

УДК 617.76-001.4-001.5:612.336.3

Формування мікробних біоплівки при травматичних пошкодженнях допоміжного апарату ока

О. В. Петренко¹, д-р мед. наук, професор; М. М. Дранко^{1,2}, лікар-офтальмолог, аспірант;
В. М. Голубнича³, канд. біол. наук; Л. В. Грицай², канд. мед. наук

¹ Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика;
Київ (Україна)

² Сумська обласна клінічна лікарня;
Суми (Україна)

³ Сумський державний університет, медичний інститут;
Суми (Україна)

E-mail: drankoma@ukr.net

Ключові слова:

біоплівки, мікроорганізми, рана, інфекція, допоміжний апарат ока, генціан-віолет

Актуальність. Біоплівки (мікробні спільноти) можуть бути утворені як патогенними, так і непатогенними мікроорганізмами. Формування біоплівки (БП) зумовлює численні проблеми в клінічній практиці, оскільки вони гальмують процес загоєння ран і часто характеризуються стійкістю до антибіотиків.

Мета. Дослідити здатність мікроорганізмів, виділених із ран пацієнтів із травматичними пошкодженнями допоміжного апарату ока (ДАО), утворювати БП.

Матеріал та методи. Було обстежено 60 пацієнтів із травматичними пошкодженнями ДАО. Проведено бактеріологічне дослідження мазків із ран з подальшим визначенням видового складу та популяційного рівня мікрофлори. Далі аналізували здатність мікроорганізмів, які найчастіше висівались, формувати БП. Дослідження біоплівки проводили, визначаючи об'єм сформованої БП [O'Toole and Kolter, 1998] за допомогою фарбування БП генціан-фіолетом (crystal violet). Метод базується на здатності барвника кристалічного фіолетового (CV) зв'язуватися з клітинами і матриксом БП. Інтерпретацію результатів проводили з урахуванням оптичної щільності зафарбованого розчинника.

Результати. Від 60 пацієнтів виділено та ідентифіковано 75 штамів мікроорганізмів. Грампозитивна мікрофлора склала 73% (n=54), а грамнегативна – 27% (n=20). Лідуючі позиції займають *Staphylococcus aureus* (n=21), *Acinetobacter spp.* (n=11), *Klebsiella ozenae* (n=8), *Micrococcus spp.* (n=8), *Corynebacterium spp.* (n=5), *Arthro bacter cuminsii* (n=4), *Staphylococcus epidermidis* (n=3). Найбільша здатність до плівкоутворення проявляється у *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.* і *Klebsiella ozenae*, які є представниками умовно-патогенної флори. *Staphylococcus aureus* найбільш інтенсивно утворював БП в часовому проміжку з 1-ї по 3-ю добу, *Acinetobacter spp.* – в першу добу, а *Klebsiella ozenae* – з 3-ї по 7-у добу.

Висновки. Більшість клінічно значимих мікроорганізмів, які були виділені з ран пацієнтів з травматичними пошкодженнями допоміжного апарату ока, мають здатність до формування мікробних БП. Найбільше ця здатність проявляється у *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.* і *Klebsiella ozenae*, які являються представниками умовно-патогенної флори.

Актуальність. Відомо, що мікроорганізми в природних умовах існування живуть переважно у вигляді складно організованих мікробних спільнот, які називають біоплівками (biofilms). Згідно сучасних уявлень, біоплівка (БП) – це безперервний шар бактеріальних клітин, які прикріплені одна до одної та до поверхні, і з'єднані біополімерним матриксом [1, 4]. Такі бактеріальні організації можуть бути утворені бактеріями одного або кількох видів. Вони можуть складатися з активних функціонуючих клітин, або зі «спочиваючих», або некультивованих форм. Біоплівки можуть бути утворені непатогенними та патогенними представниками мікрофлори шкіри та слизових оболонок [1, 8].

