

I происходило к 1,49–1,55 минуте ($p < 0,05$) [4]. Показатели диагностической надежности предложенного способа составили: диагностическая чувствительность и специфичность — $89 \pm 3,8 \%$, $91 \pm 5,5 \%$, соответственно, предсказательная ценность положительного и отрицательного результатов — $91 \pm 6,1 \%$, $89 \pm 4,6 \%$, соответственно. Результат ЛЗХЛ анализа был подтвержден результатом бактериологического исследования мазка из раны.

Таким образом, динамика показателей ЛЗХЛ раневого отделяемого является объективным интегральным показателем активности антиоксидантной системы раны. Метод является клинически информативным для выявления ранних стадий нарушения защитно-приспособительных реакций организма, в частности диагностики инфекционного процесса в острой ране, а также определение тактики местного лечения. Динамическое исследование показателей ЛЗХЛ позволяет использовать данный метод для мониторинга лечения.

Выводы

Для повышения информативности лабораторной диагностики инфекционного процесса в ране мы рекомендуем дополнять классическое микробиологическое исследование следующими разработанными нами методиками:

1. Проведение оценки способности выделенных штаммов бактерий формировать биопленку может быть использовано для обоснования тактики лечения, мониторинга его эффективности и прогнозирования развития осложнений.

2. Регистрация ЛЗХЛ раневого отделяемого позволяет быстро определить наличие бактерий в острой ране до развития клинических признаков инфекционного процесса. Это дает возможность для определения тактики местного лечения в наиболее ранние сроки от момента получения травмы с последующей коррекцией терапии после получения результата бактериологического исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гайдуль, К. В.* Раневая инфекция. Этиология, диагностика и антимикробная терапия: информационное пособие для практических врачей / К. В. Гайдуль, А. А. Муконин. — ООО «АБОЛмед, 2005. — 31 с.
2. *Schultz, G. S.* Wound bed preparation: a systematic approach to wound management / G. S. Schultz // *Wound Rep Reg.* — 2003. — № 11. — P. 1–28.
3. The biofilm-forming capacity of staphylococcus aureus from chronic wounds can be useful for determining Wound-Bed-Preparation methods / Y. Yarets [et al.] // *EWMA Journal.* — 2013. — № 1, Vol. 13. — P. 7–13.
4. *Yarets, Y.* Sterile and bacterial burdened acute wound: parameters of liminol-dependent chemiluminescence of wound fluid / Y. Yarets, T. Petrenko // *EWMA Journal Supplement.* — 2013. — № 1, Vol. 13. — P. 78.

УДК 616-001.4-036.12:578.81

ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫМИ И ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ РАНЕВОМ ПРОЦЕССЕ

Ярец Ю. И., Шевченко Н. И., Зубкова Ж. В.

Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»

Государственное учреждение

**«Республиканский научно-практический центр
радиационной медицины и экологии человека»**

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

В настоящее время доказано, что микробные биопленки ответственны за патогенез

многих хронических заболеваний. В современной зарубежной литературе выделяется понятие инфекций, ассоциированных с биопленкой (biofilm-associated infections), особенностями которых является резистентность к антибактериальной терапии и неэффективный иммунный ответ со стороны макроорганизма, что обусловлено защитными свойствами матрикса биопленки. Формирование микробами биопленки является ключевым фактором формирования длительно-незаживающих (хронических) ран. Наличие в ране нежизнеспособных тканей, фибрина служит хорошей питательной средой для размножения бактерий, что поддерживает уровень колонизации раны и способствуют образованию биопленки [1]. В развитии инфекционного процесса в хронической ране (ХР) участвуют различные микроорганизмы. Длительность существования ХР обуславливает выделение из ран микробных ассоциаций, каждый из участников которых вовлекается в формирование биопленки. Экспериментальными данными доказано наличие временных особенностей образования биопленки, общих для всех клинически значимых условно-патогенных бактерий. Однако особенности строения и функционирования клеток различных бактерий предполагает существование индивидуальных характеристик при формировании биопленки, в частности при ХР, когда в инфекционный процесс вовлекаются сразу несколько штаммов.

