



О. М. Петренко¹, Б. Г. Безродний¹, О. Л. Бондарчук²

¹ Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ

² Київська міська клінічна лікарня № 4

ВИВЧЕННЯ ЗДАТНОСТІ ЗБУДНИКІВ ФЛЕГМОН М'ЯКИХ ТКАНИН ДО ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК

Мета роботи — дослідити здатність збудників флегмон м'яких тканин утворювати біоплівки в післяопераційний період.

Матеріали і методи. Вивчено перебіг ранового процесу в 127 (85 чоловіків та 42 жінки) пацієнтів з абсцесами та флегмонами м'яких тканин різної локалізації. Середній вік хворих ($52,4 \pm 4,6$) року. Всіх пацієнтів було прооперовано (адекватне розкриття та санація гнійного вогнища з дрениванням). У післяопераційний період проводили моніторинг основних показників, визначали чутливість мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів, методом мікроскопії досліджували зразки тканин з ранових поверхонь на предмет формування біоплівки.

Результати та обговорення. Встановлено, що мікроорганізмами, які спричиняли гнійні процеси, були грамнегативні бактерії. Під час загоєння, починаючи з 3-ї доби післяопераційного періоду, на поверхні рани утворюються елементи біоплівок. Виявлено пряму кореляційну залежність між здатністю мікроорганізмів утворювати бактеріальну плівку і тривалістю захворювання. У разі зменшення ознак системного запалення та формування грануляцій біоплівки в рані не спостерігали.

Висновки. Мікроорганізми мають властивість утворювати бактеріальні плівки *in vitro* протягом 18—24 год, що свідчить про здатність штамів мікроорганізмів формувати агресивне співтовариство. Селекція найбільш життєздатних штамів відбувається на 3-тю добу після оперативного втручання. Її виявлено у 5 % спостережень. Наявність біоплівки є критерієм хронізації ранового процесу, що слід ураховувати під час лікування.

■

Ключові слова: флегмони м'яких тканин, біоплівка, мікроскопія.

Значну частку пацієнтів хірургічного стаціонару становлять хворі з хірургічною інфекцією, а саме з флегмонами та абсцесами м'яких тканин [1, 4]. У розвинених країнах 2—3 % населення страждає від ран, які тривало не заживають [5] і які часто формуються внаслідок розкриття абсцесів та флегмон. Незадовільні результати лікування цієї категорії пацієнтів деякою мірою можна пояснити утворенням мікроорганізмами в рані біоплівок — співтовариства мікроорганізмів різних видів, які існують у тривимірному мукополісахаридному матриксі, на катетерах, дренажах та рановій поверхні [2]. Роль цих утворень у процесах загоєння ран вивчено недостатньо. Відомо, що майже 60 % інфекційних захворювань пов'язані з утворенням подібних бактеріальних структур [9]. Мікроорганізми в біоплівці стійкі до дії як антибактеріальних препаратів, так і факторів неспецифічного імунітету організму людини [5—7]. У

низці робіт показано роль бактеріальних плівок у колонізації ран та їх вплив на перебіг інфекційних процесів [8, 9]. Здатність збудників флегмон утворювати біоплівки вивчено недостатньо.

Мета роботи — дослідити здатність збудників флегмон м'яких тканин утворювати біоплівки в післяопераційний період.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Обстежено 127 (85 чоловіків та 42 жінки) пацієнтів з флегмонами та абсцесами м'яких тканин різної локалізації, які перебували на стаціонарному лікуванні у відділенні гнійної хірургії Київської міської клінічної лікарні № 4 (клінічна база кафедри хірургії № 2 Національного медичного університету імені О. О. Богомольця) за період 2012—2014 рр. Середній вік пацієнтів — ($52,4 \pm 4,6$) року. Всі хворі отримували комплексне хірургічне лікування, яке передбачало оперативне лікування

(розкриття, некректомію, ревізію та дренивання гнійного вогнища), антибактеріальну терапію, за показаннями — дезінтоксикаційну, інфузійну та симптоматичну [1].