Доведено, що мікроорганізми здатні формувати біоплівки не лише на біотичних, але і на абіотичних поверхнях [1, 8, 11]. Мікробні біоплівки колонізують усі імплантати, які застосовують у медичній практиці,

шовний матеріал, дренажі, контактні лінзи, інтраокулярні лінзи, стенти, катетери, штучні клапани і т.д. [1, 5, 11]. Це заслуговує на особливу увагу, так як біоплівки можуть розвиватись на них вже у перші дні після встановлення. Такий спосіб існування бактерій, грибів і мікробних асоціацій зумовлює численні проблеми в хірургічній практиці, оскільки встановлено, що формування біоплівки мікроорганізмами впливає на хронізацію запальних процесів, суттєво гальмує процес загоєння ран [5, 7]. Окрім того, мікроорганізми, які входять до складу БП, характеризуються високим рівнем стійкості до дії антибактеріальних препаратів, антисептиків, дезінфектантів, антитіл і фагоцитів [5, 8].

Експериментально доведено, що планктонні форми бактерій та грибів у більшості випадків спричиняють

гострі запальні процеси та загострення хронічних захворювань, що спостерігається при розриві біоплівки і дисемінації збудника, а мікроорганізми біоплівок – хронічні форми захворювань, серед яких запальні захворювання очей (блефарити, кон'юнктивіти, кератити, склерити, увеїти), інфекції м'яких тканин допоміжного апарату ока, хронічний остеомієліт та ін. [1, 5, 8, 11].

Дослідженню біоплівок приділяється значна увага науковців (мікробіологів, фармацевтів, клініцистів), оскільки здатність патогенних бактерій до формування біоплівок створює суттєві складнощі у клінічній практиці. З огляду на все перераховане та актуальність означеної проблеми, метою нашого дослідження було дослідити здатність мікроорганізмів, виділених із ран пацієнтів із травматичними пошкодженнями допоміжного апарату ока (ДАО), утворювати біоплівки.

Матеріал та методи

Впродовж 2018-2019 років нами було обстежено 60 пацієнтів із травматичними пошкодженнями допоміжного апарату, які зверталися за допомогою до кабінету невідкладної допомоги при відділенні мікрохірургії ока Сумської обласної клінічної лікарні. Хворим проводили обстеження та лікування згідно стандартів надання медичної допомоги. Процедура обстеження даних осіб відповідала нормативам етичного комітету. Для встановлення наявності мікроорганізмів у травмованих тканинах і вивчення їх видового складу було проведено бактеріологічне дослідження мазків із ран. Збір досліджуваного матеріалу від хворого проводився під час першого звернення до проведення первинної хірургічної обробки та призначення антибактеріальної терапії. Дослідження передбачало визначення видового складу та популяційного рівня мікрофлори ран ДАО, у відповідності до вимог із модифікацією кількісного визначення бактерій за методикою секторних посівів на базі бактеріологічної лабораторії медичного інституту СумДУ. Діагностично значущими вважали ізоляти мікроорганізмів у кількості понад 102 КОУ/мл. Видову ідентифікацію проводили з використанням класичних методів виділення та ідентифікації мікроорганізмів [3]. Далі аналізували здатність мікроорганізмів, які найчастіше висівалися, формувати БП. Дослідження біоплівок проводили, визначаючи об'єм сформованої біоплівки [O'Toole and Kolter, 1998] [1, 3, 9].

Для цього суміш досліджуваних мікроорганізмів вносили у полістироловий планшет та інкубували разом з поживним бульйоном упродовж 1, 3, 7 діб при 37°C. Після культивування бактерій із лунок планшета видаляли середовище з планктонними клітинами та тричі промивали стерильним буфером PBS в тому ж об'ємі, в якому проходило культивування, який також видалявся. Після цього в лунки планшета вносили 4 мл відфільтрованого 0,1% розчину генціан-віолету. Інкубували біоплівки з барвником впродовж 10-15 хвилин при кімнатній температурі. Потім видаляли з лунки барвник та промивали лунки для видалення барвника,

який не зв'язався. Планшети перевертали на фільтрувальний папір і висушували. Після цього в лунки додавали 95% розчин етанолу в об'ємі 4 мл. Розчинник відбирали, поміщали в чисті плоскодонні планшети і вимірювали оптичну щільність при довжині хвилі 595 нм на фотометрі мікропланшетного формату Thermo Scientific Multiscan FC версія ESW 1.01.16. Інтерпретацію результатів проводили з урахуванням оптичної щільності зафарбованого розчинника [1, 3, 9].

