

Значение пленкообразующей способности культур стафилококков в выборе дренажного полимера и местных антисептиков при инфицированном панкреонекрозе

Ю.С.ВИННИК, О.В.ТЕПЛЯКОВА, О.В.ПЕРЬЯНОВА, Е.В.ОНЗУЛЬ, В.В.КОЗЛОВ

Significance of film-forming ability of Staphylococcus cultures in a choice of drainage polymer and local antiseptics in infected pancreonecrosis

Yu.S. VINNIK, O.V. TEPLYAKOVA, O.V. PERYANOVA, E.V. ONZUL, V.V. KOZLOV

Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого

В статье рассмотрены закономерности формирования биопленок культурами стафилококков, выделенных у больных инфицированным панкреонекрозом, на различных дренажных материалах *in vitro*. Выполнен сравнительный анализ эффективности бактерицидного воздействия различных антисептиков на планктонные и биопленочные формы метициллинрезистентных и чувствительных стафилококков. Установлено, что наиболее выраженной способностью к образованию биопленок на распространенных в практике дренажных полимерах обладают культуры метициллинрезистентного золотистого стафилококка. Показано, что бактерицидным эффектом в отношении сформированной биопленки обладают раствор мирамистина и газовая озono-кислородная смесь в концентрации 40 мг/л.
Ключевые слова: биопленка, стафилококки, инфицированный панкреонекроз

The conformity to natural laws of biofilms forming by Staphylococcus cultures, allocated from patients with infected pancreonecrosis, on various drainage materials *in vitro* are considered in the article. The comparative analysis of efficiency of bactericidal influence of various antiseptics on planktonic both biofilm forms of methicillin resistant and sensitive Staphylococcus aureus is made. It is established that MRSA cultures possess the most expressed ability to biofilms formation on the drainage polymers extended in practice. It is shown that bactericidal effect concerning the generated biofilm possess a miramistin solution and a gas ozono-oxygen mix in concentration of 40 mg/l.

Key words: biofilm, staphylococcus, infected pancreonecrosis

Несмотря на широкое распространение высоких технологий в современной хирургии, проблема хирургической инфекции относится к числу приоритетных [4, 7, 11]. Это обусловлено как частотой заболеваемости, достигающей 35-45% в общей структуре, так и существенными материальными затратами, связанными с потребностью в длительной госпитализации, повторных санационных хирургических вмешательствах, широком арсенале медикаментозного обеспечения.

Инфицированный панкреонекроз, являясь частным случаем распространенной интраабдоминальной инфекции, до сегодняшнего дня характеризуется неудовлетворительным прогнозом: летальность при этом заболевании составляет от 30 до 70% [1, 5, 6, 10]. В качестве первичного этиологического фактора, запускающего быстрое развитие генерализованной воспалительной реакции, при инфицированном панкреонекрозе наиболее часто выступает собственная условно-патогенная микрофлора желудочно-кишечного тракта [3, 5]. В последующем на фоне развивающейся иммуносупрессии и повторных оперативных вмешательств нередко происходит смена возбудителя с преобладанием госпитальных мультирезистентных к антибактериальной терапии штаммов микроорганизмов [3, 6, 7].

Ситуация усугубляется тем, что при лабораторной оценке эффективности антимикробного воздействия до настоящего времени все исследования выполняются на чистых культурах бактерий, выращенных в богатых питательными веществами средах в планктонном виде [3, 16, 17]. Такие условия далеки от реальных, в которых бактерии персистируют в организме тяжелых септических пациентов [7, 15, 18]. В настоящее время накоплен обширный экспериментально-клинический материал, свидетельствующий о том, что большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных средах существует в виде сообществ, окруженных железополисахаридным матриксом и функционирующих как скоординированный консорциум – микробная биопленка [8, 9, 13, 14, 15]. Для большинства бактерий состояние биопленки (биофильма) является базовым, выработанным в течение миллионов лет под влиянием естественного отбора в меняющихся экологических условиях [2, 8].