Всім хворим проводили клініко-лабораторне обстеження. При клінічній оцінці перебігу ранового процесу враховували наявність і тривалість регресу ознак синдрому системної запальної відповіді (ССЗВ) [4], тривалість захворювання, появу грануляційних тканин у ранах. Для контролю загальної запальної реакції організму досліджували вміст С-реактивного білка у сироватці крові протягом перших 5 дб післяопераційного періоду. Бактеріологічне дослідження проводили за загальноприйнятими методиками з виділенням чистих культур мікроорганізмів та ідентифікацією їх до виду. Чутливість до антибактеріальних препаратів визначали диско-дифузним методом (перелік антибактеріальних препаратів складала відповідно до чинних нормативних документів).

Під час перев'язок у післяопераційний період з вогнищ хірургічної інфекції у 1-шу, на 3-тю і 5-ту добу брали патологічний біологічний матеріал товщиною 0,3–0,5 мм з тканин гнійної рани, попередньо очистивши її від фібрину та гною. Вивчали нативні препарати та зафарбовані за Грамом.

Для вивчення здатності збудників флегмон формувати біоплівки в стерильний флакон з м'ясо-пептонним бульйоном поміщали стерильне предметне скло та інокулювали 0,1 мл бактеріальної суспензії збудника (приблизно 100 КВО). Після 18–24-годинної інкубації за температури 37 °С предметне скло вилучали, препарат фарбували за Грамом та вивчали біологічні плівки, які містили живі мікроорганізми, мікроскопічним методом. Дослідження особливостей формування біологічної плівки проводили методом світлової мікроскопії на мікроскопі Optika B-350 при збільшенні об'єктива 40 та 100 з ультрамікрофотографуванням за допомогою цифрового фотоапарата Sigeta.

Статистичну обробку даних здійснювали з використанням критерію Стьюдента та коефіцієнта лінійної кореляції Пірсона [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У всіх пацієнтів при госпіталізації виявлено щонайменше одну ознаку ССЗВ. Зникнення клінічних ознак ССЗВ відзначено через $(2,3 \pm 0,2)$ доби після оперативного втручання. Появу грануляційної тканини спостерігали в середньому на $(5,8 \pm 0,4)$ доби після операції. Тривалість перебування в стаціонарі становила в середньому $(14,2 \pm 1,3)$ доби.

З вогнищ інфекції під час хірургічного втручання було виділено 14 видів збудників ранових інфекцій, серед них переважали представники кокової мікрофлори: *Staphylococcus aureus* (44 штами), *S. epidermidis* (12 штами), *Streptococcus haemolyticus* (1 штама), *Enterococcus faecalis* (5 шта-

мів). Крім того, у великій кількості було виявлено представників родини ентеробактерій — 37 штамів (14 штамів — *Enterobacter cloacae*, 12 — *Klebsiella pneumoniae*, 9 — *E. aerogenes*, 8 — *Proteus mirabilis*, 5 — *Escherichia coli*, 2 — *Citrobacter freundii*, 1 — *K. oxytoca*), а також 19 штамів неферментаційних грамнегативних паличок (12 штамів *Pseudomonas aeruginosa*, 6 — *Actinobacter lwoffii*, 1 — *Actinobacter spp.*). У 15 пацієнтів у гнійних ранах росту мікроорганізмів не виявлено. У 52 хворих збудник було виділено у вигляді монокультури, у 70 — у вигляді асоціації мікроорганізмів.

Виділені стафілококи та стрептококи характеризувалися високим рівнем чутливості до цефазоліну, цефтріаксону, ципрофлоксацину, карбопенемів (меронему та іміпенему), ванкоміцину та лінезоліду. Найефективнішими щодо ентеробактерій виявилися амікацин, «Зоперцин», цефепім та меронеми. Усі штами синьогнійної палички були чутливими до амікацину, цефепіму, фторхінолонів та карбапенемів.

При дослідженні штамів *P. aeruginosa in vitro* значний ріст мікроорганізмів та формування біологічної плівки на предметному склі фіксували вже через 18–24 год інкубації за температури 37 °С. Бактерії рясно вкривали предметне скло у вигляді скупчень та конгломератів, які у подальшому (на 2-гу добу) трансформувалися в суцільний моношар. Останній являв собою однорідну структуру, обмежену лише полем зору (рис. 1). На 3-тю добу, крім *P. aeruginosa*, відзначено наявність окремих видів дріжджоподібних грибів.

При дослідженні штамів *S. aureus in vitro* наявності організації мікроорганізмів у вигляді бактеріальної плівки не виявлено. На предметному склі спостерігали лише поодинокі бактерії.

