

© Кондратюк В.М., Ковальчук В.П., Безулий М.М., Фомін О.О.

УДК: 617.57/.58-001.4:579.262

Кондратюк В.М., Ковальчук В.П., Безулий М.М., Фомін О.О.

Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова (вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 210118, Україна),
Військово-медичний клінічний центр Центрального Регіону Вінниця (вул. Свердлова, 185, м. Вінниця, 21018, Україна)

ХАРАКТЕРИСТИКА ЗДАТНОСТІ ДО УТВОРЕННЯ БІОПЛІВОК МІКРОФЛОРИ ВОГНЕПАЛЬНИХ ТА МІННО-ВИБУХОВИХ РАН КІНЦІВОК

Резюме. Бойові рани характеризуються тривалим до загоєння перебігом, який ускладнюється гнійно-запальними процесами. Встановлено, що хронічні інфекційні ускладнення спричиняють бактерії, здатні утворювати біоплівки. Метою дослідження було оцінити здатності до утворення біоплівок мікрофлорою, що виділяється з бойових ран. Серед сімдесяти семи ізолятів 57 (74%) виявили здатність до біоплівкоутворення. Усі виділені штами псевдомонад, тридцять штамів акінетобактерій (73%), 5 штамів (66%) *Enterococcus spp* утворювали біоплівки. Ентеробактерії та стафілококи виявились найслабшими біоплівкоутворювачами.

Ключові слова: бойові рани, мікрофлора, бактеріальна біоплівка.

Вступ

Протягом останніх двох років, українські військові лікарі стикнулись з новим викликом у вигляді бойових поранень. Зазвичай, це масивні пошкодження кісток та м'яких тканин, характеризуються тривалим періодом часу до загоєння рани, супроводжуються приєднанням інфекційних ускладнень. Із досвіду попередніх війн встановлено факт зміни мікрофлори у процесі лікування таких поранень [6, 7]. Нажаль, найчастіше внаслідок впливу умов навколишнього середовища, методів лікування, нераціональної протимікробної терапії на різних етапах евакуації пораненого, рани заселяються нозокоміальною мікрофлорою. Подолання полірезистентності цих мікроорганізмів до протимікробних засобів є складним зав-

данням для практичної медицини та мікробіології.

Полірезистентні мікроорганізми, до яких відносяться *Acinetobacter baumannii*, метицилін-резистентні *Staphylococcus aureus*, ентеробактерії, які продукують беталактамази розширеного спектру дії, часто є причиною інфекційних ускладнень, що обважують перебіг основного захворювання, підвищують рівень летальності та вартість лікування [4, 5]. Численні дослідження доводять, що в більшості, ці інфекційні ускладнення спричиняють бактерії, що здатні прикріплюватись до поверхонь та утворювати полімікробні товариства, відомі як біоплівки [3]. Існування у вигляді біоплівок супроводжується значними змінами експресії генів та

синтезу додаткових протеїнів, що проявляється резистентністю до протимікробних речовин та факторів імунного захисту [10]. Утворення біоплівки розглядається як фактор, що спричиняє та підтримує хронічні інфекційні процеси [1, 2].

Мета дослідження - оцінити здатність до біоплівкоутворення мікроорганізмів, що виділялись з бойових поранень кінцівок, отриманих військовослужбовцями під час проведення АТО у 2014 році.

Матеріали та методи

Протягом 2014 року від осіб чоловічої статі, які були поранені на сході України та проходили лікування у Військово-медичному клінічному центрі Центрального Регіону було виділено 100 штамів мікроорганізмів. Бактерії отримано від 39 поранених з 49 ран, серед яких було 8 поранень виключно м'яких тканин та 41 вогнепальний перелом. Жоден із пацієнтів не мав черепно-мозкової травми або інших захворювань що викликають імуносупресію. На етапах евакуації до ВМКЦ ЦР усім пораненим рани обробляли хірургічно та вводили антибіотики. Для дослідження було відібрано 77 штамів мікроорганізмів, виділених з бойових ран і відомих здатністю викликати нозокоміальні запальні ускладнення. Серед них 41 штам *Acinetobacter* spp., 13 штамів *Pseudomonas* spp., 8 представників родини *Enterobacteriaceae*, 9 штамів *Enterococcus* spp. та 6 штамів стафілококів, з числа яких 2 віднесено до виду *S. aureus*.