Результати проведених досліджень піддавали статистичній обробці. Для проведення обчислень використовували програму Graph Pad Quik Calcs із визначенням критерію t-Стюдента.

Результати і обговорення

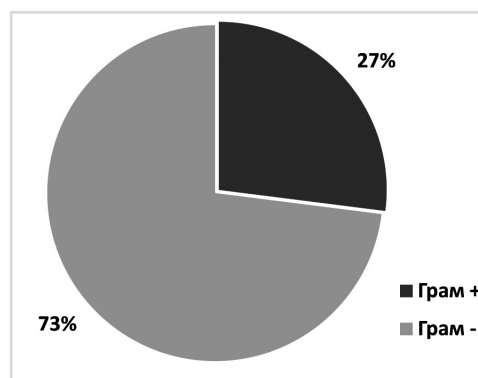
Обстежено 60 пацієнтів із травматичними пошкодженнями допоміжного апарату ока. Від них було виділено та ідентифіковано 75 штамів мікроорганізмів.

У відносних показниках грампозитивна мікрофлора складала 73% (n=54), а грамнегативна – 27% (n=20). Наочно це відображено на мал. 1.

З отриманих даних (табл. 1.) видно, що лідируючі позиції займають *Staphylococcus aureus* (n=21), *Acinetobacter* spp. (n=11), *Klebsiella ozenae* (n=8), *Micrococcus* spp. (n=8), *Corynebacterium* spp. (n=5), *Artrobacter cuminsii* (n=4), *Staphylococcus epidermidis* (n=3). Решта штамів визначались в поодиноких випадках.

Staphylococcus epidermidis, *Micrococcus* spp., коринеформні бактерії (*Corynebacterium* spp., *Artrobacter cuminsii*) є комменсалами та не можуть викликати захворювань, якщо шкіра не пошкоджена. *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp. і *Klebsiella ozenae* є представниками умовно-патогенної мікрофлори, які можуть спричиняти різноманітні гнійно-запальні (від раневої інфекції м'яких тканин до панофтальміту) та часто характеризуються антибіотикорезистентністю (мал. 2) [2, 7].

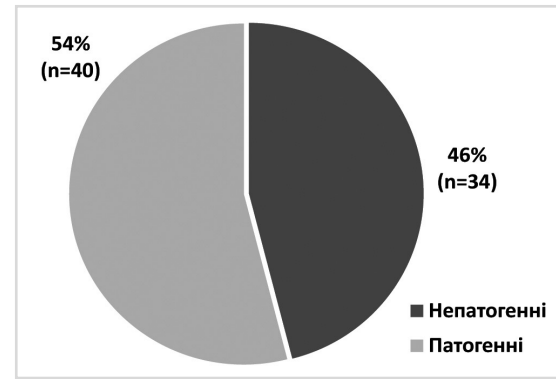
Враховуючи частоту виділення мікроорганізмів від пацієнтів, здатність утворювати біоплівки нами визначалась із використанням наступних мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp.,



Мал. 1. Частка грампозитивної та грамнегативної мікрофлори.