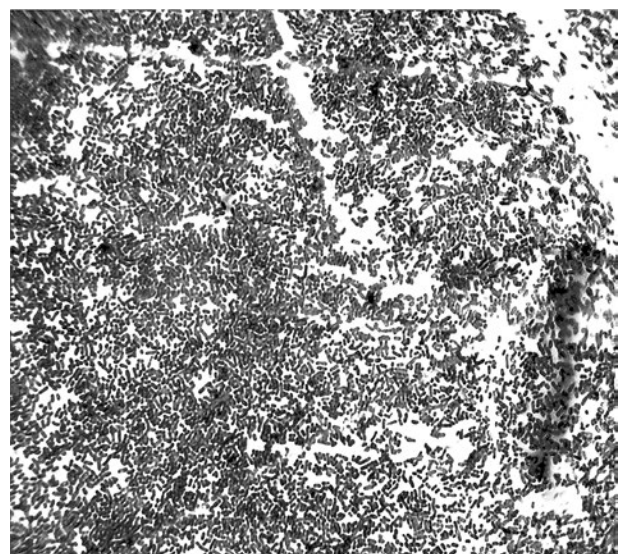


Рис. 1. Біоплівка, отримана *in vitro*. Структурована біоплівка, яка містить колонії бактерій. Фарбування за Грамом, світлова мікроскопія, $\times 1000$

Аналіз поширення та здатності формувати біоплівку збудників флегмон м'яких тканин *in vitro* виявив відмінності між групами патогенних мікроорганізмів. Найбільш вираженою зазначена здатність була у псевдомонад, тоді як у коків вона траплялася значно рідше.

В усіх пацієнтів під час мікроскопії патологічного біологічного матеріалу, отриманого з ран під час перев'язок у 1-шу добу, виявлено скупчення нейтрофільних лейкоцитів та мікроорганізмів. Бактерії були розташовані як вільно, так і на нейтрофілах. Деякі мікроорганізми спостерігали у вакуолях фагоцитів. Ознак бактеріальної плівки не виявлено (рис. 2).

У 32 пацієнтів на 3-тю добу та у 4 — на 5-ту добу в рані з'являлися аморфні субстанції, які містили мікроорганізми (рис. 3). Скупчення бактерій виявлено на нитках фібрину, навколо нейтрофілів. Також спостерігали вільно розташовані бактерії. Структура цих утворень нагадувала структуру бактеріальних плівок, отриманих *in vitro*. У всіх пацієнтів біоплівки було ізольовано з фіброзних на шарувань на дні та стінках ран (рис. 4), у 6 — з поверхні грануляцій.

У подальшому в разі появи у рані грануляційної тканини та зменшення ознак ССЗВ бактеріальну плівку не виявляли. У 7 пацієнтів, у яких зберігалася активна запальна реакція та спостерігалися ознаки хронізації процесу, наявність бактеріальної плівки зафіксовано і у пізніші терміни лікування (7-ма—10-та доба). У жодного хворого у рані не виявлено біоплівки зі складною структурою, як в експерименті *in vitro*.

Виявлено пряму кореляційну залежність між здатністю мікроорганізмів утворювати бактеріальну плівку і тривалістю захворювання ($r = +0,67$). Кореляція між здатністю мікроорганізмів утворю-

вати бактеріальну плівку і термінами регресії клінічних виявів ССЗВ була менш значущою та обернено пропорційною ($r = -0,42$), а між здатністю збудників утворювати плівки і термінами появи грануляцій — слабкою ($r = -0,27$).

Клінічні штами, насамперед ентеробактерії та псевдомонади, здатні утворювати бактеріальні плівки в рані, що може спричинити колонізацію цими мікроорганізмами ранової поверхні і тканин. Ця властивість не притаманна грампозитивним кокам [15]. Низька здатність деяких мікроорганізмів утворювати біоплівки за таких умов не означає, що вони не здатні формувати бактеріальні плівки в інших, сприятливіших умовах [6]. У обстежених

