

THE STUDYING OF THE EFFECT OF THE DRUGS WITH NANOPARTICLES UPON THE CAPACITY TO FORM BIOFILMS BY STRAINS *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

O.V. Pokas

SI "The L.V. Gromashevsky Institute of epidemiology and infectious diseases of NAMS of Ukraine"

The results of the investigation of the effect of the drugs with nanoparticles in various concentrations upon the capacity to form biofilms by strains *Pseudomonas aeruginosa* and the influence of the drugs upon the formed biofilm are presented.

Key words: biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, drugs with nanoparticles.

Рецензент: к.мед.н. І.В. Фільчаков

УДК: 616-002.36-036.5-095.001.4

О.И. Скаковская, Д.А. Степанский, Г.Н. Кременчуцкий, А.Л. Дроздов

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИСЕПТИКАМ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ФЛЕГМОНЫ КРЫС

Днепропетровская государственная медицинская академия

В работе дана сравнительная характеристика микробного пейзажа интактной кожи крыс и при развитии флегмоны, определялась чувствительность выделенных микроорганизмов к антисептикам. Показана значимая роль антисептиков в лечении гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей.

Ключевые слова: флегмона, микрофлора, антисептики.

Проблема хирургической инфекции на сегодняшний день является важной и актуальной. Гнойно-септические заболевания ежегодно поражают миллионы людей и в структуре смертности населения от инфекционной патологии занимают ведущее место во всех развитых странах мира, при этом отмечается неуклонный рост числа больных с флегмонами [4, 5].

Лечение гнойно-воспалительных заболеваний и, в частности флегмон, продолжает оставаться сложной и до конца не решенной проблемой. У лиц пожилого возраста, пациентов с иммунодефицитом, сопутствующей патологией (сахарный диабет, сосудистые заболевания и т.д.) гнойно-инфекционные заболевания, составляющие по данным разных авторов от 12% до 15% в структуре хирургических заболеваний, протекают более продолжительно и с осложнениями.

Высокая изменчивость микрофлоры, определяет ее приспособительные возможности к не-

благоприятным воздействиям внешней среды и действию антисептиков [1, 8, 9]. Традиционно для лечения и профилактики гнойно-воспалительных заболеваний бактериальной природы применяются антибиотики, однако рост резистентности микрофлоры активизирует поиск альтернативных методов борьбы с ней. Одним из возможных вариантов является использование антисептиков, спектр действия которых охватывает не только большинство грамположительных и грамотрицательных бактерий, но и грибы. Кроме того, антисептики можно считать реальным способом борьбы с госпитальными антибиотикорезистентными штаммами.

Цель исследования: определить чувствительность к антисептикам микроорганизмов-возбудителей флегмоны экспериментальных животных.

В задачи исследования входило:

1. Выявить возбудителей флегмоны в эксперименте.
2. Дать сравнительную характеристику микробного пейзажа интактной кожи крыс и очага экспериментальной флегмоны.
3. Определить чувствительность возбудителей флегмон к исследуемым антисептикам *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы исследования:

В исследовании задействовано 30 крыс линии Вистар. Крысы весом 200–250 грамм, самцы,

© О.И. Скаковская, Д.А. Степанский, Г.Н. Кременчуцкий, А.Л. Дроздов

содержались в стандартных условиях вивария Днепропетровской государственной медицинской академии. У всех животных флегмона вызывалась подкожным введением раствора формалина [2]. Определение микробного пейзажа интактной кожи крыс осуществлялось с помощью посевов на комплект питательных сред: кровяной агар (КА), желточно-солевой агар (ЖСА), агар ЭНДО и среду Сабуро. Чашки с посевами инкубировались при температуре 37°C в течение 48 часов. Дальнейшая идентификация проводилась по общепринятым методикам. [7]. Животные были разбиты на 5 групп по 6 животных в каждой:

- 1 — контроль, флегмона ничем не обрабатывалась;
- 2 — флегмона обрабатывалась стериллиумом;
- 3 — флегмона обрабатывалась фурациллином;
- 4 — флегмона обрабатывалась гембаром;
- 5 — флегмона обрабатывалась левомеколем.

Обработка антисептиками осуществлялась 2 раза в сутки в течение 7 дней. Левомеколь, хотя и не является антисептиком, был взят в исследование по причине широкого применения в клинике.

Выделение и идентификация возбудителей осуществлялись по общепринятым методикам [3, 7]. Эффективность исследуемых препаратов *in vitro* оценивали с помощью диффузионного метода по наличию зон задержки роста вокруг исследуемого препарата [6]. Стандартный инокулум (который соответствовал 0,5 по стандарту Мак-Фарланда, то есть содержал приблизительно $1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/см³) наносили пипеткой на поверхность чашки Петри с агаром Мюллера-Хинтона в объеме 1–2 см³, равномерно распределяли по поверхности покачиванием, избыток инокулума удаляли пипеткой. Подсушивали при комнатной температуре в течение 10–15 мин. С соблюдением стерильности делались лунки в агаре диаметром 5 мм, в которые закапывались исследуемые препараты — стериллиум, гембар, левомеколь — цельные и фурациллин 1:5000 (растворитель — изотонический раствор натрия хлорида) Результаты оценивали по диаметру зоны задержки роста микроорганизмов вокруг лунки.