Таблиця 1. Видовий склад мікроорганізмів, виділених із ран пацієнтів із травматичними пошкодженнями допоміжного апарата ока

№ п/п	Виділені штами мікроорганізмів	Кількість виділених мікроорганізмів	
		абсолютна кількість	відносна кількість (%)
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	21	28,0%
2	<i>Acinetobacter</i> spp.	11	14,7%
3	<i>Micrococcus</i> spp.	8	10,7%
4	<i>Corynebacterium</i> spp.	5	6,7%
5	<i>Propionobacterium freudenreichii</i>	1	1,3%
6	<i>Staphylococcus hominis</i>	1	1,3%
7	<i>Staphylococcus kloosii</i>	1	1,3%
8	<i>Staphylococcus capitis</i>	1	1,3%
9	<i>Staphylococcus hyicus</i>	1	1,3%
10	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	1,3%
11	<i>Staphylococcus arlettae</i>	1	1,3%
12	<i>Clostridia fallax</i>	1	1,3%
13	<i>Arthrobacter cuminsii</i>	4	5,4%
14	<i>Aerococcus viridans</i>	2	2,7%
15	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	1,3%
16	<i>Listeria innocua</i>	1	1,3%
17	<i>Candida</i> spp.	1	1,3%
18	<i>E. coli</i>	1	1,3%
19	<i>Dermabacter</i> spp.	1	1,3%
20	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3	4,0%
21	<i>Klebsiella ozenae</i>	8	10,7%
Всього:		75	100,0%

**Мал. 2.** Частка непатогенної та патогенної мікрофлори.

Klebsiella ozenae, *Micrococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Arthrobacter cuminsii*, *Staphylococcus epidermidis*.

З наведених даних (табл. 2) можливо зробити висновок, що більшість досліджуваних мікроорганізмів формують біоплівки *in vitro*. Найбільше ця здатність проявляється у *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp. і *Klebsiella ozenae*, які є представниками умовно-патогенної флори. Решта штамів характеризуються більш слабкою здатністю формувати біоплівки. Різницю рахували статистично достовірною при значенні $p < 0,05$.

На малюнку 3 графічно зображено динаміку утворення БП умовно-патогенними мікроорганізмами.

З малюнку 4 видно, що *Staphylococcus aureus* найбільш інтенсивно утворював БП в часовому проміжку з 1-ї по 3-ю добу.

З малюнку 5 видно, що *Acinetobacter* spp. найбільш інтенсивно формував БП в першу добу.

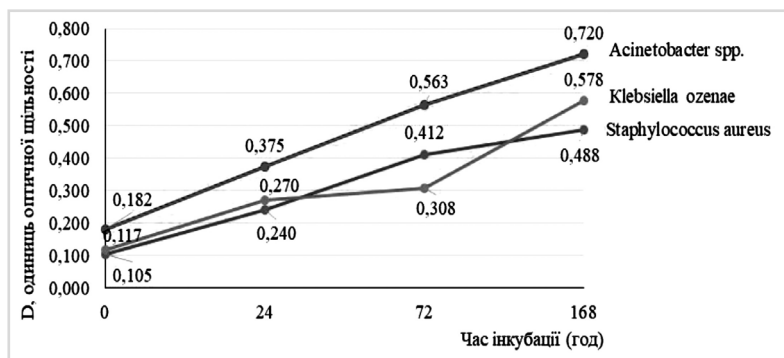
На малюнку 6 показано, що *Klebsiella ozenae* найбільш активно накопичує об'єм БП з 3-ї по 7-му добу.

Експериментально доведено, що здатність мікроорганізмів утворювати БП реалізується не лише *in vitro*, а також безпосередньо в ранах [5, 6, 7, 8]. Також відомо, що планктонні форми бактерій та грибів у більшості випадків спричиняють гострі запальні