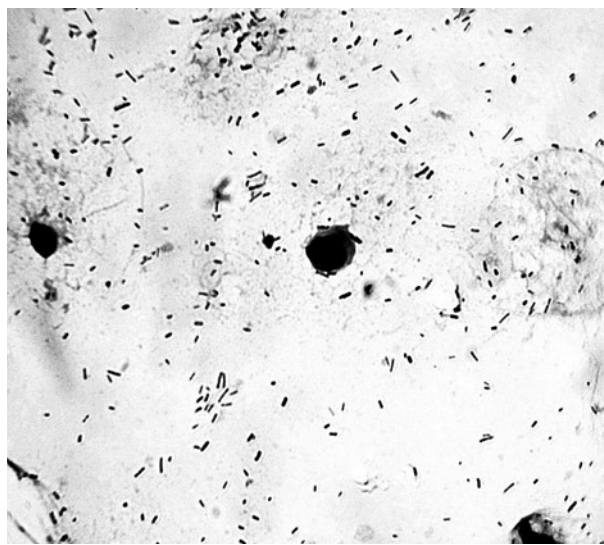


Рис. 3. Патологічний біологічний матеріал з рани на 3-тю добу після операції. Фарбування за Грамом, світлова мікроскопія, $\times 1000$. Видно бактерії у вигляді скупчень та поодинокі мікроорганізми

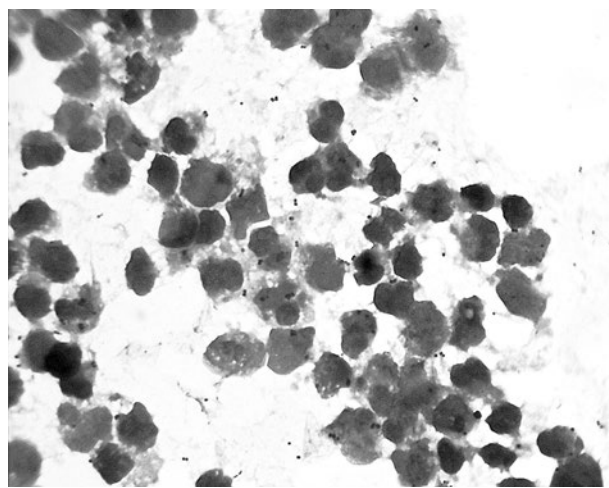


Рис. 2. Патологічний матеріал з рани в 1-шу добу після операції. Фарбування за Грамом, світлова мікроскопія, $\times 1000$. Видно мікроорганізми, розташовані всередині фагоцитів та поодинокі бактерії

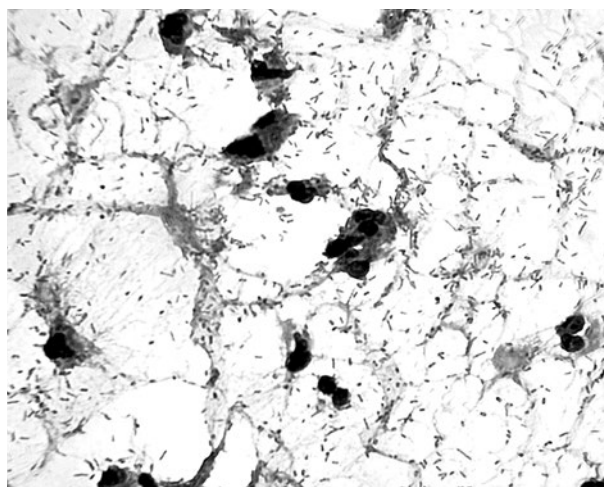


Рис. 4. Патологічний матеріал з рани на 5-ту добу після операції. Фарбування за Грамом, світлова мікроскопія, $\times 1000$. Видно аморфну біоплівку, яка містить мікроорганізми, фіксовані на нитках фібрину, та вільно розташовані бактерії

хворих з вогнища інфекції не було виділено анаеробні бактерії, однак роль цих мікроорганізмів у перебігу ранового процесу є значною [14].

Не виявлено чіткого зв'язку між здатністю мікроорганізму формувати плівку та чутливістю (резистентністю) до різних антибактеріальних препаратів. Однак адекватна антибіотикотерапія та місцеве лікування ран не дають змоги бактеріям активно формувати біоплівку, починаючи з 5-ї доби. З настанням другої фази ранового процесу та появою здорової грануляційної тканини бактеріальна плівка в рані не визначалася. Отже, можна припустити, що існує кореляція між здатністю мікроорганізмів утворювати бактеріальну плівку і тривалістю перебігу захворювання. Зазначену властивість можна вважати маркером хронізації ранового процесу.