Целью исследования явилось изучение способности образования биопленок культурами стафилококков на различных полимерных материалах, используемых при дренировании очагов панкреатогенной инфекции, а также оценка эффективности местного антисептического воздействия *in vitro*.

В задачи исследования входило: 1) изучить особенности образования биопленок типовыми и клиническими штаммами стафилококков на различных дренажных полимерах: силиконе, латексе, поливинилхлориде (ПВХ); 2) изучить влияние антисептиков – пливасепта, мирамистина, лавасепта, озонированного физиологического раствора (ОФР) и озон-кислородной смеси (ОКС) на культуры стафилококков в составе биопленки.

Материалы и методы

Для исследования использовались типовые штаммы стафилококков: *Staphylococcus aureus* 209 P, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, а также шесть клинических штаммов метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA), выделенных у разных больных с инфицированным панкреонекрозом. Перечень дренажных материалов включал полимеры, наиболее часто применяемые в дренировании брюшной полости и забрюшинного пространства при панкреонекрозе: силикон, латекс, поливинилхлорид (ПВХ). В качестве тестируемых антисептических материалов использовались: 0,02% водный раствор хлоргексидина (пливасепт), водный раствор 10% миристамидопропилдиметил-бензиламония хлорида (мирамистин), 0,1% водный раствор лавасепта, озонированный физиологический раствор хлорида натрия в концентрации 8 мг/л, озон-кислородная смесь с концентрацией озона 40 мг/л. Озонсодержащие антисептики готовили ex tempore с помощью озонотерапевтической установки «УОТА 60-01» (ООО «Медозон», г. Москва).

Для изучения формирования биопленок исследуемые культуры пересеивались с кровяного агара на L-агар и термостатировались при температуре 37°C 24 часа. Полученные агаровые культуры забирались с L-агара стерильной петлей из трех точек и пересеивались в L-бульон, время культивирования составляло 24 часа. Полученные бульонные культуры разводили в соотношении 1/100. Из исследуемых дренажных материалов изготавливались диски диаметром 5 мм, которые после автоклавирования (в «сдающем» режиме 1 атм., 120°, 45 минут) помещали в стерильную 96-луночную полистироловую панель в трехкратной повторности. Бульонные культуры в разведение 1/100 вносили в лунки панели по 150 мкл. В качестве отрицательного контроля использовали стерильный L-бульон. Планшет закрывали крышкой и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Для удаления планктонных форм стафилококков сначала пипеткой удаляли бульонную культуру, внесенную в лунки, а затем отмывали трижды 1М раствором фосфатного буфера. Затем полистироловые панели, которые не обрабатывали кристаллвиолетом, помещали в ультразвуковую ванну с частотой 47 кГц на 10 минут (генератор «ULTRASONIC CLEANER»), что позволяло диспергировать микроорганизмы, которые адгезировались на поверхности дренажных материалов. Окрашивание образовавшихся биопленок осу-

ществляли 1% раствором кристаллвиолета, который вносили в лунки по 150 мкл, и инкубировали в течение 25 минут при комнатной температуре. Далее кристаллвиолет удаляли и лунки трехкратно промывали 1М фосфатным буфером. Для экстракции кристаллвиолета в каждую лунку добавляли по 200 мкл 96% этанола. Спиртовой раствор кристаллвиолета переносили в кювету и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре SOLAR - CM 2203 при длине волны 540 нм. Интенсивность окрашивания спирта соответствовала степени образования биопленок.