Здатність до утворення біоплівки визначали методом утворення біоплівки у 96-луночковому планшеті з подальшим фарбуванням кристаллфіолетом та визначенням оптичної щільності (OD) на апараті Humanreader (Німеччина) при довжині хвилі 620 нм. OD для кожного штаму визначати у трьох повторах, результати усереднювали. Штам вважався позитивним щодо біоплівкоутворення, якщо його середнє значення OD було більшим середньої оптичної щільності негативного контролю збільшеної на 3 стандартних відхилення (SD) (OD негативного контролю + (3*SD негативного контролю)). OD негативного контролю розраховували для кожного планшета окремо. Інтенсивність біоплівкоутворення оцінювали за величиною відносного показника оптичної щільності.

Статистична обробка отриманих результатів проведена з використанням таблиць Excel Microsoft Office. Для непараметричних величин порівняння проводили за показником χ^2 , значення $p < 0,005$ вважали статистично значимим.

Результати. Обговорення

Дослідженнями з використанням методів електронної мікроскопії доведена ефективність та достовірність статичної моделі визначення здатності бактерій до біоплівкоутворення [8]. У більшості опублікованих результатів подібних досліджень увагу зосереджували на мікроорганізмах, що колонізують хронічні рани, наприклад при цукровому діабеті [9]. В цій роботі здатність

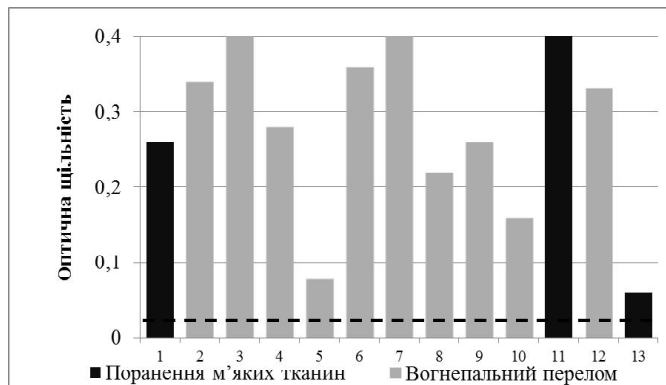


Рис. 1. Інтенсивність біоплівкоутворення штамми *Pseudomonas* spp.

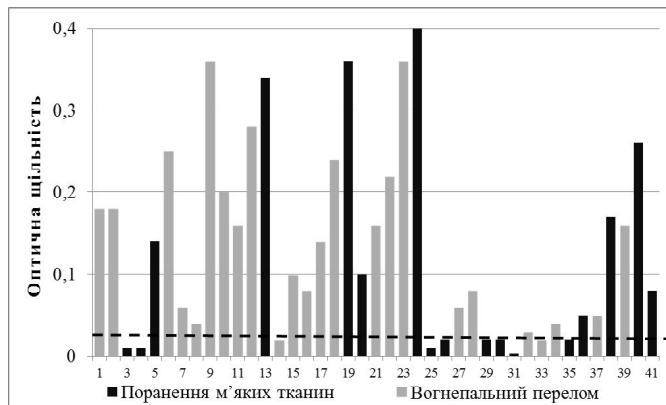


Рис. 2. Інтенсивність біоплівкоутворення штамми *Acinetobacter* spp.

утворювати біоплівки визначалась у бактерій, що колонізують та інфікують бойові пошкодження кісток та м'яких тканин. Певно, що ці рани не є хронічними, але зважаючи на їх велику площу та ступінь руйнування тканин, загоєння може тривати декілька тижнів. На фоні агресивного хірургічного лікування та протимікробної терапії, властивість бактерій утворювати біоплівки може пояснити їх здатність існувати та розмножуватись у ранах впритул до моменту закриття ран.

