

*Т. Н. Лептеева*

**СПОСОБНОСТЬ СЫВОРОТОК КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С ТЯЖЕЛЫМИ  
ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ПОРАЖЕНИЯМИ ЛЕГКИХ К  
РАЗРУШЕНИЮ ЭКЗОПОЛИМЕРНОГО МАТРИКСА БИОПЛЕНКИ *S.*  
*AUREUS***

*Научный руководитель канд. мед. наук, доц. С. А. Сенькович, канд. мед.  
наук, доц. Е. В. Никитина*

*Кафедра клинической микробиологии, кафедра анестезиологии и реаниматологии*

*УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск*

**Резюме.** Определение способности сывороток крови пациентов с гнойно-воспалительными процессами и доноров к разрушению экзополимерного матрикса биопленки *S. aureus* и анализ уровня активности от тяжести гнойно-воспалительного процесса.

**Ключевые слова:** биопленка, экзополимерный матрикс, гнойно-воспалительные поражения легких.

**Summary.** To determine the ability of sera taken from patients with acute purulent inflammatory lung disorders and healthy donors to disrupt *S. aureus* biofilm`s matrix followed by the comparison of the levels of serum activity with the severity of inflammatory process.

**Keywords:** biofilm, exopolymeric matrix, inflammatory lung diseases.

**Актуальность.** Тяжелые гнойно-воспалительные поражения легких, требующие интенсивной терапии в реанимационных отделениях, по-прежнему остаются актуальной проблемой здравоохранения. В лечении пациентов данного профиля применение антибактериальной терапии играет важную роль, однако повсеместное использование антибиотиков и антисептиков способствует селекции резистентной флоры [1,2]. Поэтому в последнее время изучению защитных механизмов микроорганизмов придется большое значение. К настоящему времени показана способность большинства бактерий к формированию биопленки, в составе которой бактериальные клетки значительно устойчивей к неблагоприятным воздействиям, в том числе факторам системы иммунитета [3]. Важную роль в обеспечении устойчивости микроорганизмов в составе биопленки играет экзополимерный матрикс. Низкая способность к разрушению экзополимерного матрикса биопленки может явиться предрасполагающим фактором развития гнойно-воспалительных процессов.

**Цель:** Оценить способность сывороток крови пациентов с тяжелыми гнойно-воспалительными поражениями легких к разрушению экзополимерного матрикса биопленки *S. aureus*. в сравнении с сыворотками пациентов с гнойно-воспалительными процессами другой локализации.

**Материалы и методы исследования.** Кровь забиралась у пациентов натошак с 8 до 9 часов утра из локтевой вены, центрифугировалась со скоростью 2000 оборотов в минуту в течение 10 минут; сыворотка отбиралась, замораживалась в жидком азоте и хранилась при  $-25^{\circ}\text{C}$ . Были исследованы сыворотки крови 46 лиц с различными гнойно-воспалительными процессами, находившихся на лечении в Витебской областной больнице: 10 пациентов с тяжелыми гнойно-воспалительными поражениями легких, потребовавшими интенсивной терапии в реанимационном отделении; 10 – с локальными процессами (панариции, фурункулы); 13 – с хроническими гнойно-воспалительными заболеваниями (трофические язвы нижних конечностей, хронический фурункулез); 13 – с распространенными гнойно-воспалительными процессами (флегмоны мягких тканей различной локализации). Контрольную группу составили 12 лиц без гнойно-воспалительных процессов.

Для получения биопленок использовали музейный штамм *Staphylococcus aureus* (АТСС 6538). В стерильную чашку Петри с агаром Мюллера – Хинтона помещали стерильную инертную полимерную мембрану, прижимали стеклянным грузом и вносили 0,5 мл взвеси *S. aureus* в концентрации  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл и 5 мл 0,9% NaCl. Чашку Петри инкубировали в течение 3 суток при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . Мембрану извлекали из чашки Петри, биопленку с мембраны смывали стерильным физиологическим раствором. К полученной суспензии добавляли в избытке 0,5% раствор конго красного. Суспензию дважды отмывали 0,9% NaCl, для удаления не связанного конго красного, с последующим осаждением матрикса центрифугированием при 1000 оборотов в минуту (200 g) в течение 75 минут после каждой отмывки. Суспензию замораживали и хранили при  $-25^{\circ}\text{C}$  до использования.

