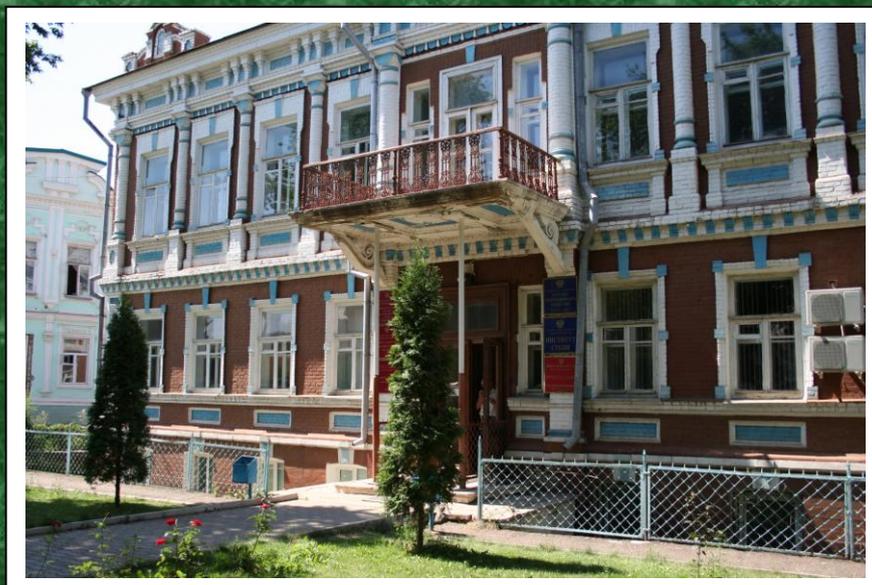


ISSN 2304-

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2012 * № 3

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2012

УДК 579.61

Л.П. Потехина, О.Л. Карташова, Т.М. Уткина, И.В. Валышева

ТАКСОНОМИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА МИКРОФЛОРЫ, КОЛОНИЗИРУЮЩЕЙ ВЕНОЗНЫЕ ТРОФИЧЕСКИЕ ЯЗВЫ И ЕЕ ПЕРСИСТЕНТНЫЕ СВОЙСТВА

Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, Россия

Цель. Изучение микробного пейзажа, персистентных свойств микрофлоры венозных трофических язв нижних конечностей с оценкой их диагностической значимости и определения биомишеней для отбора лекарственных препаратов.

Материалы и методы. Проведено клинико-бактериологическое обследование 58 больных с трофическими язвами нижних конечностей венозной этиологии в возрасте от 37 до 80 лет. Выделены и идентифицированы микроорганизмы, определены антилизозимная, антикомплементарная и антикарнозиновая активности.

Результаты. Установлено ведущее значение микроорганизмов рода *Staphylococcus* (56,8%) с доминирующим положением, как в монокультуре, так и в ассоциациях штаммов *S. aureus*. Анализ персистентных свойств микрофлоры, выделенной при различных вариантах течения заболевания, определил их роль при затяжном течении процесса.

Заключение. Изученные факторы персистенции могут быть использованы в качестве биомишеней при отборе лекарственных препаратов, пригодных для эффективной борьбы с персистирующими патогенными микроорганизмами при венозно-трофических язвах нижних конечностей.

Ключевые слова: венозно-трофические язвы нижних конечностей, видовой состав микроорганизмов, персистентные свойства микрофлоры

L.P. Potekhina, O.L. Kartashova, T.M. Utkina, I.V. Valysheva

TAXONOMICAL STRUCTURE OF MICROFLORA COLONIZING VENOUS TROPHIC ULCERS AND THEIR PERSISTENT PROPERTIES

Institute of cellular and intracellular symbiosis UrB RAS, Orenburg, Russia

Objective. Studying of a microbic landscape, persistent properties of microflora of venous trophic ulcers of legs with evaluation of their diagnostic importance and definition of biotargets for selection of medicines.

Materials and methods. Clinic-bacteriological survey of 58 patients with trophic ulcers of legs of a venous etiology at the age from 37 till 80 years is conducted. Microorganisms are allocated and identified, antilysozyme, anticomplement and anticarnosine activities are defined.

Results. Leading value of *Staphylococcus spp.* (56,8 %) with a leading position, both in a monoculture, and in associations of *S. aureus* strains is established. The analysis of persistent properties of the microflora allocated at various options of a course of a disease defined their role at the long current of process.

Conclusion. The studied factors of a persistence can be used as biotargets at selection of the medicines suitable for effective fight against persistent pathogens at venous and trophic ulcers of legs.