У відповідності до обраних критеріїв з числа сорока семи досліджених ізолятів 57 (74%) були визнані позитивними за ознакою біоплівкоутворення. Пунктирна лінія на діаграмах (рис. 1) визначає найменше значення OD, вище якого штам вважався позитивним, щодо біоплівкоутворення.

Утворення біоплівки окремими ізолятами є гетерогенною ознакою між видами та окремими штамми всередині одного виду. Усі досліджені штамми псевдомонад утворювали біоплівки. Середній показник інтенсивності утвореної біоплівки становив $0,29 \pm 0,14$. Із 41 дослідженого штаму акінетобактерій утворювали біоплівки 30 (73%). Середній показник інтенсивності біоплівкоутворення був меншим, ніж для псевдомонад, і становив $0,19 \pm 0,16$ (рис. 2).

Серед грамнегативних паличок найменш здатними до утворення щільних біоплівки виявились ентеробактерії (62,5% досліджених штамів) (рис. 3). Середній показник інтенсивності біоплівкоутворення для них не пе-

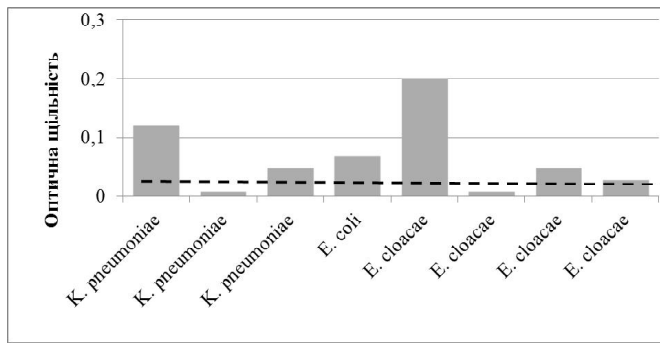


Рис. 3. Інтенсивність плівкоутворення представниками родини Enterobacteriaceae.

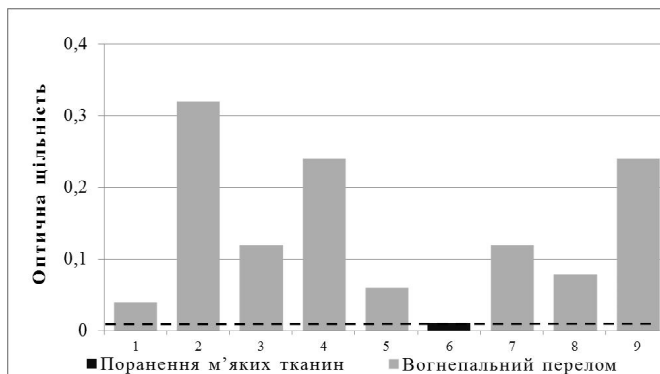


Рис. 4. Інтенсивність плівкоутворення штамми Enterococcus spp.

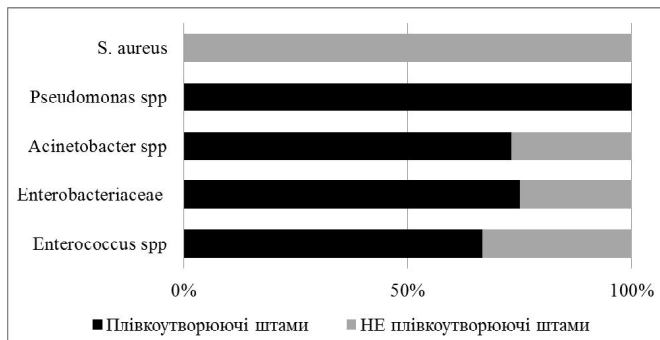


Рис. 5. Співвідношення плівкоутворюючих та неплівкоутворюючих штамів у загальній кількості виділених ізолятів. ревищував $0,1 \pm 0,06$. Слід підкреслити, що за частотою виділення з ран вони також займали останнє місце.

До плівкоутворюючих відносились 66% виділених штамів *Enterococcus spp.* (середній показник інтенсивності плівкоутворення $0,15 \pm 0,1$) (рис. 4). Із числа стафілококів, що не коагулюють плазму, половина штамів належала до плівкоутворюючих. Здатності до плівкоутворення не виявили 2 штамів золотистих стафілококів.