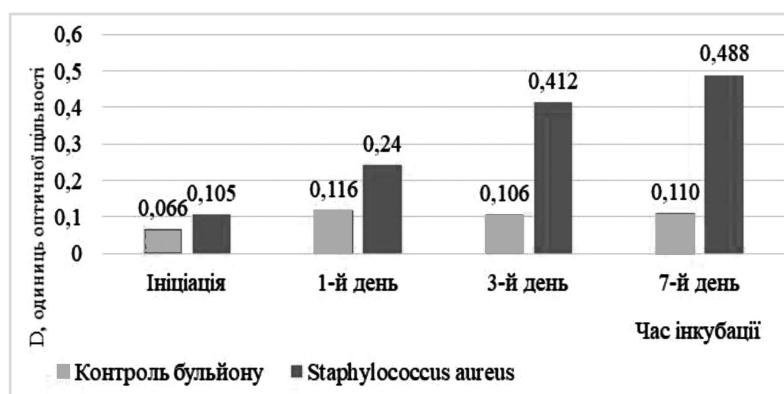
Таблиця 2. Показники оптичної щільності досліджуваних штамів

№ п/п	Клінічний штам	Ініціація	1-й день	3-й день	7-й день	Барвник
1	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,105	0,240*	0,412*	0,488*	Генціан-віолет
2	<i>Micrococcus</i> spp.	0,305	0,330	0,360	0,478*,**	Генціан-віолет
3	<i>Klebsiella ozenae</i>	0,187	0,270	0,308	0,578*	Генціан-віолет
4	<i>Corynebacterium</i> spp.	0,271	0,286*	0,313*,**	1,039*,**,**	Генціан-віолет
5	<i>Acinetobacter</i> spp.	0,182	0,375*	0,563*	0,770*,**,**	Генціан-віолет
6	<i>Arthrobacter</i> spp.	0,147	0,240*	0,330*,**	0,936*,**	Генціан-віолет
7	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,232	0,240	0,248	0,477*,**,**	Генціан-віолет

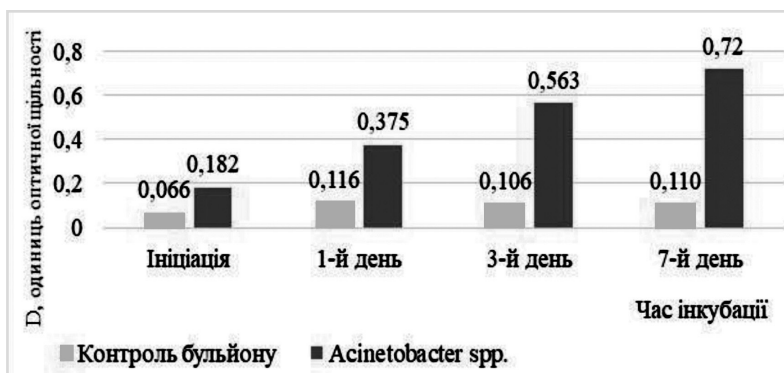
Примітка: * - даний показник статистично достовірно ($p < 0,05$) відрізняється від показників у групі ініціації. ** даний показник статистично достовірно ($p < 0,05$) відрізняється від показників у групі 1-й день. *** даний показник статистично достовірно ($p < 0,05$) відрізняється від показників у групі на 3-й день.



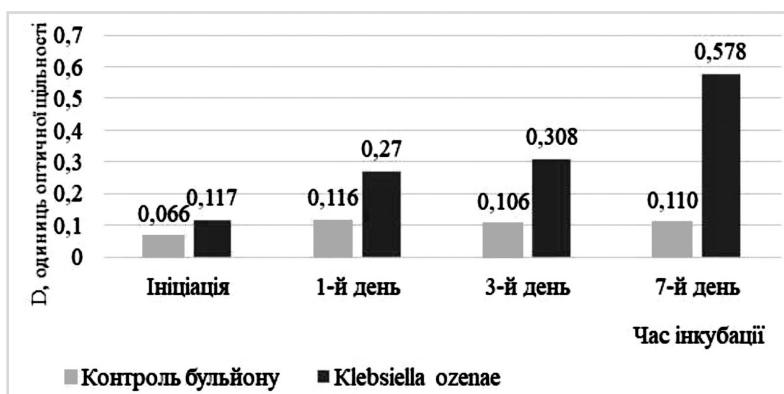
Мал. 3. Динаміка утворення БП умовно-патогенними мікроорганізмами



Мал. 4. Динаміка утворення БП Staphylococcus aureus



Мал. 5. Динаміка утворення БП Acinetobacter spp.



