

УДК 616.284-002.2-008.87

### ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ БІОПЛІВОК НА ПОВЕРХНІ ХОЛЕСТЕАТОМ ПРИ ХРОНІЧНИХ ГНІЙНИХ СЕРЕДНІХ ОТИТАХ

Могилівська<sup>1</sup> Н.М., Войцеховський<sup>2</sup> В.Г.,  
Сушко<sup>1</sup> Ю.О., Борисенко<sup>1</sup> О.М., Сребняк<sup>1</sup> І.А.

1 - ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України», Київ

2 - Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, Київ

В останні роки підвищився інтерес до такого важливого питання, як утворення мікробних біоплівки. Більшість дослідників вважають, що 99,9% бактерій ростуть не у вигляді вільно плаваючих клітин (планктону), а у вигляді біоплівки, що прикріплюються до будь-яких твердих поверхонь [1, 2]. Вперше біоплівки були описані Antonie van Leeuwenhoek, але теорія їх утворення з'явилася у 1978 році [3]. З того часу це явище активно вивчається та з'ясовується його значення. В різних органах організму людини можуть формуватися біоплівки із патогенних мікроорганізмів, що призводить до виникнення тієї чи іншої патології. Такі біоплівки можуть формуватися на слизовій шлунково-кишкового тракту, легенів, бронхів, ендотелії судин, в нирках, на клапанах серця та інших органах.

Визначено, що в різних частинах біоплівки бактерії мають різний ступінь активності – від активних до повільно ростучих та клітин у стані спокою. Клітини, що знаходяться в стані спокою, не культивуються та не чутливі до звичайної антибіотикотерапії [1, 4]. Матрикс, який оточує мікроорганізми у складі біоплівки, перешкоджає дії на бактерії неспецифічних факторів захисту організму та антитіл, ускладнює та уповільнює проникнення антибіотиків в середину біоплівки [5, 6].

Багато дослідників вказують на те, що бактеріальні біоплівки виявляються при хронічних гнійних середніх отитах (ХГСО), холестеатомах, хронічних тонзилітах, риносинуситах, інфекціях, асоційованих із штучними імплантатами. Але комплексні дослідження бактеріальних біоплівки з метою з'ясування їх значення при патології середнього вуха до теперішнього часу майже не проводились [7 - 14].

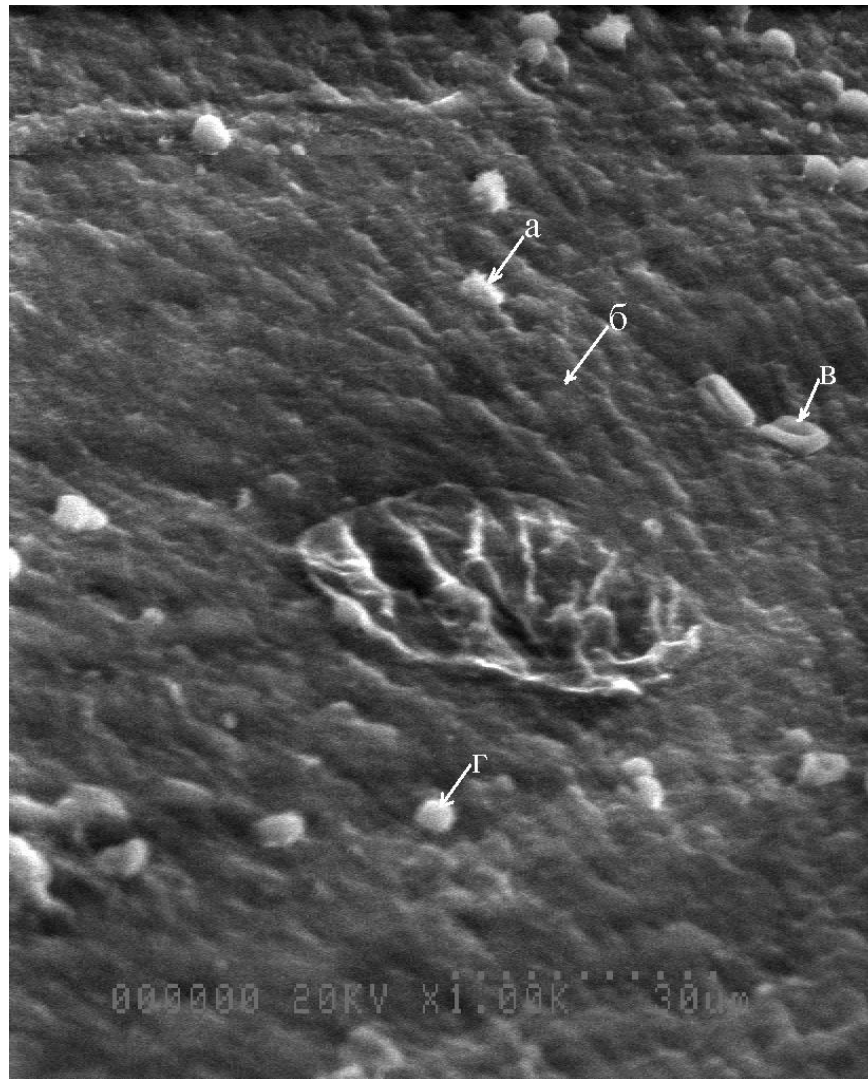
Для виявлення мікроорганізмів на поверхні інвазивних та інкапсульованих холестеатом, які видалялися під час оперативного втручання з приводу ХГСО, нами була використана методика растрової електронної мікроскопії, а також виділення мікроорганізмів із шматочків досліджуваного матеріалу (холестеатом) і ексудату порожнини середнього вуха. Всього було обстежено 15 зразків холестеатом, з яких 9 зразків - інкапсульованої форми, 6 зразків – інвазивної форми (табл. 1).