Показник інтенсивності утворення біоплівки відбиває ступінь вираженості цієї ознаки у кожного штамів. Найбільше штамів-біоплівкоутворювачів виявилось серед псевдомонад. Слідом за ними розташувалися акінетобактерії. Незважаючи на те, що кількість акінетобактерій позитивних за ознакою плівкоутворення відносно велика, притаманна їм інтенсивність плівкоутворення значно нижча, ніж у псевдомонад. Ще меншим показником інтенсивності плівкоутворення був у

інших досліджених видів мікроорганізмів.

Виділення мікроорганізмів відбувалось з 2 принципово різних типів бойових пошкоджень. Статистично більше плівкоутворюючих штамів виділено з поранень, які супроводжувались переломом кісток, ніж з ізолюваних поранень м'яких тканин, 63 штами (81%) та 14 (19%) відповідно. Значення χ^2 склало 3,841, $p < 0,005$. Для утворення бактеріальної біоплівки необхідною умовою є наявність твердого субстрату, найкраще на поділі рідкої та сухої фаз. Наявність кісткових фрагментів серед м'яких тканин та ексудату повністю відповідає цим вимогам, та сприяє існуванню бактерій у вигляді біоплівок.

На рис. 5 наведено співставлення частоти виділення штамів, що формують біоплівку, та штамів негативних за цією ознакою. Здатність до плівкоутворення забезпечує бактеріям умови для виживання у рані. Вираженість та поширеність цієї властивості серед акінетобактерій та псевдомонад, певно, зумовлюють домінування цих бактерій у спектрі ранових ізолятів та можливість їх довготривалого перебування у рані.

Обмеженням дослідження є відсутність співставлення або порівняння окремих штамів, що послідовно але в різні терміни ранозагоювання виділені від одного хворого з метою довести чи спростувати їх ідентичність. Це не дає нам можливості стверджувати, що завдяки існуванню у біоплівці відбувається персистенція одного і того ж штаму мікроорганізму у рані протягом всього періоду загоєння. Однак, очевидно, що здатність до утворення біоплівок притаманна не лише бактеріям, що супроводжують чи спричиняють хронічні інфекційні процеси. Гострі масивні пошкодження тканин, що потребують тривалого загоєння також заселяються мікроорганізмами здатними утворювати біоплівки.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Встановлено, що серед мікроорганізмів, які виділяються з мінно-вибухових та вогнепальних бойових ран, переважна більшість володіє здатністю до плівкоутворення. Проте, вираженість цієї ознаки має суттєві міжвидові та міжштамові відмінності.

2. Домінування плівкоутворюючих штамів бактерій у загальному спектрі ранових ізолятів обумовлене вищою здатністю до виживання мікроорганізмів у складі біоплівок в умовах рани, у порівнянні з планктонними формами мікроорганізмів.

3. Пошкодження, що утримують твердий субстрат (фрагменти кісток), у більшій мірі схильні до контамінації плівкоутворюючими штамми мікроорганізмів, у порівнянні з пошкодженнями виключно м'яких тканин.

У перспективі необхідно провести дослідження здатності до плівкоутворення мікрофлори, виділеної у різні терміни в динаміці ранозагоєння. Являє інтерес визначення взаємозв'язку цієї здатності з рівнем чутливості до антибіотиків.