Мал. 6. Динаміка утворення БП Klebsiella ozenae

процеси та загострення хронічних захворювань (спостерігається при розриві біоплівки і дисемінації збудника), біоплівкові мікроорганізми - хронічні форми захворювань [4, 6, 7]. Оскільки бактерії в біоплівці резистентні до дії як антимікробних препаратів, так і до факторів неспецифічного захисту організму, одним із напрямів лікування раневої інфекції має бути пригнічення здатності мікроорганізмів формувати БП та руйнування наявної БП [4, 7, 10].

Висновки

1. У пацієнтів з травматичними пошкодженнями допоміжного апарату ока найчастіше з ран висівались Staphylococcus aureus (n=21), Acinetobacter spp. (n=11), Klebsiella ozenae (n=8), Micrococcus spp. (n=8), Corynebacterium spp. (n=5), Arthrobacter cuminii (n=4), Staphylococcus epidermidis (n=3). Решта штамів визначались в поодиноких випадках ($p < 0,05$).

2. Доведено, що більшість клінічно значимих мікроорганізмів, які були виділені з ран пацієнтів з травматичними пошкодженнями допоміжного апарату ока, мають здатність до формування мікробних біоплівок.

3. Найбільше ця здатність проявляється у Staphylococcus aureus, Acinetobacter spp. і Klebsiella ozenae, які являються представниками умовно-патогенної флори.

4. Аналіз динаміки формування БП умовно-патогенними мікроорганізмами свідчить, що Staphylococcus aureus найбільш інтенсивно утворював БП в часовому проміжку з 1-ї по 3-ю добу, Acinetobacter spp. - в першу добу, Klebsiella ozenae найбільш активно формує БП з 3-ї по 7-у добу.

Література

1. Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие / А. М. Марданова, Д. А. Кабанов, Н. Л. Рудакова, М. Р. Шарипова. - Казань: К(П)ФУ, 2016. - 42 с.
2. Внутриглазная раневая инфекция: Руководство для врачей / А. М. Южаков, Р. А. Гундорова, В. В. Нероев, А. В. Степанов. - М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. - 240 с.
3. Мікробіологія з технікою мікробіологічних досліджень, вірусологія та імунологія: підручник (ВНЗ I-III р. а.) / В. А.

- Люта, О. В. Кононов. – 2-е вид. – Київ: Медицина, 2018. – 576 с.
4. **Недашківська В. В.** Біоплівки та їх роль в інфекційних захворюваннях / В. В. Недашківська, М. Л. Дронова, Н. О. Вринчану // Укр. науково-мед. молодіжн. журнал. – 2016. – №4(98). – С. 11-19.
 5. **Окулич В.К.** Микробные биоплёнки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии / В. К. Окулич, А. А. Кабанова, Ф. В. Плотников. – Витебск: ВГМУ, 2017. – 300 с.
 6. **Осипова Е. В.** Сравнительная количественная оценка способности образования биоплёнки различными клиническими штаммами бактерий на поверхности полистирола и стекла / Е. В. Осипова, И. В. Шипицына, З. С. Науменко // Междунар. журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2014. – № 8-1. – С. 55-58.
 7. **Петренко О. М.** Вивчення здатності збудників флегмон м'яких тканин до формування біоплівок / О. М. Петренко, Б. Г. Безродний, О. Л. Бондарчук // Хірургія України. – 2016. – № 1. – С. 85-89.
 8. **Сідашенко О.** Методи вивчення динаміки формування біоплівок умовно-патогенними бактеріями / О. Сідашенко, О. Воронкова, О. Сірокваша, А. Вінніков // Вісник Львівського університету. – Серія біологічна, 2014. – Випуск 65. – С. 20-33.
 9. **Симонова И. Р.** Методы культивирования и изучения бактериальных биопленок / И. Р. Симонова, С. Н. Головин, Л. М. Веркина, Е. А. Березняк, С. В. Титова // Известия ВУЗов. – Северо-Кавказский регион. – 2017. – Випуск 1. – с. 73-79.
 10. **Чеботарь И. В.** Биоплёнки *Staphylococcus aureus*: структурно-функциональные характеристики и взаимоотношение с нейтрофилами: диссертация на соискание учёной степени д-ра мед. наук. – Н. Новгород, 2014. – 43 с.
 11. **Percival S. L., McCarty S. M., Lipsky B.** Biofilms and wounds: an overview of the evidence // *Advances in Wound Care*. – 2015. – №7. Vol. 4. – P. 373–381.