Непосредственно перед проведением эксперимента готовили рабочую суспензию матрикса. Для этого 0,9% раствором NaCl разводили размороженную суспензию матрикса до оптической плотности  $2,5 E_{\text{оп}}$  на многоканальном спектрофотометре при длине волны 492 нм и 0,15 мл суспензии матрикса в лунке 96 луночного планшета для ИФА. Далее 0,1 М раствором фосфатного буфера с pH 7,4 доводили оптическую плотность суспензии до  $2 E_{\text{оп}}$ . В результате определено, что в 1 мл такой рабочей суспензии должно содержаться 12,2 мг сухого матрикса и 0,1 мг Конго красного. В качестве консерванта в суспензию добавляли азид натрия до концентрации 2 мг/мл.

Затем определяли способность агента разрушать матрикс. В пробирку типа «эппендорф» вносили 0,1 мл раствора исследуемого агента в известной концентрации, 0,3 мл суспензии БП и инкубировали 24 часа при  $37^{\circ}\text{C}$ . Реакционную смесь центрифугировали 10 минут при 10 тыс. оборотов в минуту (7930 g) на центрифуге MIKRO 120 (Hettich) для осаждения неразрушенных элементов БП и переносили по 0,15 мл надосадка в лунки планшета для иммуноферментного анализа.

Учет реакции производили по увеличению оптической плотности надосадка на спектрофотометре при длине волны 492 нм за счет высвобождения Конго красного при разрушении комплекса красителя с компонентами экзополимерного матрикса [4].

Для определения достоверности различия между группами использовали критерий Манна-Уитни.

**Результаты и их обсуждение.** Уровень способности сывороток крови разрушать экзополимерный матрикс биопленки *S. aureus* у лиц с гнойно-воспалительными поражениями легких (медиана - 0,235; 25 – 75 перцентили - 0,133–0,282, n=10) и пациентов с острыми распространенными гнойно-воспалительными процессами (0,241; 0,211 - 0,299, n=13) был наименьшим и достоверно ( $p < 0,05$ ) отличался от контрольной группы (0,312; 0,28 - 0,356, n=12) и группы лиц с локальными острыми гнойно-воспалительными процессами (0,336; 0,269 - 0,365, n=10). У пациентов с хроническими гнойно-воспалительными процессами способность к разрушению матрикса имела промежуточное значение (0,271; 0,234 - 0,3343, n=13).

**Выводы:**

1. Сыворотки пациентов с гнойно-воспалительными поражениями легких и распространенными гнойно-воспалительными процессами обладают наименьшей способностью к расщеплению экзополимерного матрикса биопленки *S. aureus*.

2. Снижение способности к разрушению экзополимерного матрикса биопленки может быть предрасполагающим фактором развития тяжелых гнойно-воспалительных процессов.

*T. N. Leptseyeva*

**THE CAPACITY OF SERA TAKEN FROM PATIENTS WITH SEVERE INFLAMMATORY LUNG DISEASES TO DISRUPT EXOPOLYMERIC MATRIX OF *S. AUREUS* BIOFILM**

*Scientific supervisors*

*MD, PhD S. Senkovich, MD, PhD E. Nikitina*

*Department of Clinical Microbiology, Department of Anesthesiology and Intensive Care*

*Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk*

**Литература.**

1. Косинец, А.Н. Инфекция в хирургии: Руководство. / А.Н. Косинец, Ю.В. Стручков. - Витебск: изд-во ВГМУ, 2004. – 510 с.
2. Скала, Л.З. Практические аспекты современной клинической микробиологии / Л.З. Скала [и др.]. - Москва, 2004. – С. 15-78.
3. Palmer R.J. Jr., Stoodley P. (2007) Biofilms 2007: broadened horizons and new emphases. *J Bacteriol.* 2007; 189(22):7948–7960.
4. Окулич В.К., Оценка способности сывороток крови, иммуноглобулинов G пациентов с гнойно-воспалительными процессами и ряда ферментов к разрушению экзополимерного матрикса биопленок / В.К. Окулич, С.А. Сенькович, Ф.В. Плотников, А.А. Кабанова, Е.Л. Мацкевич // Журнал «Хирургия. Восточная Европа» - 2014. - № 3. – С. 9-17.