В связи с этим, **целью** нашего исследования было изучить особенности формирования биопленки грамположительными и грамотрицательными штаммами бактерий.

Методы

Объектом исследования были выделенные из ХР пациентов штаммы бактерий. Давность существования ХР составила более 2-х месяцев. Выделение бактерий осуществляли путем секторального посева раневого отделяемого на плотные питательные среды. Особенности формирования биопленки у грамположительных штаммов бактерий изучалась на примере *S. aureus*, у грамотрицательных — на примере *P. mirabilis*. Исследованию подвергали штаммы *S. aureus* (n = 20) и *P. mirabilis* (n = 15), выделенные из ХР пациентов в виде ассоциаций при первичном бактериологическом обследовании. При проведении исследования использована методика определения образования биопленки в собственной разработке (заявка на изобретение № а 20130260 от 01.03.2013) [2]. Для анализа использовали суточную культуру бактерий в планктонной фазе, суспензированную в 5 мл жидкого 2 % триптиказо-соевого бульона ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл или 0,5 по McFarland). Бактерии выращивались в лунках иммунологических планшетов, для детекции накопления биомассы биопленки и основного вещества (экзополисахарида) использовали окраску генцианвиолетом и Congo Red соответственно. Оценку формирования биопленки проводили в динамике, результаты снимали через 2, 4, 6, 18, 24, 48 часов инкубации в оптимальных для роста бактерий температурных условиях. Регистрацию результатов производили на микропланшетном спектрофотометре после экстракции красителей этанолом. Результат выражали в единицах оптической плотности.

Результаты исследований обработаны с применением программы «Statistica» 6.0. Характеристики распределения результатов выражали в виде М (25; 75) %, где М — медиана, 25 % — нижний квартиль, 75 % — верхний квартиль. Статистический анализ проводился с помощью непараметрических методов статистической обработки — W-критерия Вилкоксона, U-критерий Манн-Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Динамика формирования биопленки *in vitro* штаммами *S. aureus* представлена на рисунке 1.

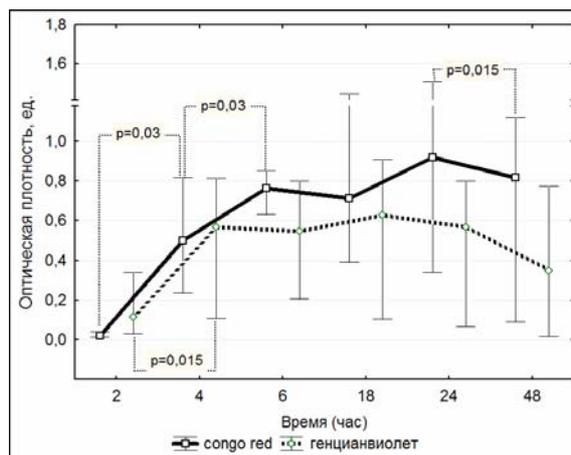


Рисунок 1 — Формирование биопленки штаммами *S. aureus*

За время инкубации *S. aureus* от 2 до 4-х часов происходило увеличение оптической плотности элюата генцианвиолета более чем в 3 раза (с 0,171 (0,057; 0,308) через 2 часа, до 0,568 (0,281; 0,611) к 4-м часам, $p = 0,015$). Это свидетельствует об активном размножении *S. aureus* в этот период и увеличении числа микробных клеток. В свою очередь, все остальное время инкубации — от 4-х до 48 часов клеточная биомасса *S. aureus* оставалась стабильной, о чем может говорить отсутствие изменений величин экстинкции генцианвиолета в этот промежуток времени (рисунок 1). В период от 2-х до 6-и часов инкубации происходило увеличение величины оптической плотности элюата Congo Red более чем в 20 раз. Так, через 2 часа инкубации этот показатель составил 0,021 (0,018; 0,030) ед., а через 4 и 6 часов — 0,501 (0,109; 0,673) ед. ($p = 0,02$) и 0,763 (0,173; 0,852) ед. ($p = 0,03$), соответственно (рисунок 1). Изменение значений экстинкции раствора Congo Red указывает на динамику синтеза основного компонента экстрацеллюлярного матрикса микробной биопленки — экзополисахарида, который, как известно, окрашивается данным красителем [3]. Период от 6 до 24 часов инкубации характеризовался отсутствием изменений величины абсорбции экстракта Congo Red. Далее происходило уменьшение накопления экзополисахарида — значения оптической плотности раствора Congo Red в период от 24 часов до 48 часов снижались — с 1,060 (0,364; 1,568) ед. до 0,817 (0,185; 0,958) ед. ($p = 0,015$) (рисунок 1).