Keywords: venous and trophic ulcers of legs, species structure of microorganisms, persistent properties of microflora

Введение.

Заболевания вен, составляющие основную причину развития язв, чрезвычайно широко распространены [7,11]. Важный вклад в характер в течения венозных трофических язв нижних конечностей вносят микроорганизмы [10].

В последние годы при гнойной патологии различной локализации изучаются персистентные свойства микроорганизмов [3], от выраженности которых зависит скорость элиминации последних из очага воспаления [1] и прогноз течения заболевания [5,6]. Однако, эти характеристики микрофлоры, колонизирующей трофические язвы нижних конечностей, не изучены. Известно, что персистентный потенциал микроорганизмов влияет на длительность их переживания в макроорганизме, а подавление персистентного потенциала лекарственными препаратами позволяет значительно расширить их круг [4].

В связи с вышеизложенным целью нашего исследования явилось изучение микробного пейзажа, персистентных свойств микрофлоры венозных трофических язв нижних конечностей с оценкой их диагностической значимости и определения биомишеней для отбора лекарственных препаратов.

Материалы и методы.

Под наблюдением на лечении в НУЗ «Отделенческая клиническая больница на станции Оренбург ОАО «РЖД» (исследования выполнены совместно с хирургом больницы к.м.н. Гандыбиным Е.А.) находились 58 больных с трофическими язвами нижних конечностей венозной этиологии в возрасте от 37 до 80 лет. У всех пациентов было проведено бактериологическое исследование. Выделение аэробных микроорганизмов осуществляли на 5% кровяном агаре, аэробных - Schaedler-агаре (BD MS, США). Для выявления анаэробных микроорганизмов исследуемый материал доставляли в специальных vacutainer Gas Pak (Becton Dickinson Microbiology Systems, США) и создавали дополнительные условия с помощью газогенераторных пакетов «Gas Pak Anaerobic System» (BDMS, США) в анаэробной камере «Gas Pak» (BDMS, США). Выделенные микроорганизмы идентифицировали до вида с использованием тест-систем «Lachema» (Чехия) и изучали на наличие факторов персистенции: антилизоз-

цимной (АЛА), антикарнозиновой (АКРА), антикомплементарной активностей (АКА) [3].

Достоверность полученных различий оценивали с помощью критерия Стьюдента [2].

Результаты.

При изучении видового состава микрофлоры, колонизирующей венозно-трофические язвы нижних конечностей, было установлено, что в 30% случаев возбудители выделялись в монокультуре, в 57,5% - в ассоциациях, а в 12,5% - роста микроорганизмов отмечено не было. Всего было выделено и идентифицировано 95 штаммов. Видовой состав возбудителей трофических язв нижних конечностей характеризовался разнообразием (табл. 1).

Таблица 1. Видовой состав микрофлоры, колонизирующей трофические язвы нижних конечностей венозной этиологии

Род/Вид микроорганизмов	Доля среди изолятов микроорганизмов (%)
<i>Staphylococcus sp.</i>, в том числе:	56,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	35,7
<i>S. epidermidis</i>	8,3
<i>S. warneri</i>	3,2
<i>S. auricularis</i>	1,1
<i>S. capitis</i>	3,2
<i>S. schleiferi</i>	1,1
<i>S. simulans</i>	1,1
<i>S. xylosus</i>	3,1
<i>Enterobacteriaceae sp.</i>, в том числе:	16,1
<i>Klebsiella ozaenae</i>	5,2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,1
<i>Enterobacter spp.</i>	2,1
<i>Enterobacter sakazakii</i>	1,1
<i>Serratia marcescens</i>	1,1
<i>Serratia ficaria</i>	1,2
<i>Citrobacter koseri</i>	1,1
Иные микроорганизмы, в том числе:	27,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6,2
<i>Pseudomonas spp.</i>	5,1
<i>Candida albicans</i>	2,1
<i>Candida spp.</i>	2,1
<i>Bifidobacterium denti</i>	1,1
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1,1

<i>S. pyogenes</i>	3,2
<i>S. gordonii</i>	2,1
<i>Enterococcus spp.</i>	4,1
Всего	100

Из таблицы видно, что из язвы чаще выделялись стафилококки (56,8%), преимущественно *S. aureus* (35,7%), и энтеробактерии (16,1%), в том числе *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* и др.; реже встречались неферментирующие бактерии, представленные *Pseudomonas spp.* (11,3%), грибы рода *Candida* (4,2%), *Streptococcus spp.* (5,3%) и *Enterococcus spp.* (4,1%).