Изучение влияния антисептиков на исследуемые микроорганизмы в составе биопленок проводилось по следующей методике [12]. Рабочий раствор анализируемого антисептика смешивали с питательным бульоном в соотношении 1:4 и разливали в стерильные пробирки по 1 мл. В качестве контроля роста культур вместо определенного объема рабочего раствора антисептика вносили стерильную дистиллированную воду. Для заражения применяли бульонные культуры микроорганизмов, которые адгезировались на дренажных материалах. Для этого в опытную и контрольную пробирки вносили по 0,05 мл (1 капле) взвеси испытуемого штамма бактерий, стандартизированной по стандарту мутности 0,5 Мак Фарланда ($1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл). Пробирки инкубировали при 37°C в течение 48 часов. Учет и оценку результатов производили следующим образом: при наличии роста в контрольной пробирке и отсутствии роста в опытной пробирке культуру относили к чувствительной к изучаемому антисептику, а при наличии роста в обеих пробирках – к устойчивой. Результаты исследований обрабатывали на персональном компьютере с использованием пакета анализа Microsoft Excel 9.0, с помощью критериев Краскела-Уоллеса, Манна-Уитни в пакете STATISTICA 6.0 (StatSoft). Значения средних величин отображались как медиана и межквартильный диапазон: Me (P_{25} ; P_{75}).

Результаты и их обсуждение

Степень обсемененности поверхности полимеров клетками микроорганизмов в составе биопленки в 4-6 раз превысила аналогичный показатель роста планктонных клеток, что подтверждало воспроизводимость выбранной методики моделирования микробной биопленки.

При оценке степени образования биопленок на спектрофлуориметре SOLAR - CM 2203 (режим – фотометрия) культурами стафилококков выявлены следующие закономерности. В целом, штаммы MRSA обладали большей способностью к пленкообразованию на дренажных материалах по сравнению с метициллинчувствительными стафилококками (MSSA, табл. 1). Полученные результаты являются статистически значимыми, согласно критерию Колмагорова-Смирнова ($p=0,01$).

Культуры MRSA характеризовались примерно равной способностью к образованию биопленок на

Таблица 1

Интенсивность роста культур *Staphylococcus aureus* на дренажных полимерах

Культуры микроорганизмов	Оптическая плотность, (у.е.)			p по Колмогорову-Смирнову
	Me	P ₂₅	P ₇₅	
Метициллинчувствительные стафилококки (n=72)	1,853	1,186	2,263	p ₁₋₂ =0,01
Метициллинрезистентные стафилококки (n=72)	3,327	2,716	3,821	

Примечание: Me – медиана, P₂₅ – нижний перцентиль, P₇₅ – верхний перцентиль, n – количество исследуемых образцов, p – вероятность ошибки.

Таблица 2

Образование биопленок метициллинрезистентными стафилококками на дренажных полимерах

Анализируемый полимер	Биопленки MRSA, оптическая плотность, (у.е.)			p по Краскелу-Уолесу	p по Манну-Уитни
	Me	P ₂₅	P ₇₅		
Силикон (n=24)	3,302	2,675	3,558	p _{1-2,3} =0,08	p ₁₋₂ =0,053
Поливинилхлорид (n=24)	3,319	2,721	3,834		p ₁₋₃ =0,033
Латекс (n=24)	3,427	2,761	4,008		p ₂₋₃ =0,076

Примечание: Me – медиана, P₂₅ – нижний перцентиль, P₇₅ – верхний перцентиль, n – количество исследуемых образцов, p – вероятность ошибки.

Таблица 3

Образование биопленок метициллинчувствительными стафилококками на исследуемых дренажах

Группы наблюдения	Биопленки MSSA, оптическая плотность, (у.е.)			p по Краскелу-Уолесу	p по Манну-Уитни
	Me	P ₂₅	P ₇₅		
Силикон (n=24)	1,853	0,329	2,190	p _{1-2,3} =0,009	p ₁₋₂ =0,021
Поливинилхлорид (n=24)	2,306	2,063	2,654		p ₁₋₃ =0,004
Латекс (n=24)	3,598	2,963	3,759		p ₂₋₃ =0,043

Примечание: Me – медиана, P₂₅ – нижний перцентиль, P₇₅ – верхний перцентиль, n – количество исследуемых образцов, p – вероятность ошибки.