Эффективность исследуемых препаратов *in vivo* оценивали по качественному и количественному составу микрофлоры, выделенной из очага флегмоны и визуальной оценке состояния флегмоны. Исследование микробного пейзажа интактной кожи крыс, взятых в эксперимент показало, что видовой состав интактной кожи крыс не однороден (*S. saprophyticus*, *E. coli*, плесневые

грибы). В 43,3% случаев отмечалось сочетанное присутствие данных микроорганизмов.

Результаты и их обсуждение:

Через неделю после моделирования (рис. 1), у всех животных в очаге флегмоны наблюдался рост *S. aureus*. Необходимо отметить, что *S. aureus* не были представлены в микробиоценозе кожи интактных крыс, а выделялись только из очага флегмоны. По нашему мнению данный микроорганизм мог попасть в рану из окружающей среды либо возможно из ротовой полости крыс при зализывании ран. Также в 13% в ассоциации со *S. aureus* были выделены *K. pneumoniae* и плесневые грибы. В большинстве случаев (80%) *S. aureus* был выделен в значительном количестве (10^7 – 10^8 КОЕ).

Выделенные из очага флегмоны изоляты тестировались на чувствительность к исследуемым антисептикам. Результаты представлены в таблице 1.

При зоне задержки роста микроба диаметром до 10 мм изолят расценивался как малочувствительный. Зона задержки роста микроба более 10 мм указывала на чувствительность изолята. Чем больше зона задержки роста, тем выше чувствительность микроорганизмов к антисептику. Наибольшую чувствительность *in vitro* *S. aureus* имел к левомеколю ($25 \pm 3,6$). Достаточно хорошую чувствительность *S. aureus* также проявлял к фурациллину и гембару (рис. 2).

K. pneumoniae была наиболее чувствительна к левомеколю. Плесневые грибы проявляли чувствительность только к стериллиуму и гембару.



Рисунок 1. Экспериментальная флегмона у крысы, вызванная введением формалина (7 день)

Таблица 1. Чувствительность возбудителей экспериментальной флегмоны к исследуемым антисептикам *in vitro*.

Вид микроорганизма	Зоны задержки роста в мм. М±м			
	Стериллиум	Фурациллин	Гембар	Левомеколь
<i>S. aureus</i> n=30	8,0±1,5	19,0±2,4	19,0±1,2	25,0±3,6
<i>K. pneumoniae</i> n=5	8,0±0,5	10±0,5	12±0,5	22±0,5
Плесневые грибы n=5	10,0±1,5	0	18±1,0	0



Рисунок 2. Чувствительность *S. aureus* к исследуемым антисептикам

Результаты оценки микробного пейзажа очага флегмоны, после обработки антисептиками (на 7-ой день) представлены в табл. 2.

Наилучшие результаты получены в группе, где флегмона обрабатывалась гембаром — на 7-ой день обработки не выделено ни одного микроорганизма. Относительно хорошие результаты получены в группах 2 и 3, где флегмона обрабатывалась стериллиумом и фурациллином 1:5000 соответственно. Во 2 группе выделен только *S. aureus* у

3 животных, а в третьей группе помимо *S. aureus* выделена *K. pneumoniae*, причем в ассоциации со *S. aureus*. В группе 5, где флегмона обрабатывалась левомеколем, в ассоциации со *S. aureus* выделены плесневые грибы и *C. albicans*. В контрольной группе у всех животных выделялся *S. aureus*, у 2 животных в ассоциации с плесневыми грибами.

В дальнейшем наблюдается тенденция к количественному снижению микроорганизмов вплоть до полной элиминации. Данная тенденция, по видимому, обусловлена активизацией защитных сил макроорганизма, а также бактерицидным действием слюны животных. Необходимо отметить, что заживление раны в контрольной группе проходило в 1,5–2 раза медленнее, чем в других группах.

Выводы

1. Показана гетерогенность видового состава микрофлоры интактной кожи белых крыс, участвовавших в эксперименте, которая представлена сапрофитными (*S. saprophyticus*) и условно-патогенными микроорганизмами (*E. coli*, плесневые грибы), что совпадает с данными литературы.

2. В ходе моделирования флегмоны менялся видовой состав кожи крыс, появлялись новые виды (*S. aureus*, *K. pneumoniae*).