Автори засвідчують про відсутність конфлікту інтересів, які б могли вплинути на їх думку стосовно предмету чи матеріалів, описаних та обговорених в даному рукопису.

Поступила 17.10.2019

Формирование микробных биопленок при травматических повреждениях вспомогательного аппарата глаза

Петренко О.В., Дранко М.М., Голубнича В.М., Грицай Л.В.

Национальная медицинская академия последипломного образования им. П.Л. Шупика, Киев (Украина)

Сумская областная клиническая больница; Сумы (Украина)

Сумской государственный университет, Медицинский институт; Сумы (Украина)

Актуальность. Биоплёнки (микробные сообщества) могут быть образованы как патогенными, так и непатогенными микроорганизмами. Формирование биоплёнок (БП) вызывает многочисленные проблемы в клинической практике, поскольку они тормозят процесс заживления ран и часто характеризуются устойчивостью к антибиотикам.

Цель. Исследовать способность микроорганизмов, выделенных из ран пациентов с травматическими повреждениями вспомогательного аппарата глаза (ВАГ), образовывать БП.

Материал и методы. Было обследовано 60 пациентов с травматическими повреждениями ВАГ. Проведено бактериологическое исследование мазков из ран с последующим определением видового состава и популяционного уровня микрофлоры. Дальше анализировали способность микроорганизмов, которые чаще всего высевались, формировать БП. Исследование БП проводили, определяя объём сформированной биомассы [O'Toole and Kolter, 1998] с помощью окрашивания БП генциан-виолетом (crystal violet). Метод базируется на способности красителя кристаллического фиолетового (CV) связываться с клетками и матриксом БП. Интерпретацию результатов проводили согласно

оптической плотности окрашенного растворителя.

Результаты. От 60-ти пациентов выделено и идентифицировано 75 штаммов микроорганизмов. Грамположительная микрофлора составила 73% (n=54), а грамотрицательная – 27% (n=20). Лидирующие позиции занимают *Staphylococcus aureus* (n=21), *Acinetobacter spp.* (n=11), *Klebsiella ozenae* (n=8), *Micrococcus spp.* (n=8), *Corynebacterium spp.* (n=5), *Artrobacter cuminsii* (n=4), *Staphylococcus epidermidis* (n=3). Наибольшая способность к плёнообразованию проявляется у *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.* и *Klebsiella ozenae*, которые являются представителями условно-патогенной флоры. *Staphylococcus aureus* наиболее интенсивно образовывал БП в часовом промежутке с 1-х по 3-и сутки, *Acinetobacter spp.* – в первые сутки, а *Klebsiella ozenae* – с 3-х по 7-е сутки.

Выводы. Большинство клинически значимых микроорганизмов, которые были выделены из ран пациентов с травматическими повреждениями вспомогательного аппарата глаза, имеют способность к формированию микробных БП. Наиболее эта способность проявляется у *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.* и *Klebsiella ozenae*, которые являются представителями условно-патогенной флоры.

Ключевые слова: биоплёнки, микроорганизмы, раневая инфекция, вспомогательный аппарат глаза, генциан-виолет