В 2,2% случаев (у двух пациентов) была выделена анаэробная флора: *B. dentium* в монокультуре; *P. anaerobius* в ассоциации с *C. albicans*, *S. epidermidis*, *S. capitis*.

Аэробная микрофлора в монокультуре была представлена *S. aureus* (57,1%), *S. epidermidis* (9,6%), *S. capitis* (9,6%), *S. marcescens*, *S. gordonii*, *Enterococcus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* (по 4,8%).

В ассоциациях в 81,5% случаев доминировал золотистый стафилококк, который по 11,1% выделяли совместно с представителями рода *Klebsiella* (*K. oxytoca*, *K. ozaenae*) и псевдомонадами, а также с *S. haemolyticus*, *Candida sp.*, *S. epidermidis* и энтеробактериями (по 3,7%). Отмечены также ассоциации *P. aeruginosa* с *S. schleiferi* или с *Klebsiella oxytoca* (по 3,7%); *S. auricularis* с *Enterobacter sakazakii* (3,7%).

Кроме того, золотистый стафилококк выделяли в ассоциации с эпидермальным стафилококком и энтерококками, *S. warneri* и *S. xylosum* (по 7,4%), а также с *S. pyogenes* и грибами *Candida albicans*, *S. pyogenes* и *S. warneri*, *S. simulans* и *Klebsiella oxytoca*, с *S. epidermidis* и *P. aeruginosa* (по 3,7%). Отмечена также ассоциация *S. epidermidis* с *P. aeruginosa* и *Enterobacter sp.* (3,7%).

Ассоциации из четырех микроорганизмов были представлены *S. aureus* с *S. xylosum*, *Serratia ficaria*, *Citrobacter koseri* (3,7%), *S. aureus* с *P. aeruginosa*, *Enterococcus sp.*, *Klebsiella ozaenae* (3,7%), *S. epidermidis*, *S. capitis*, *Candida albicans*, *Peptostreptococcus anaerobius* (3,7%) и золотистым стафилококком с клебсиеллами (3,7%), из пяти – *S. aureus* с *Candida albicans*, *P. aeruginosa*, *S. gordonii* и *Pseudomonas sp.* (3,7%).

Нами проанализированы видовые составы микроорганизмов в зависимости от характера заболевания. При затяжном течении заболевания микроорга-

низмы в ассоциациях выделяли в 78,5% , в монокультуре – в 21,5% случаев, при обычном течении в 50% - в монокультуре и в 50% - в ассоциациях.

При затяжном течении заболевания из общего числа выделенных штаммов 28,6% составил *S. aureus*, который в 12,5% выделяли в монокультуре и в 87,5% в ассоциации; аналогичные данные получены и по коагулазоотрицательным стафилококкам (КОС); энтеробактерии выделяли в 10,7% случаев (в 33,3% в монокультуре и в 66,7% в ассоциациях); только в ассоциациях с другими микроорганизмами были выделены: *P. aeruginosa* – в 14,4%, *C. albicans* – в 7,1%, энтерококки -7,1%, стрептококки – в 3,5% случаев.

При обычном течении заболевания наиболее значимым также был *S. aureus* (45,5%), который выделяли в монокультуре в 40% случаев и в 60% в ассоциациях; КОС высевали в 31,8% случаев (в 42,9% в монокультуре и 57,1% в ассоциациях). Энтеробактерии (в 13,6%) и *C. albicans* (в 9,1%) выделяли только в ассоциации с другими микроорганизмами.

Далее проведен сравнительный анализ распространенности и выраженности изученных персистентных свойств у штаммов, выделенных от больных с затяжным (1 группа) и обычным (2 группа) течением заболевания.

При этом установлено, что у микроорганизмов, выделенных от больных 1 группы, АЛА обнаруживалась у 80% штаммов *S. aureus* и у всех изолятов КОС и энтеробактерий, тогда как у микроорганизмов, выделенных от больных 2 группы в 62%, 85% и 76% случаях соответственно; АКА - *S. aureus* (90%) и *C. albicans* (100%); АКрА в 100% случаев у КОС и энтеробактерий. У *S. aureus*, выделенных от больных 2 группы, АКрА выявляли в 95% случаев, АКА у КОС в 100% и АЛА у *C. albicans* в 100%, тогда как у микроорганизмов, выделенных от больных 1 группы в 93%, 89% и 50% случаях соответственно.