Таблиця 1. Результати виявлення мікроорганізмів із зразків різних форм холестеатоми

№ зразку	Форма холестеатоми	Результат посіву	
		холестеатоми	ексудату порожнини середнього вуха
1.	Інкапсульована	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
2.		<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
3.		<i>Staphylococcus aureus</i>	Росту не було
4.		Росту не було	Росту не було
5.		Росту не було	Росту не було
6.		Росту не було	Росту не було
7.		<i>Staphylococcus aureus</i>	Росту не було
8.		Росту не було	Росту не було
9.		<i>Micrococcus</i> spp. <i>Citrobacter</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp.
10.	Інвазивна	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Росту не було
11.		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Росту не було
12.		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Росту не було
13.		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
14.		<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
15.		Росту не було	Росту не було

При дослідженні зразка №1 інкапсульованої форми холестеатоми на її поверхні було виявлено щільну біоплівку, яка складалася з паличковидних

форм мікроорганізмів (рис. 1). При висіві шматочка тканини із даного зразка була виділена чиста культура *Pseudomonas aeruginosa*.



**Рис. 1.** Растрова електронна мікроскопія інкапсульованої форми холестеатоми (зразок №1). Збільшення –  $\times 1000$ , а – ехіноцит (еритроцит зміненої форми), б – біоплівка з паличковидних мікроорганізмів вкриває майже всю поверхню, в – еритроцит, г – лімфоцит (згладженого типу).

При висіві ексудату із порожнини середнього вуха у даного хворого також була виділена чиста культура *Pseudomonas aeruginosa*.

В результаті електронно-мікроскопічного дослідження зразка №2 інкапсульованої форми холестеатоми на її поверхні було виявлено паличковидні форми мікроорганізмів, які в одних місцях розташовувалися поодинокі та невеликими угрупованнями із 3 – 10 клітин, а в інших місцях утворювали також щільну біоплівку. Дослідження поверхні даного зразка при більших збільшеннях дозволило більш чітко побачити біоплівку. При висіванні мікроорганізмів із тканини холестеатоми зразка №2 була виділена чиста культура *Corynebacterium* spp. При висіві ексудату із порожнини середнього вуха у даного хворого була виділена чиста культура *Staphylococcus saprophyticus*.

Електронно-мікроскопічними дослідженнями зразків № 3 і № 7 інкапсульованої форми холестеатоми були виявлені скупчення мікроорганізмів коковидної форми, які розташовувались групами з 5 – 15 клітин. При висіванні мікроорганізмів із шматочків тканини зразків № 3 і № 7 були виділені чисті культури *Staphy-*