Таблица 4

Влияние антисептиков на биопленки и планктонные клетки, образованные культурами MRSA/MSSA

Исследуемые культуры	Исследуемые антисептики				
	ПС	ММ	ЛС: биопленка/ планктон	ОФР	ОКС
Staph. aureus ATCC 25923	+	-	+/-	+	-
Staph. aureus 209 P	+	-	+/-	+	-
MRSA 1	+	-	+	+	-
MRSA 2	+	-	+	+	-
MRSA 3	+	-	+	+	-
MRSA 4	+	-	+	+	-
MRSA 5	+	-	+	+	-
MRSA 6	+	-	+	+	-

Примечание: ПС – пливасепт, ММ – мирамистин, ЛС – лавасепт, ОФР – озонированный физиологический раствор, ОКС – озono-кислородная смесь, (-) – отсутствие роста, (+) – наличие роста, MRSA 1-6 – клинические культуры метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus*.

анализируемых полимерах (p_{1-2,3}=0,08, табл. 2). При парном сравнении степени образования биопленок на каждом из дренажей согласно критерию Манна-Уитни статистически значимых различий выявлено не было.

При исследовании культур MSSA перечень полимеров в порядке увеличения степени образования на них биопленок выглядел следующим образом: силикон, ПВХ, латекс (табл. 3). Преимущество силиконо-

вых дренажей в случае инфекции, вызванной MSSA, статистически значимо согласно критерию Краскела-Уолеса по сравнению с другими материалами ($p_{1-2,3}=0,009$).

Сравнивая попарно адгезивность данной культуры к силикону и поливинилхлориду установлено, что поливинилхлорид уступает силикону, что является статистически значимым ($p_{1,2}=0,021$, табл. 3). Аналогичная тенденция наблюдается при сравнении ПБХ и латекса ($p_{2,3}=0,043$). При попарном сравнении силиконового и латексного дренажей первый имеет статистически значимое преимущество ($p_{1,3}=0,004$).

При исследовании эффективности антисептического воздействия все культуры стафилококков: как планктонные, так и биопленочные формы, проявляли устойчивость к пливасепту и озонированному физиологическому раствору в концентрации 8 мг/л и чувствительность к мирамистину. MSSA были чувствительны к лавасепту только в планктонной форме, а в составе биопленки – устойчивы. MRSA сохраняли устойчивость к лавасепту во всех формах (табл. 4). Все тестируемые культуры стафилококков проявляли чувствительность к обработке озono-кислородной смесью в течение 5 минут при концентрации 40 мг/л., т. е. че-

рез 24 часа термостатирования рост в опытных пробирках отсутствовал при его наличии в контрольных.

Выводы

1. Культуры MRSA характеризуются статистически более выраженной адгезивной способностью по сравнению с типовыми метициллинчувствительными штаммами стафилококков. Анализ пленкообразующей способности MRSA свидетельствует о равной высокой вероятности образования биопленки на таких распространенных в практике дренажных полимерах, как поливинилхлорид, силикон и латекс.

2. Среди анализируемых антисептиков бактерицидным эффектом в отношении биопленки, сформированной штаммами MRSA, обладают лишь раствор мирамистина и озono-кислородная смесь в концентрации 40 мг/л. Растворы пливасепта и озонированного физиологического раствора в концентрации 8 мг/л не оказывают бактерицидного действия на культуры стафилококков, вне зависимости от их чувствительности к метициллину и формы существования. Антисептическое действие лавасепта реализуется только на планктонные клетки метициллинчувствительных стафилококков.

