной инфекцией, по U-критерию Вилкоксона–Манна–Уитни, при $P_u < 0,05$

Штаммы *S. aureus* и *S. epidermidis* обладали низкоадгезивной, а *Streptococcus spp.* — среднеадгезивной способностью. Следует отметить, что штаммы, выделенные из инфицированных ран при открытых переломах, характеризовались более низкими значениями ИАМ по сравнению со штаммами, выделенными из остеомиелитического очага; достоверные отличия отмечены для *S. epidermidis* и *P. aeruginosa*.

ИАМ грамположительных бактерий изменялся от $1,99 \pm 0,18$ у *S. epidermidis* до $2,87 \pm 0,63$ у *Streptococcus spp.* (рис. 4), тогда как у *P. aeruginosa* этот показатель

был значительно выше и варьировал от $3,1 \pm 0,36$ (открытая травма) до $3,65 \pm 0,27$ (гнойная ортопедия).

Среди грамотрицательных условно-патогенных бактерий штаммы *P. aeruginosa*, выделенные как у больных с острой гнойной инфекцией, так и из остеомиелитического очага, обладали среднеадгезивной способностью.

На основании полученных данных можно говорить, что все исследованные штаммы микроорганизмов обладали адгезивными свойствами. Распределение по степени адгезивности неодинаково для рассматриваемых групп. Способность к адгезии у штаммов *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus spp.* и *P. aeruginosa*, выделенных у больных хроническим остеомиелитом, была достоверно выше по сравнению со штаммами, выделенными у пациентов с открытыми переломами.

Штаммы *P. aeruginosa*, выделенные как у больных хроническим остеомиелитом, так и из ран открытых переломов, обладали наибольшей адгезивной способностью по сравнению с изученными грамположительными бактериями, что можно объяснить особенностями строения поверхностных структур клеток грамотрицательных микроорганизмов и их способностью контактировать с различными поверхностями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, способность к адгезии у возбудителей, обуславливающих остеомиелитический процесс, выше по сравнению с микроорганизмами, обнаруживаемыми в ранах больных с открытыми переломами. Поскольку по способности к адгезии можно судить о скорости формирования биопленок, то логично предположить, что штаммы, выделенные из остеомиелитического очага, активно формируют биопленки, что ведет к хронизации инфекционного процесса. Лечение инфекций, обусловленных биопленками, должно быть

направлено на разрушение и удаление сформировавшихся биопленок и подавление первого (наиболее важного) этапа развития биопленок — адгезии. Более углубленное изучение роли адгезии в распространении внутрибольничной инфекции, вызванной клинически значимыми видами бактерий, и разработка оптимальных препаратов, максимально подавляющих механизмы адгезии, позволит повысить эффективность лечения инфекционных осложнений, вызванных условнопатогенными микроорганизмами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гайдышев И. П. Решение научных и инженерных задач средствами Excel, VBA и C/C++. СПб.: ВХВ Петербург, 2004. 512 с.
2. Ильина Т. С., Романова Ю. М., Гинцбург А. Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития // Генетика. 2004. № 40 (11). С. 1–12.
3. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов / Брилис В. И. [и др.] // Лаб. дело. 1986. № 4. С. 210–212.
4. Науменко З. С., Гостев В. В., Богданова Н. А. Сравнительная оценка динамики антибиотикорезистентности бактерий, выделенных у больных с острым и хроническим гнойным процессом в ортопедотравматологическом стационаре // Гений ортопедии. 2010. № 3. С. 141–145.
5. Порт Е. В. Изучение адгезивных свойств штаммов синегнойной палочки // Вестн. Харьк. нац. ун-та. 2004. № 639. С. 11–15.

6. Характеристика микрофлоры у больных хроническим остеомиелитом, леченных методом чрескостного остеосинтеза / Л. В. Розова [и др.] // Современные методы лечения больных с травмами и их осложнениями: материалы Всерос. науч.-практ. конф. Курган, 2006. С. 342–344.
 7. Agr function in clinical *Staphylococcus aureus* isolates / K. E. Traber [et. al.] // *Microbiology*. 2008. Vol. 154, No Pt 8. P. 2265–2274.
 8. Bacterial persistence as a phenotypic switch / N. Q. Balaban [et. al.] // *Science*. 2004. Vol. 305, No 5690. P. 1622–1625.
 9. Biofilms as complex differentiated communities / P. Stoodley [et. al.] // *Annu. Rev. Microbiol.* 2002, Vol. 56. P. 187–209.
 10. Popat R., Cruz S. A., Diggle S. P. The social behaviours of bacterial pathogens // *Br. Med. Bull.* 2008. Vol. 87. P. 63–75.
 11. Soto G. E., Hultgren S. J. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly // *J. Bacteriol.* 1999. Vol. 181, No 4. P. 1059–1071.
-

Рукопись поступила 13.12.10.

Сведения об авторах:

1. Науменко Зинаида Степановна — ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития РФ, заведующая научно-клинической лабораторией микробиологии и иммунологии, к. б. н.;
2. Шипицына Ирина Владимировна — ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова» Минздравсоцразвития России, м. н. с. научно-клинической лаборатории микробиологии и иммунологии.