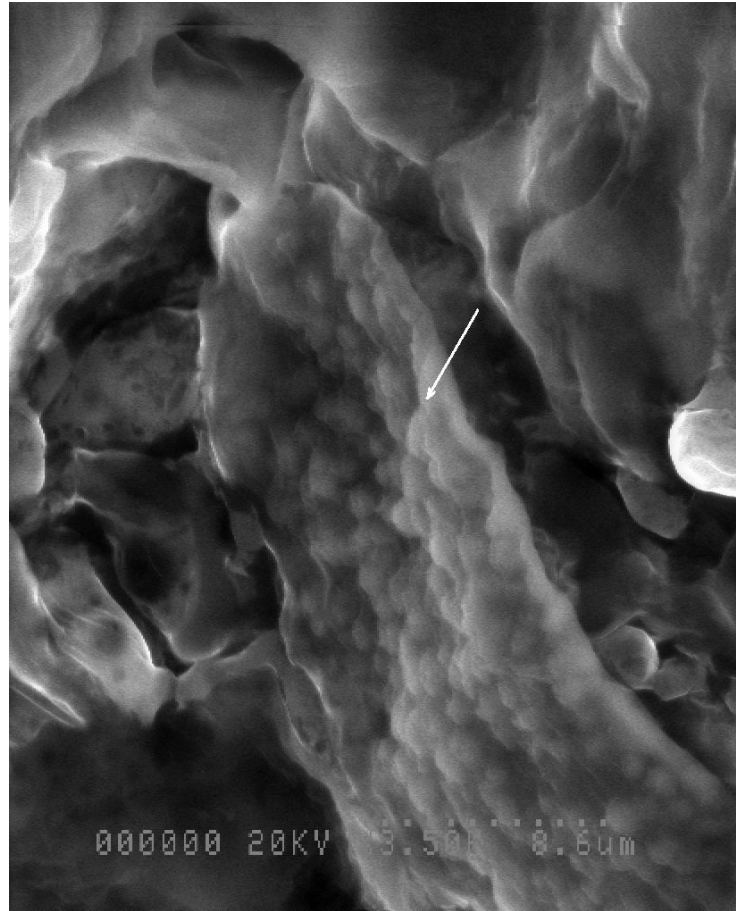
*lococcus aureus*. При посіві ексудату із порожнини середнього вуха у цих хворих мікроорганізми не виділялися.

В результаті електронно-мікроскопічних досліджень зразків № 4, № 5 і № 8 інкапсульованої форми холестеатоми, а також зразка № 15 інвазивної форми холестеатоми, мікроорганізмів на їх поверхнях, як у вигляді окремих скупчень або щільної біоплівки виявлено не було. При висіві мікроорганізмів із даних зразків, а також ексудату з порожнини середнього вуха у даних хворих, мікроорганізми також не виділялись.

Електронно-мікроскопічним дослідженням інкапсульованої форми холестеатоми зразка № 6 на поверхні слизової оболонки виявлена щільна біоплівка, яка складалась із паличковидних форм мікроорганізмів. При висіві мікроорганізмів із шматочка тканини зразка № 6, а також ексудату з порожнини середнього вуха у даного хворого, росту мікроорганізмів на поживних середовищах не спостерігали. Таким чином, хоча в зразку № 6 при електронно-мікроскопічному дослідженні було чітко видно щільну біоплівку, в жодному разі виділити чисту культуру бактерій не вдалося.

Електронно-мікроскопічним дослідженням інкапсульованої форми холестеатоми зразка № 9 були виявлені на поверхні слизової кокоподібні мікроорганізми. Висів шматочка тканини даного зразку виявив ріст *Micrococcus* spp. і *Citrobacter* spp. При посіві ексудату порожнини середнього вуха у даного хворого отримано ріст чистої культури *Citrobacter* spp.

При електронно-мікроскопічному дослідженні інвазивної форми холестеатоми зразка № 10 була чітко видна ділянка щільної біоплівки, яка складалася з кокоподібних мікроорганізмів, оточених біополімерним матриксом (рис. 2).



**Рис. 2.** Растрова електронна мікроскопія інвазивної форми холестеатоми (зразок № 10). Збільшення –  $\times 3500$ . Скупчення коковидних мікроорганізмів, вкритих матриксом (вказано стрілкою).

При висіві мікроорганізмів із шматочка тканини зразка № 10 виділена чиста культура *Staphylococcus epidermidis*. При висіві ексудату з порожнини середнього вуха у даного хворого виділити чисту культуру бактерій не вдалося.

В результаті електронно-мікроскопічного дослідження інвазивної форми холестеатоми зразка № 11 були виявлені в окремих місцях на поверхні слизової кокоподібні мікроорганізми. При висіві мікроорганізмів із шматочка тканини зразка № 11 виділена чиста культура *Staphylococcus epidermidis*. При висіві ексудату з порожнини середнього вуха у даного хворого виділити чисту культуру бактерій не вдалося.

