

**Garth D. Ehrlich • Patrick J. DeMeo •
J. William Costerton • Heinz Winkler**
Editors

CULTURE NEGATIVE ORTHOPEDIC BIOFILM INFECTIONS

 Springer

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие к изданию на русском языке	8
Предисловие к изданию на английском языке	10
Авторы	13
Список сокращений и условных обозначений	15
Глава 1. Проблема инфекций, не определяемых с помощью посева (<i>Г.Д. Эрлих, П.Дж. ДиМео, Дж.У. Костертон</i>)	17
1.1. Обособленные отрасли клинической медицины	18
1.2. Корни проблемы получения отрицательных результатов посевов	20
1.3. Решение проблемы невозможности определения инфекции с помощью молекулярных методов исследования	23
1.4. Смена ряда парадигм	29
1.5. Исторические истоки проблемы культивируемости	31
1.6. Два взгляда на одну проблему	33
Литература	36
Глава 2. Инфекции, не определяемые посевом, в ортопедической хирургии (<i>Г.Д. Эрлих, П. ДиМео, М. Палмер, Т.Дж. Заубер, Д. Альтман, Г. Альтман, Н. Сотерианос, С. Конти, М. Барати, Г. Мале, Фэн Ци Ху, Дж.К. Пост, Л. Нистико, Р. Крефт, Л. Холл-Студли, Дж.У. Костертон, П. Студли</i>)	39
2.1. Способы посева на питательной культуре для обнаружения и идентификации бактерий	40
2.2. Несостоятельность метода посева при выявлении хронических биопленочных инфекций	44
2.3. Решение проблемы невыявления бактерий с помощью посева	47
2.4. Метод Ibis PLEX-ID	49
2.5. Резюме	52
Литература	53
Глава 3. Усовершенствованная диагностика биопленочных инфекций с использованием различных молекулярных методов (<i>Т.Р. Томсен, Ю. Сюй, Я. Лоренцен, П.Х. Нильсен, Х.К. Шонхайдер</i>)	55
3.1. Введение	56
3.2. Обзор молекулярных методов оценки хронической инфекции	57
3.3. Молекулярные методы подчеркивают разнообразие образующих биопленки патогенов в хронических ранах	61

3.4. Применение молекулярных методов для выявления инфекции в протезированных суставах	64
3.5. Заключение	69
Литература	69
Глава 4. Улучшение результатов за счет комплексной молекулярной диагностики и целенаправленной противобиопленочной терапии (<i>Дж.П. Кеннеди, К.Е. Джонс</i>)	73
4.1. Введение	74
4.2. Стратегии лечения хронической инфекции, направленные против биопленок	77
4.3. Пример исходов: полноценное использование модели «четырёхпозиционный подход»	91
4.4. Заключение	96
Литература	97
Глава 5. Иммунологические методы диагностики и профилактики инфекций, вызванных <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>Н.К. Арчер, Дж.У. Костертон, Дж.Дж. Лейд, М.Е. Ширтлифф</i>)	99
5.1. Информация о <i>Staphylococcus aureus</i> и о биопленках	100
5.2. Стратегии уклонения от распознавания иммунной системой с точки зрения бактерии и организма человека	101
5.3. Применение знаний о биопленках в разработке вакцин и в трансляционных исследованиях	107
5.4. Заключение	115
Литература	116
Глава 6. Диагностика перипротезных инфекций: метод посева, молекулярные маркеры и технология Ibis (<i>Д. Парвизи</i>)	120
6.1. Введение	121
6.2. Значимость диагностики перипротезных инфекций	122
6.3. Традиционные маркеры перипротезных инфекций	123
6.4. Новые технологии для диагностики перипротезных инфекций	125
6.5. Будущие направления диагностики перипротезных инфекций	132
Литература	132
Глава 7. Инфекции, связанные с тяжелыми открытыми переломами большеберцовой кости (<i>Р.В. О’Туле</i>)	135
7.1. Введение	136
7.2. Механизм инфицирования при тяжелых открытых переломах большеберцовой кости	138