Таблица 2. Состав микрофлоры, выделенной из раневого отделяемого после обработки антисептиками

Вид м/о	К-во изолятов, выделенных из очага флегмоны n=30														
	контроль			стериллиум			фурациллин			гембар			левомеколь		
	n=6			n=6			n=6			n=6			n=6		
	Абс. к-во	КОЕ	%	Абс. к-во	КОЕ	%	Абс. к-во	КОЕ	%	Абс. к-во	КОЕ	%	Абс. к-во	КОЕ	%
<i>S. aureus</i>	6	10 ⁷	100	3	10 ⁶ –10 ⁷	50	1	10 ⁷	17	–	–	–	4	10 ⁷	67
<i>K. pneumoniae</i>	–	–	–	–	–	–	1	50	17	–	–	–	–	–	–
Плесневые грибы	2	10 ⁴	33	–	–	–	–	–	–	–	–	–	2	10 ⁴	33
<i>C. albicans</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	1	10 ⁴	17

3. В 13% випадків з очога флегмони виділялись бактеріальні асоціації, представлені *S. aureus*, *K. pneumoniae* і пліснявими грибами.

4. Из гнійно-воспалительного очага часто микроорганизмы выделялись в значительном количестве (10^7 – 10^8), что может свидетельствовать о роли данного возбудителя в развитии флегмоны.

5. В группе, где животных обрабатывали гембаром, ни у одного животного микроорганизмов из раны не выделено. Также хорошую чувствительность к данному препарату показали все выделенные на этапе формирования флегмоны возбудители, в том числе и плесневые грибы.

6. Чувствительность *S. aureus* к левомеколю *in vitro* была наиболее высокой (в среднем 25 мм). Вместе с тем, в группе, где флегмону

обрабатывали левомеколем, у 4 животных из 6 выделен *S. aureus*, что может свидетельствовать о недостаточно эффективном воздействии препарата на этиологического агента *in vivo*. Это может быть обусловлено формированием устойчивости к препарату (ферментативной инактивацией левомицетина, снижение проницаемости внешних структур бактериальной клетки и т.д.). Кроме того, плесневые грибы были нечувствительны к левомеколю, а также во время обработки препаратом из очага выделилась *C. albicans*.

Перспектива дальнейших исследований. Результаты исследования подтверждают значимую роль антисептиков в местном лечении флегмон мягких тканей и подталкивают к поиску новых рациональных подходов к решению данной проблемы.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дудник Ю.В. Перспективы создания препаратов, активных в отношении устойчивых форм бактерий / Ю.В. Дудник // Антибиотики и химиотерапия. — 1999. — Т. 44 (№ 12). — С. 15–17.
2. Лабораторне животиные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. — 3-е изд., перераб. и доп. Киев: Вища школа. Головное изд-во, 1983. — 383 с.
3. Лабораторна діагностика гнійно-запальних захворювань, обумовлених аспорогенними анаеробними мікроорганізмами: Методичні рекомендації. — Харків, 2000. — 35 с.
4. Лечение раненых с огнестрельными переломами длинных трубчатых костей в ОВКГ с использованием плазменных потоков / В.И. Хрупкин [и др.] // Военно-медицинский журнал. — 1997. — № 10. — С. 75–77.
5. Миронов А.Ю. Видовой и количественные показатели микрофлоры при флегмонах челюстно-лицевой области / А.Ю. Миронов, Е.П. Пашков, Е.М. Черноглазова // Стоматология. — 1998. — № 5. — С. 42–43.
6. Наказ МОЗ України № 167 від 05.04.2007 р. про затвердження методичних вказівок "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів", МВ 9.9.5-143-2007.
7. Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 г. № 535 "Об унификации микробиологических методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактического учреждений".
8. Теория и практика местного лечения гнойных ран / под ред. Б.М. Даценко. Киев: Здоровье, 1995. — 384 с.
9. Яковлев С. Современные проблемы антибиотикорезистентности в стационаре / С. Яковлев // Врач. — 2007. — № 1. — С. 9–12.

ЧУТЛИВІСТЬ ЗБУДНИКІВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ФЛЕГМОНИ ЩУРІВ ДО АНТИСЕПТИКІВ

О.І. Скаковська, Д.О. Степанський, Г.М. Кременчуцький, О.Л. Дроздов
Дніпропетровська державна медична академія

Досліджувався мікробний пейзаж інтактної шкіри щурів і при розвитку експериментальної флегмони, визначалася чутливість до антисептиків, виділених мікроорганізмів. У роботі дана порівняльна характеристика мікробного пейзажу інтактної шкіри щурів і при розвитку флегмони. Показана значима роль антисептиків в лікуванні гнійно-запальних захворювань м'яких тканин.

Ключові слова: флегмона, мікрофлора, антисептики.

SENSITIVENESS OF EXCITERS OF EXPERIMENTAL PHLEGMON OF RATS TO THE ANTISEPTICS

O.I. Skakovskaya, D.O. Stepanyk, G.N. Kremenchutsky, A.L. Drozdov.
Dnepropetrovsk State Medical Academy

The microbial landscape of intact skin of rats was probed and at development of experimental phlegmon, a sensitiveness was determined to the antiseptics, selected microorganisms. Comparative description of microbial landscape of intact the skin of rats is in-process given and at the development of phlegmon. The meaningful role of antiseptics is rotined in treatment of the festering-inflammatory diseases of soft fabrics.

Key words: phlegmon, microflora, antiseptics.

Рецензент: д.м.н., професор О.І. Поліщук