Список літератури

1. Biofilms in chronic wounds /G.A.James, E.Swogger, R.Wolcott [et al.]//Wound Repair Regen.- 2008.- Vol. 16.- P.-37-44.
2. Costerton J.W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections /J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg //Science.- 1999.- Vol.284.- P.1318-1322.
3. Edwards R. Bacteria and wound healing / R. Edwards, K.G. Harding//Curr. Opin. Infect. Dis.- 2004.- Vol. 17.- P.91-96.
4. McGrath E.J. Nosocomial infections and multidrug-resistant bacterial organisms in the pediatric intensive care unit /E.J. McGrath, B.I. Asmar // Indian J. Pediatr.- 2011.- Vol.78.- P.176-184.
5. Orthopaedic-implant infections by Escherichia coli: molecular and phenotypic analysis of the causative strains /L.Cremet, S.Corvec, P.Bemer [et al.] //J. Infect.- 2012.- Vol.64.- P.169-175.
6. Pathogens present in acute mangled extremities from Afghanistan and subsequent pathogen recovery / T.E.Wallum, H.C.Yun, E.A.Rini [et al.] //Mil. Med.- 2015.- Vol.180.- P.97-103.
7. Percival S.L. Biofilms and their potential role in wound healing /S.L. Percival //Wounds.- 2004.- Vol. 16.- P.234-240.
8. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci /S.Stepanovic, G.D.Bonaventura, D.Vukovic [et al.]//APMIS.- 2007.- Vol.9.- P.891-899.
9. The importance of a multifaceted approach to characterizing the microbial flora of chronic wounds /A.Han, J.M.Zenilman, J.H.Melendez [et al.]//Wound Repair. Regen.- 2011.- Vol.9.- P.532-541.
10. The Pseudomonas aeruginosa transcriptome in planktonic cultures and static biofilms using RNA sequencing /A.Dotsch, D.Eckweiler, M.Schniederjans [et al.]//PLoS One.- 2012.- Vol.7.- P.31092.

Кондратюк В.Н., Ковальчук В.П., Безулий Н.Н., Фомин А.А.

ХАРАКТЕРИСТИКА СПОСОБНОСТИ К ОБРАЗОВАНИЮ БИОПЛЕНОК МИКРОФЛОРЫ ОГНЕСТРЕЛЬНЫХ И МИННО-ВЗРЫВНЫХ РАН КОНЕЧНОСТЕЙ

Резюме. Боевые раны характеризуются длительным течением, осложняющимся гнойно-воспалительными процессами. Установлено, что хронические инфекционные осложнения вызывают бактерии, обладающие способностью к пленкообразованию. Целью исследования было оценить способность к образованию биопленок микрофлоры, выделенной из боевых ран. Среди семидесяти семи изолятов 57 (74%) проявили способность к биопленкообразованию. Все штаммы псевдомонад, 30 штаммов акинетобактерий (73%), 5 штаммов (66%) *Enterococcus spp* образовывали биопленки. Энтеробактерии и стафилококки оказались слабыми биопленкообразователями.

Ключевые слова: боевые раны, микрофлора, бактериальная биопленка.

Kondratiuk V. M., Kovalchuk V. P., Bezuliy M. M., Fomin O.O.

CHARACTERISTICS OF THE ABILITY TO BIOFILM FORMATION AMONG MICROORGANISMS ISOLATED FROM GUNSHOT AND BLAST WOUNDS OF EXTREMITIES

Summary. Combat wounds are characterized by long healing progress, which is complicated by inflammatory processes. Established that chronic infectious complications caused by bacteria can form biofilms. The aim of study was to evaluate the ability to form biofilms microflora released from combat wounds. Among the seventy-seven isolates 57 (74%) found the ability to biofilm formation. All isolated strains of *Pseudomonas*, thirty *Akinetes* bacteria strains (73%), 5 strains (66%) *Enterococcus spp* formed biofilms. *Enterobacteria* and *staphylococcus* proved the weakest biofilm-forming.

Key words: battle wounds, microbial flora, biofilm.

Рецензент - д.мед.н., проф. Желіба М.Д.

Стаття надійшла до редакції: 13.10.2015р.

Кондратюк Вячеслав Миколайович - к.мед.н., начальник відділення анестезіології, ВМКЦ ЦР Вінниця; +38 098 27-71-618; kondratuk2007@gmail.com

Ковальчук Валентин Петрович - д.мед.н., професор, професор кафедри мікробіології, вірусології та імунології ВНМУ ім.М.І.Пирогова; +38 097 41-11-351; valentinkovalchuk2015@gmail.com

Безулий Микола Миколайович - начальник клініки лабораторної діагностики ВМКЦ ЦР Вінниця; valentinkovalchuk2015@gmail.com

Фомін Олександр Олександрович - начальник відділення травматології ВМКЦ ЦР Вінниця; +38 063 254-17-03