Отримані дані свідчать про те, що здатність мікроорганізмів утворювати біоплівки реалізується не лише *in vitro*, а і безпосередньо у вогнищі ранової інфекції, однак терміни її формування суттєво відрізняються. Якщо *in vitro* біоплівка утворюється через 10 год після внесення культури в поживне середовище [12], то *in vivo* — через 24–72 год після інфікування рани [6]. Після санації ранового процесу та призначення системної антибіотикотерапії біоплівки, доступні для визначення за допомогою світлової мікроскопії, утворюються на 3-тю добу післяопераційного періоду (тобто після перетворення гнійної порожнини на відкриту рану). У більшості хворих біоплівки спостерігали навколо ниток фібрину.

Оскільки бактерії в біоплівці резистентні до дії як антимікробних препаратів [7, 11, 12], так і факторів неспецифічного захисту макроорганізму,

одним із напрямів лікування хірургічної інфекції має бути пригнічення здатності мікроорганізмів формувати біоплівку [8, 9] та руйнування наявної біоплівки [7, 11]. Терміни появи бактеріальних плівок свідчать про можливість етапного підходу до лікування хірургічної інфекції. На першу добу після операції доцільним є пригнічення здатності збудників формувати біоплівки [13]. Починаючи з 3-ї доби лікування, зусилля мають бути спрямовані на руйнування вже наявної біоплівки [12]. Висока виживаність бактерії в біоплівці зумовлена різними чинниками, зокрема наявністю в плівці клітин-персистерів [5, 7], тому при прогнозуванні перебігу ранового процесу та розробці методів лікування слід урахувати здатність мікроорганізмів утворювати бактеріальні плівки.

ВИСНОВКИ

Мікроорганізмами, які найчастіше спричиняли гнійні процеси м'яких тканин, були грамнегативні бактерії — ентеробактерії та псевдомонади (у 65 % випадків).

Установлено властивість мікроорганізмів утворювати бактеріальні плівки *in vitro* протягом 18–24 год, що свідчить про здатність штамів мікроорганізмів формувати агресивне співтовариство.

Селекція найбільш життєздатних штамів відбувається на 3-тю добу після оперативного втручання. Її виявлено у 5 % спостережень.

Наявність кореляційної залежності між здатністю формувати біоплівку мікроорганізмами і термінами появи грануляцій дає підставу вважати цю ознаку критерієм хронізації ранового процесу, що слід урахувати під час лікування.

Література

1. Балко О. В., Авдеева Л. В. Структурні компоненти і особливості організації біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* // Мікробіол. журн. — 2010. — Т. 72, № 4. — С. 28–32.
2. Бухарин О. В., Гинзбург Л. В., Романова Ю. М. Механізми виживання бактерій. — М.: Медицина, 2005. — 367 с.
3. Гланц С. Медико-биологическая статистика: Пер. с англ. — М.: Практика, 1998. — 496 с.
4. Ерюхин И. А., Хрупкин В. А., Бадиков В. М. Хирургические инфекции: Рук-во. — СПб.: Питер, 2003. — 588 с.
5. Романова Ю. М., Диденко Л. В., Толордава Э. Р. Биопленки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками // Вестн. РАМН. — 2011. — № 10. — С. 31–38.
6. Фадеев С. В., Тарасенко В. С. Формирование биопленок микрофлорой трофических язв у больных сахарным диабетом II типа // Материалы конф. «Сахарный диабет и хирургические инфекции». — М., 2013. — С. 148–150.
7. Bester E. et al. Metabolic differentiation in biofilms as indicated by carbon dioxide production rates // Appl. Environ. Microbiol. — 2010. — Vol. 76, N 4. — P. 1189–1197.
8. Bjarnsholt T. et al. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis / Wound Repair Regen. — 2008. — Vol. 16, N 1. — P. 2–10.
9. Dietrich L. E. et al. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa* // Mol. Microbiol. — 2006. — Vol. 61, N 5. — P. 1308–1321.
10. Edwards R., Harding K. G. Bacteria and wound healing // Curr. Opin. Infect. Dis. — 2004. — N 17 (2). — P. 91–96.
11. Hurlow J., Bowler P. G. Clinical experience with wound biofilm and management: a case series // Ostomy Wound Manage. — 2009. — Vol. 55, N 4. — P. 38–49.
12. Kaehn K., Eberlein T. In-vitro test for comparing the efficacy of wound rinsing solutions // Br. J. Nurs. — 2009. — Vol. 18, N 11. — P. 4–10.
13. Vowden K. R., Vowden P. Wound debridement, Part 1: non-sharp techniques // J. Wound Care. — 1999. — Vol. 8, N 5. — P. 237–240.
14. Xavier J. B., Foster K. R. Cooperation and conflict in microbial biofilms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2007. — Vol. 104, N 3. — P. 876–881.
15. Ziebuhr W. et al. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen // Int. J. Antimicrob. Agents. — 2006. — Vol. 28, suppl. 1. — P. 14–20.