7.3. Внутренняя и наружная фиксация	139
7.4. Проспективное исследование FixIt.	144
7.5. Заключение	145
Литература	146
Глава 8. Молекулярная диагностика I поколения и стратегии профилактики перипротезных инфекций суставов (<i>Н. Сотерианос</i>)	148
8.1. Ограничения традиционной диагностики ортопедических инфекций.	149
8.2. Молекулярная диагностика	151
8.3. Внедрение программ проактивного инфекционного контроля	155
8.4. Выводы.	163
Литература	164
Глава 9. Лечение ортопедических инфекций. Решение проблемы биопленок (<i>Х. Винклер</i>)	167
9.1. Проблема костной инфекции	168
9.2. Причина неудачи	171
9.3. Ортопедическая инфекция, не определяемая культуральными методами.	173
9.4. Заключительные выводы для эффективной терапии	175
9.5. Доставка антибиотиков.	176
9.6. Зачем использовать очищенную кость аллотрансплантата в качестве носителя или наполнителя?	178
9.7. Выбор имплантатов	179
9.8. Одноэтапные и двухэтапные вмешательства	180
9.9. Что можно сделать сегодня	180
9.10. Резюме	185
Литература	186
Глава 10. К новой парадигме в диагностике и лечении ортопедических инфекций (<i>Г.Д. Эрлих, Дж.У. Костертон, Д. Альтман, Дж. Альтман, М. Палмер, С. Пост, П. Студли, П.Дж. ДиМео</i>)	193
10.1. Введение	194
10.2. Сравнение результатов применения посева и молекулярных методов в ортопедической хирургии	195
10.3. Пути развития.	204
10.4. И напоследок...	205
Литература	206

Глава 1

Проблема инфекций, не определяемых с помощью посева

Г.Д. Эрлих, П.Дж. ДиМео, Дж.У. Костертон

Аннотация. Одна из проблем современной медицины в том, что отдельные ее отрасли недостаточно взаимодействуют с другими, медленно перенимая достижения медицинской науки, а в ряде случаев даже игнорируя общую позицию. Это является потенциальной угрозой для миллионов пациентов. Недавно получены данные, что бактерии вернулись к своей естественной стратегии формирования биопленок (Costerton, 2007) при развитии инфекционного процесса в ответ на успехи, достигнутые в области иммунизации (разработка вакцин) и лечения (антибиотики). Однако данная информация была воспринята не всеми, к тому же она медленно распространяется среди отдельных групп медиков. Ответом на описанные стратегии лечения было развитие мощной резистентности биопленочных инфекций к антибиотикам и защитным механизмам организма. За последние три десятилетия в арсенале клиницистов появились и другие подходы, включающие хирургическую резекцию и высокодозную антибиотикотерапию. Однако пока в медицине разрабатывались пути ответа на эту серьезную угрозу в виде бактериальных инфекций, которых не удавалось избежать с помощью вакцинации и которые

не отвечали на, казалось бы, оптимальную антибактериальную терапию, в отдельных отраслях медицины возникла другая не менее серьезная проблема — биопленки. Опытные врачи многих специальностей встречались со случаями, в которых они были уверены в бактериальной этиологии заболевания, потому что они видели все классические признаки инфекции, но золотой стандарт диагностики (посев культуры бактерий) просто не оказывался эффективным. В некоторых случаях источником инфекции был медицинский инструмент (Khoury и др., 1992), в других — поврежденные ткани (Noibu, 2002). Однако во всех отраслях медицины было необходимо решить вопрос о правильной стратегии лечения при многих серьезных заболеваниях, бактериальная этиология которых (средний отит, простатит) ставилась под сомнение из-за отрицательных результатов посевов. Бактерии воспользовались тем, что отдельные группы врачей и ученых действовали несогласованно. Они перешли от непосредственной атаки планктонными клетками к стратегии образования биопленки, вызывающей хронический инфекционный процесс в тканях. Самым серьезным долгосрочным последствием этого может быть проблема обнаружения этих бактерий классическими методами медицинской микробиологии.

1.1. ОБОСОБЛЕННЫЕ ОТРАСЛИ КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Довольно интересным примером может быть сфера ЛОР-патологии. В команде Chris Post и Garth Ehrlich одновременно используются наиболее совершенные методы молекулярной диагностики и концепция лечения инфекции как «био пленочной». Результаты посевов, полученные при отите среднего уха с выпотом, были столь устойчиво отрицательными, что некоторые врачи даже начали думать, что это состояние имеет неспецифическую воспалительную природу, не связанную с четкой бактериальной этиологией. Кластеры бактериальных клеток можно было увидеть с помощью прямой микроскопии выпота, полученного у этих пациентов. Метод дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК)-полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Post и др., 1995) позволил выявить наличие очень большого количества ДНК трех основных предполагаемых патогенов, которые иногда давали рост в культуре. Когда были подняты вопросы о жизнеспособности бактерий в выпоте из среднего уха, команда использовала ПЦР с обратной транскрипта-

зой в целях обнаружения короткоживущей информационной («мес-сенджерной») рибонуклеиновой кислоты (РНК) (Rauner и др., 1998), чтобы доказать, что бактериальные патогены присутствовали и были жизнеспособны во время отбора проб. Это развеяло подозрения о том, что отрицательные результаты при посеве могут объясняться только антибиотикотерапией. Затем команда представила уникальные прямые микроскопические и молекулярные доказательства того (Hall-Stoodley и др., 2006), что отит среднего уха с выпотом вызывается бактериями, растущими в биопленках, а отрицательные результаты при посеве являются такой же характерной чертой этого биопленочного заболевания, как и устойчивость к антибиотикам и защитным механизмам организма. В другой отрасли (лечение хронических ран) применение экспертами современных молекулярных методов (Dowd и др., 2008) показало, что метод посева позволяет выявлять лишь небольшую долю фактически присутствующих бактериальных и грибковых организмов. Соответственно при использовании точной информации клиническое лечение этих сложных инфекций может быть кардинально усовершенствовано.