При електронно-мікроскопічному дослідженні зразка № 12 інвазивної форми холестеатоми також були виявлені в окремих ділянках на її поверхні скупчення мікроорганізмів паличковидної форми. Щільні біоплівки знаходились на окремих ділянках. Поруч з ними можна було побачити мікроорганізми, які розташовувались окремими угрупованнями із кількох клітин. При

висіванні мікроорганізмів із шматочка тканини зразка № 12 була виділена чиста культура *Pseudomonas aeruginosa*. При посіві ексудату із порожнини середнього вуха мікроорганізми не виділялися.

При електронно-мікроскопічному дослідженні зразка № 13 і № 14 інвазивної форми холестеатоми на поверхні були виявлені в окремих ділянках скупчення мікроорганізмів паличковидної форми, які розташовувались групами із 3 – 10 клітин. При виділенні мікроорганізмів із шматочків тканини цих зразків отримано ріст *Escherichia coli* (зразок № 13) і *Enterobacter cloacae* (зразок № 14). При посіві ексудату порожнини середнього вуха у даних хворих отримано ріст *Staphylococcus epidermidis*.

Таким чином, утворення мікроорганізмами біоплівок в холестеатомах було виявлене в 73,3 % випадків. Співставлення бактеріологічних та електронно-мікроскопічних даних підтвердило гіпотезу, що бактеріальні біоплівки не виявляються стандартними культуральними методами. Цей факт повинен враховуватись хірургами, які при отриманні негативних результа-

тів бактеріологічних досліджень можуть вважати, що порожнина середнього вуха не містить мікроорганізмів, в той час, як мікроорганізми, утворивши щільну біоплівку і знаходячись в некультурабельному стані, можуть викликати запалення та необхідність антибактеріального лікування. Тому ми рекомендуємо проводити бактеріологічне дослідження холестеатом, видалених під час операцій, з метою покращення діагностики та призначення етіотропної антибіотикотерапії.

#### Литература

1. Цыганенко, А.Я. Межклеточная коммуникация у бактерий и перспективы создания на ее основе антибактериальных препаратов [Текст] / А.Я. Цыганенко, Н.И. Коваленко, С.И. Степаненко, В.Н. Васильченко. // X. : ХГМУ, 2004. – 31 с.
2. P'ina, T.S. Biofilms as a mode of existence of bacteria in external environment and host body: the phenomenon, genetic control, and regulation systems of development [Text] / T.S. P'ina, I.M. Romanova, A.L. Gintsburg // Genetika. – 2004. – Vol.40. – P. 1445–1456.
3. Donlan, R.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms [Text] / R.M. Donlan, J.W. Costerton // Clin Microbiol Rev. – 2002. – Vol.15. – P.167–193.
4. Волянський, Ю.Л. Некультурабельний стан (НС) аспорогенних бактерій: теоретичні аспекти і його практична значимість [Текст] / Ю.Л. Волянський [та ін.] // XII з'їзд Товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського: Тези доп. – Ужгород: ВАТ «Патент», 2009. – С. 167.
5. Stewart, P.S. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms [Text] / P.S. Stewart // Antimicrob. agents and chemoter. – 1996 – Vol.40, №11. – P.2517–2522.
6. Mukherjee, P.K. Candida biofilm resistance [Text] / P.K. Mukherjee, J. Chandra // Drug Resist Updat. – 2004. – Vol.7, №4-5. – P.301–309.
7. Chole, R.A. Evidence for microbial biofilms in cholesteatomas [Text] / R.A. Chole, B.T. Faddis // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. – 2002. – Vol.128. – P. 1129–1133.
8. Fergie, N. Is otitis media with effusion a biofilm infection [Text] / N. Fergie, R. Bayston, J.P. Pearson, J.P. Birchall // Clin Otolaryngol Allied Sci. – 2004 – Vol.29, №1. – P.38–46.
9. Wang, E.W. Otopathogenic Pseudomonas aeruginosa strains as competent biofilm formers [Text] / E.W. Wang [et al.] // Arch Otolaryngol Head Neck Surg. - 2005. – Vol.131, №11. – P. 983–989.
10. Lasa, I. Bacterial biofilm and infection [Text] / I. Lasa, J.L Del Pozo, J.R. Penades, J. Leiva // An Sist Sanit Navar. – 2005. – Vol.28, №2. – P. 163–175.
11. Sanclement, J.A. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis media [Text] / J.A. Sanclement, P. Webster, J. Thomas, H. Ramadan // Laryngoscope. – 2005. – Vol.115, №4. – P. 578–582.
12. Ramadan, H.H. Chronic rhinosinusitis and biofilms [Text] / H.H. Ramadan, J.A. Sanclement, J.G. Thomas // Otolaryngol Head Neck Surg. - 2005. – Vol.132, №3. – P. 414–417.