Образование биопленки штаммами *P. mirabilis* имело свои особенности (рисунок 2).

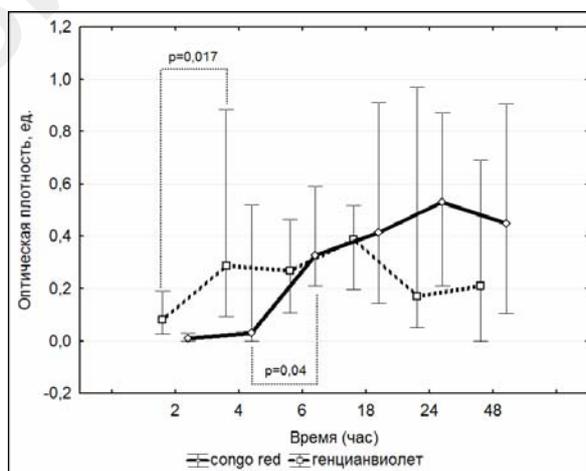


Рисунок 2 — Формирование биопленки штаммами *P. mirabilis*

Как видно из рисунка 1, активное накопление биомассы биопленки зарегистрировано в сроки от 2-х до 4-х часов инкубации — значения оптической плотности экстрактов генцианвиолета в эти сроки увеличивались более чем в 3 раза: от 0,08 (0,042; 0,175) до 0,263 (0,197; 0,521) ($p = 0,017$) соответственно. В остальные сроки исследования количество биомассы значимо не изменялось. Образование основного вещества биопленки у *P. mirabilis* начиналось позднее, чем у *S. aureus*: после 4-х часов инкубации *in vitro*. Так, в период от 4 до 6 часов величина инкубации величина абсорбции экстракта Congo Red увеличилась в 10 раз: от 0,03 (0,01; 0,24) до 0,327 (0,227; 0,442) ($p = 0,04$) (рисунок 2). Сравнительный анализ показал более низкие значения оптической плотности элюата Congo Red, измеренной для *P. mirabilis* через 4 и 6 часов инкубации, чем у *S. aureus* в аналогичные сроки. Это позволяет говорить, что интенсивность накопления матрикса биопленки у *P. mirabilis* была меньше, чем у *S. aureus* ($p < 0,05$).

Как известно, стафилококк является комменсалом и обитателем кожных покровов, с чем связана его преобладающая роль в этиологии раневой инфекции. Наличие множества факторов вирулентности также обуславливает его значительную роль в патогенезе инфекций ран. *S. aureus* имеет различные факторы адгезии, которые обеспечивают ему прикрепление к различным белкам, в частности, фибриногену и коллагену. Наличие эластин- и фибронектин-связывающих белков позволяет стафилококку легко колонизировать поврежденные ткани раны, а также глубоко проникать и распространяться за счет повреждающего действия мембранных токсинов. Внутриклеточные адгезивные белки обеспечивают прикрепление бактерий друг другу, что облегчает быстрое формирование биопленки. *S. aureus* образует также ряд факторов защиты, обладающих антифагоцитарной активностью, вызывающих прямое повреждение нейтрофилов, а также вырабатывает факторы, обеспечивающие его персистенцию [3]. Наличие множества факторов вирулентности позволяют стафилококку беспрепятственно формировать биопленку в наиболее ранние сроки от момента адгезии к поврежденным тканям, а также обуславливают его преимущества в инициации инфекционного процесса [4]. Это также подтверждается нашими исследованиями *in vitro* — *S. aureus* начинал быстро накапливать биомассу уже через 2 часа после инкубации, и в эти же сроки происходило накопление основного вещества. Об этом свидетельствовала динамика величин абсорбции экстрактов генцианвиолета и Congo Red, которые окрашивают микробные клетки и экзополисахарид биопленки, соответственно (рисунок 1).