О. Н. Петренко¹, Б. Г. Безродный¹, О. Л. Бондарчук²

¹ Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Киев

² Киевская городская клиническая больница № 4

ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФЛЕГМОН МЯГКИХ ТКАНЕЙ ФОРМИРОВАТЬ БИОПЛЕНКИ

Цель работы — исследовать способность возбудителей флегмон мягких тканей формировать биопленки в послеоперационный период.

Материалы и методы. Изучено течение раневого процесса у 127 (85 мужчин и 42 женщин) пациентов с абсцессами и флегмонами мягких тканей разной локализации. Средний возраст больных ($52,4 \pm 4,6$) года. Всем пациентам проводили оперативное лечение (адекватное раскрытие и санацию гнойного очага с дренированием). В послеоперационный период осуществляли мониторинг общепринятых биологических показателей, изучали чувствительность микроорганизмов к антибактериальным препаратам, методом микроскопии исследовали образцы тканей с поверхности ран на предмет формирования биопленки.

Результаты и обсуждение. Установлено, что возбудителями гнойных процессов были грамотрицательные бактерии. В процессе заживления, начиная с 3-х суток послеоперационного периода, на поверхности ран формируются элементы биопленок. Обнаружена прямая корреляционная зависимость способности микроорганизмов образовывать биопленку от длительности заболевания. В случае уменьшения признаков воспаления и образования грануляций биопленки в ране не наблюдали.

Выводы. Микроорганизмы имеют свойство образовывать бактериальные пленки *in vitro* в течение 18–24 ч, что свидетельствует о способности штаммов микроорганизмов формировать агрессивное сообщество. Селекция наиболее жизнеспособных штаммов происходит на 3-и сутки после оперативного вмешательства. Она обнаружена в 5% наблюдений. Наличие биопленки является критерием хронизации раневого процесса, что необходимо учитывать в процессе лечения.

Ключевые слова: флегмона мягких тканей, биопленка, микроскопия.

О. М. Petrenko¹, В. G. Bezrodniy¹, O. L. Bondarchuk²

¹ O. O. Bogomolets National Medical University, Kyiv

² Kyiv City Clinical Hospital № 4

FORMATION OF BIOFILMS BY SOFT TISSUE PHLEGMON PATHOGENS

The aim — to study soft tissue's phlegmon pathogenes ability to form biofilms in postoperative period.

Materials and methods. A wound healing process in 127 patients (85 men and 42 women) with abscesses and phlegmon of the soft tissues of different localization was studied. The average age of the patients was 52.4 ± 4.6 years. All patients underwent surgical treatment — adequate intervention and sanitation of purulent focus with drainage. During postoperative period, screening of traditional biological parameters was conducted, the sensitivity of microorganisms to antibiotics and microscopically examined tissue samples from the surface of the wound for the formation of biofilms.

Results and discussion. It was found that the main agents that led to suppurate processes were Gram negative bacteria. During the healing process, starting from the 3rd day of postoperative period, biofilms elements began to form on the wound surface. A direct correlation was found between the ability of microorganisms to form biofilms and disease duration. At the same time with a reduction of the sings of inflammation and formation of granulation tissue, biofilms were not determined in wound.

Conclusions. Microorganisms tend to form *in vitro* bacterial film for 18–24 hours, evidence for the ability of microorganisms to form aggressive community. The selection of the most viable strains occurs on the 3rd day after surgery and was found in 5% of the studies. The presence of biofilm allows determining the trait as a criterion of chronic wound healing process, which must be considered in the treatment process.

Key words: purulent wounds, biofilms, microscopy.