На следующем этапе работы у всех выделенных штаммов микроорганизмов оценивали уровень выраженности персистентных характеристик. Изучение АЛА у микроорганизмов разных видов показало, что выраженность признака у штаммов *S. aureus*, грибов рода *Candida*, КОС, выделенных от больных 1 группы, достоверно выше в сравнении со штаммами, выделенными от больных 2 группы ($p < 0,05$), и лишь энтеробактерии, выделенные у больных разных групп, не отличались по выраженности признака. Выраженность АКА и АКрА у штаммов, выделенных от больных 1 группы, была в 1,6 раз выше по сравнению с микроорганизмами, выделенными от больных 2 группы ($p < 0,05$).

Таким образом, установлено, что микроорганизмы, колонизирующие венозные трофические язвы нижних конечностей, характеризуются способностью к инактивации факторов естественной резистентности макроорганизма. Показано, что микроорганизмы с высокими значениями факторов персистенции высеваются от больных с затяжным течением заболевания.

Заключение.

Изучение микрофлоры, колонизирующей венозно-трофические язвы нижних конечностей, выявило ведущее значение микроорганизмов рода *Staphylococcus* (56,8%) при более низкой частоте выделения энтеробактерий, ферментирующих бактерий, грибов рода *Candida*, стрептококков, энтерококков. Доминирующее положение, как в монокультуре, так и в ассоциациях занимали штаммы *S. aureus*.

Результатом проведенных исследований явился анализ персистентных свойств микрофлоры, выделенной при различных вариантах течения заболевания. Установлена роль антилизоцимной, антикомплементарной и антикарнозиновой активностей в определении длительности течения венозных трофических язв нижних конечностей: выраженность персистентных признаков у микроорганизмов, выделенных из трофических язв пациентов с затяжным течением заболевания, как правило, была выше, чем у изолятов, выделенных при обычном течении процесса. Подобная закономерность наблюдалась и при других видах инфекционно-воспалительной патологии [1, 5, 6].

Известно, что подавление лекарственными препаратами персистентных свойств возбудителя затрудняет его паразитирование внутри клеток и, тем самым, повышает эффективность лекарственных воздействий [4, 7, 9].

Использование изученных факторов персистенции в качестве биомаркера позволит отбирать лекарственные препараты, пригодные для эффективной борьбы с патогенными микроорганизмами, персистирующими в венозно-трофических язвах нижних конечностей.

(Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований УрО РАН, проект № 12-С-4-1022 «Регуляция биологических свойств микроорганизмов растительными экстрактами как основа разработки антибактериальных средств»)

Литература.

1. Абрамзон О.М., Елагина Н.Н., Карташова О.Л. и др. Характеристика микрофлоры, выделенной при острых воспалительных заболеваниях легких и плевры // Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2003 № 4. С. 44-47.

2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л., 1962. 180 с.
3. Бухарин О.В. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина, 1999. 366 с.
4. Бухарин О.В., Челпаченко О.Е., Усвяцов Б.Я. Влияние лекарственных растений на антилизоцимную активность микроорганизмов // Антибиотики и химиотерапия. 2003. № 5. С. 11-14.
5. Гавриленко В.Г., Фадеев С.Б., Бухарин О.В. и др. Микробиологические особенности течения гнойно-воспалительных процессов мягких тканей у больных сахарным диабетом // Вестник хирургии. 2001. № 6. С. 39-41.
6. Глазева С.А. Клинические варианты течения рожи и характеристики возбудителей осложненных и неосложненных ее форм // Вестник Оренбургского государственного университета. 2006. № 13. С. 122-122.
7. Журавлёва О.В. Системное и местное лечение трофических язв венозной этиологии: Автореф. ... канд. мед. наук. Москва, 2004. 22 с.
8. Кириллов Д.А. Лекарственная регуляция персистентных свойств микроорганизмов: Автореф. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2004. 22 с.
9. Тарасевич А.В. Регуляция антилизоцимной активности энтеробактерий эндогенными факторами желудочно-кишечного тракта и разработка рациональных подходов к диагностике и коррекции дисбиоза кишечника: Автореф. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2004. 20 с.
10. Шубин Л.Л., Дёгтева Г.К. Микробная флора язв у больных хроническими язвенными пиодермиями нижних конечностей // Нижегородский медицинский журнал. 1996. № 5. С. 55-57.
11. Эмиров Г.Н. Комплексное лечение венозно-трофических язв нижних конечностей с использованием средства «некрацидолизин»: Автореф. ... канд. мед. наук. Ростов-на-Дону, 2004. 22 с.

(Контактная информация: Потехина Лидия Петровна – к.м.н., старший научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, 460014 г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел. 8 (3532) 774463, e-mail: labpersist@mail.ru)