Список литературы

1. Буткевич А.Ц., Чадаев А.П., Лапин А.Ю. Открытые дренажные операции в хирургическом лечении распространенного инфицированного панкреонекроза. М.: Граница 2007; 390.
2. Бухарин О.В. и др. Влияние микробных метаболитов на активность каталазы и рост *S.aureus*. Бюл. exper. биол. и мед. 2000; 7: 80-82.
3. Габриэлян Р.И., Горская Е.М., Снегова Н.Д. Функции микрофлоры желудочно-кишечного тракта и последствия её нарушения после хирургических вмешательств. Антибиотики и химиотерапия 2000; 45: 9: 24-29.
4. Гальперин Э.И., Дюжева Т.Т., Докучаев К.В. и др. Диагностика и хирургическое лечение панкреонекроза. Хирургия 2003; 3: 55-59.
5. Гальперин Э.И., Докучаев К.В., Погосян Г.С. и др. Панкрео- и пара-панкреонекроз: когда оперировать и что делать? Тез. 9-го Всеросс. съезда хирургов. Волгоград 2000; 31.
6. Гельфанд Б.Р., Бурневич С.З., Цыденжапов Е.Ц. и др. Тактика антибактериальной профилактики и терапии при панкреонекрозе. Материалы 9-го Всерос. съезда хирургов. Волгоград 2000; 33-34.
7. Ерюхин И.А. Хирургические инфекции: новый уровень познания и новые проблемы. Инфекции в хирургии 2003; 1: 1: 2-7.
8. Кузнецов О.Ю. Бактериальная колония как сложное организованное сообщество клеток. Журнал микробиология 2005; 2: 3-7.
9. Мельников В.Г. Поверхностные структуры грампозитивных бактерий в межклеточном взаимодействии и пленкообразовании. Журнал микробиология 2010; 2: 119-123.
10. Миронов П.И., Лутфарахманов И.И., Медведев О.И., Тимербулатов В.М. Персистентная органная дисфункция – маркер госпитальной летальности у больных с тяжелым острым панкреатитом. Анналы хирургии 2008; 1: 42-46.
11. Ермолов А.С., Иванов П.А., Гришин А.В. и др. Острый панкреатит: Метод. рекомендации. М.: 2003; 30.
12. Чельшьева Г.М., Шулыгина Т.Н. Модификации метода определения чувствительности микроорганизмов к антисептикам на примере фурацилина. Материалы 75-научно-практической конференции. Новокузнецк 2008; 1: 42-46.
13. Stoodley P. et al. Biofilms as complex differentiated communities. Annu. Rev. Microbiol. 2002; 56: 187-209.
14. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol. Mol. Biol. Reviews. 2000; 64: 847-867.
15. Donlan R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg. Infect. Diseases 2002; 8: 381-390.
16. Harriott M.M., M.C. Noverr Candida albicans and Staphylococcus aureus Form Polymicrobial Biofilms: Effects on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009; 53: 3914-3922.
17. O'Toole G.A., Kaplan H., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 2005; 54: 49-79.
18. O'Toole G.A. To build a biofilm. J. Bacteriol. 2003; 185: 2687-2689.

Поступила 17.04.2011 г.

Информация об авторах

1. Винник Юрий Семенович – д.м.н., проф., заведующий кафедрой общей хирургии Красноярского государственного медицинского университета им. В.Ф.Войно-Ясенецкого, заслуженный деятель науки РФ, заслуженный врач РФ; e-mail: yuvinnik@yandex.ru
2. Теплякова Ольга Валериевна – к.м.н., доц. кафедры общей хирургии Красноярского государственного медицинского университета им. В.Ф.Войно-Ясенецкого; e-mail: yuvinnik@yandex.ru
3. Перьянова Ольга Владимировна – к.б.н., доц. кафедры микробиологии им. Б.М. Зельмановича Красноярского государственного медицинского университета им. В.Ф.Войно-Ясенецкого; e-mail: yuvinnik@yandex.ru
4. Онзуль Екатерина Викторовна – клинический ординатор кафедры общей хирургии Красноярского государственного медицинского университета им. В.Ф.Войно-Ясенецкого; e-mail: yuvinnik@yandex.ru
5. Козлов Василий Владимирович – к.м.н., доцент кафедры общественного здоровья и здравоохранения с курсом ПО Красноярского государственного медицинского университета им. профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого; e-mail: yuvinnik@yandex.ru