Предварительные наши исследования показали преобладание бактерий рода *Proteus* (до 40 %) среди других представителей семейства *Enterobacteriaceae* при проведении бактериологического исследования длительно незаживающих ран [5]. Процесс адгезии *Proteus* значительно облегчается за счет присутствия на поверхности фимбрий, жгутиков, поверхностных протеинов. Эти факторы также обуславливают у *Proteus* подвижность и способность к роящемуся росту, что является необходимым условием для обеспечения возможности распространения в поврежденных тканях раны. Этим, возможно, объясняется быстрое накопление биомассы *Proteus* на начальных этапах формирования биопленки, что также подтверждается нашими исследованиями *in vitro* (рисунок 2). Факт формирования роящихся колоний является основной особенностью биопленки *Proteus*, определяющий уровень вирулентности штамма и экспрессию гемолизинов, протеаз, разрушающих IgA и IgG, а также других факторов, обеспечивающих защиту *Proteus* от иммунных механизмов. В связи с этим накопление экзополисахаридного матрикса, как показывают наши результаты *in vitro*, начинается позднее, чем более важный процесс увеличения микробной массы (рисунок 2).

Выводы

1. В процессе формирования биопленки штаммы грамположительных бактерий на примере *S. aureus* характеризуются накоплением биомассы и образованием основного вещества на начальных сроках исследования *in vitro* — через 2–6 часов инкубации.

2. Штаммы грамотрицательных бактерий рода *Proteus* активно накапливают биомассу биопленки в период от 2 до 4 часов инкубации *in vitro*, однако процесс образования экзополисахарида начинается позднее — через 4 часа и менее выражен, чем у *S. aureus*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Biofilms in chronic wounds / G.A. James [et al] // Wound Rep Regen. — 2008. — Vol. 16. — P. 37–44.
2. The biofilm-forming capacity of staphylococcus aureus from chronic wounds can be useful for determining Wound-Bed-Preparation methods / Y. Yarets [et al] // EWMA Journal. — 2013. — № 1, Vol. 13. — P. 7–13.
3. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods / T. Mathur [et al] // Indian Journal of Medical Microbiology. — 2006. — № 1, Vol. 24. — P. 25–29.
4. *Маянский, А. Н.* Патогенетическая микробиология: руководство / А. Н. Маянский. — Н. Новгород: Издательство Нижегородской государственной медицинской академии, 2006. — 520 с.
5. *Shauchenka, N.* Bacterial isolates from acute and chronic wounds and there antibioticograms / N. Shauchenka, Y. Yarets // Lietuvos bendrosios praktikos gydytoju priedas. — 2012. — № 7, T. 16. — P. 44–45.

СОДЕРЖАНИЕ

Прохорова В. И., Лаппо С. В., Державец Л. А., Готько О. В., Шишло Л. М., Цырусь Т. П., Шелкович С. Е., Анищенко А. Е. Оценка распространенности опухолевого процесса по лабораторным показателям у пациенток, страдающих раком яичников	3
Прохорова В. И., Шишло Л. М., Косенко И. А., Матылевич О. П., Лаппо С. В., Цырусь Т. П., Шуляк Е. А. Оценка показателей системы гемостаза у пациенток с местно-распространенным раком шейки матки при комплексном противоопухолевом лечении с применением антикоагулянтов	5
Пыж А. Э. Закономерности проявления гемолитической активности штаммов <i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	9
Пятницкая И. В., Лисковский О. В. Проблема насилия над детьми в семьях (последствия и профилактика)	11
Радьков И. В., Ковалевская В. И. Сравнительный анализ структуры и прогноз урологического здоровья взрослого населения г. Гомеля	13
Рафальская Н. В. Должен ли врач сообщать больному о диагнозе	16
Романова Е. И.	