13. Mehta, A.J. Opening plugged tympanostomy tubes: effect of biofilm formation [Text] / A.J. Mehta, J.C. Lee, G.R. Stevens, P.J. Antonelli // Otolaryngol Head Neck Surg. – 2006. – Vol.134, №1. – P.121–125.

14. Vlastarakos, P.V. Biofilms in ear, nose and throat infections: how important are they? [Text] / P.V. Vlastarakos [et al.] // Laryngoscope. – 2007. – Vol.117, №4. – P. 668–673.

УДК 616.284-002.2-008.87

#### ОСОБЛИВОСТІ ФОРМУВАННЯ БАКТЕРІАЛЬНИХ БІОПЛІВОК НА ПОВЕРХНІ ХОЛЕСТЕАТОМ ПРИ ХРОНІЧНИХ ГНІЙНИХ СЕРЕДНІХ ОТИТАХ

Могилівська Н.М., Войцеховський В.Г., Сушко Ю.О., Борисенко О.М., Сребняк І.А.

В роботі представлені результати виявлення мікроорганізмів на поверхні холестеатом, а також з ексудату порожнини середнього вуха. Методом растрової електронної мікроскопії на поверхні холестеатом, які видалялися під час оперативного втручання, були виявлені бактеріальні біоплівки, а бактеріологічними дослідженнями виділені мікроорганізми різних видів (*Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus* spp., *Citrobacter* spp., *Corynebacterium* spp.). Співставлення бактеріологічних та електронно-мікроскопічних даних підтвердило гіпотезу, що бактеріальні біоплівки не виявляються стандартними культуральними методами. Необхідно проводити бактеріологічне дослідження холестеатом, видалених під час операцій, з метою покращення діагностики та призначення етіотропної антибіотикотерапії.  
**Ключові слова:** мікрофлора холестеатом, біоплівки, електронна мікроскопія.

УДК 616.284-002.2-008.87

#### ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ БИОПЛЕНОК НА ПОВЕРХНОСТИ ХОЛЕСТЕАТОМ ПРИ ХРОНИЧЕСКИХ ГНОЙНЫХ СРЕДНИХ ОТИТАХ

Могилевская Н.Н., Войцеховский В.Г., Сушко Ю.А., Борисенко О.Н., Сребняк И.А.

В работе представлены результаты выявления микроорганизмов на поверхности холестеатом, а также из экссудата полости среднего уха. Методом растровой электронной микроскопии на поверхности холестеатом, которые удалялись во время оперативного вмешательства, были обнаружены бактериальные биопленки, а бактериологическими исследованиями высеяны микроорганизмы различных видов (*S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *E. coli*, *E. cloacae*, *Micrococcus* spp., *Citrobacter* spp., *Corynebacterium* spp.). Сопоставление бактериологических и электронно-микроскопических данных подтвердило гипотезу о том, что биопленки не обнаруживаются стандартными культуральными методами. Необходимо проводить бактериологическое исследование холестеатом, удаленных во время операций, с целью улучшения диагностики и назначения этиотропной антибиотикотерапии.

**Ключевые слова:** микрофлора холестеатомы, биопленки, электронная микроскопия.

**УДК 616.284-002.2-008.87**

**FEATURES OF BACTERIAL BIOFILMS FORMING  
ON THE SURFACE OF CHOLESTETOMAS AT  
CHRONIC SUPPURATIVE OTITIS MEDIA**

**Mogylyvska N.M., Voytsehovskiy V.G., Soushko Yu O.,  
Borysenko O.M., Srebnnyak I.A.**

The results of detection of microorganisms on the surface of cholesteatomas and also from the exsudate of cavity of middle ear are presented in this work. By the method of raster electronic microscopy on the surface of cholesteatomas which removed during operations, had been found bacterial biofilms, and through bacteriological researches were isolated microorganisms of different species (*S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *E. coli*, *E. cloacae*, *Micrococcus* spp., *Citrobacter* spp., *Corynebacterium* spp.). Comparison of bacteriological and electronic microscopic data has confirmed a hypothesis that biofilms are not found by standard cultural methods. It is necessary to carry out bacteriological studies of cholesteatomas, removed during operations, for the purpose of improvement diagnostics and prescription etiotropic antibiotic therapy.

**Key words:** microflora of cholesteatoma, biofilms, electronic microscopy.