Выводы, которые можно сделать на основе этих примеров, вызывают тревогу: если биопленочные инфекции значительно труднее обнаружить традиционными методами культивирования, для десятков миллионов пациентов существует риск невыявления серьезной патологии. По подсчетам Центра по контролю и профилактике заболеваний и Национального института здравоохранения, инфекционные биопленки в настоящее время встречаются соответственно в 65 и 80% случаях бактериальных инфекций. Недавно был опубликован отчет (Wolcott и др., 2010), согласно которому эти инфекции развиваются у 14 млн американцев, унося жизни более 400 000 человек ежегодно.

Метод посева является единственной одобренной Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов и повсеместно доступной технологией обнаружения и идентификации бактериальных и грибковых инфекций в большинстве развитых стран мира. Тем не менее, учитывая известный процент неудач этого метода в обнаружении таких частых связанных с формированием биопленок инфекций, как отит среднего уха с выпотом у детей и хронические инфекции мочеполовой системы и простатит у взрослых, мы должны больше внимания уделить категориям заболеваний, которые считаются небактериальными только на основе регулярного получения отрицательных результатов культуральных посевов. Также

язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки — это не единственное заболевание, терапия которого радикально изменится, если будет точно изучена его этиология. Это также может привести к увеличению общей эффективности терапии, если удастся идентифицировать все виды бактерий в тканях. Мы живем в эпоху точной судебной экспертизы на основе методов определения ДНК и секвенирования всего генома, а потому наилучшим для пациентов будет мобилизация ресурсов здравоохранения в целях увеличения скорости и точности диагностики бактериальных заболеваний.

1.2. КОРНИ ПРОБЛЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ ОТРИЦАТЕЛЬНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ПОСЕВОВ

Бактериальные биопленки в настоящее время изучаются очень широко, в хорошо финансируемом (к настоящему моменту объем достиг 100 млн) Центре биопленочной инженерии и сотнях лабораторий по всему миру. Благодаря этому возникла четкая картина структуры и функционирования этих инфекционных образований (рис. 1.1). Большинство бактериальных клеток в основных типах микробных сообществ растут в фенотипе биопленки, что способствует их участию в совместных обменных процессах, что показано в области вокруг пометки «гетерогенность» в середине рисунка. Эти процессы проходят легче благодаря наличию между отдельными клетками физических соединений и «мостиков», таких как жгутикоподобные соединения (nanowires) (Gorby и др., 2006), нанотрубки (Remis и др., 2010), а также временных связей через пили (ворсинки на поверхности клеток) и структурированную эДНК (Whitchurch и др., 2002; Goodman и др., 2011). Любая попытка убрать одну из этих активно взаимодействующих клеток из ее определенного места в биопленке привела бы к формированию группы бактериальных клеток с нарушенным алгоритмом функционирования, которые были бы неспособны расти в любой среде. Мы провели опыт, в котором хорошо выделенные «кусочки» биопленок отдельных видов, полученных методом проточной цитометрии, переносились на поверхности агаровых пластинок, которые в последующем оценивались микроскопически. Ни на одной из пластинок колонии не сформировались. Недавно Pradeep Singh в своей работе показал (Singh P. Собрание по биопленкам в Копенгагене, 2011), что в липополисахаридах наружных мембран клеток *Pseudomonas aeruginosa*

возникают структурные изменения, вследствие чего они становятся неспособными расти на поверхности агаровых пластинок, даже если среда в остальном идеально подходит для культивирования псевдомонад. Клетки биопленки представляют собой совершенно иной фенотип (Sauer и др., 2002) по сравнению с планктонными клетками, которые изучались в лаборатории более 150 лет. Одна из их характерных особенностей заключается в том, что они не могут расти и создавать колонии, когда их «изымают» с «привычных мест» в устоявшихся микробных сообществах и помещают на поверхность агаровых пластин.

Практически все клетки в зрелой биопленке — как в пробирке, так и в инфицированном организме — имеют «био пленочный» фенотип, в котором проявление генов может отличаться от планктонного фенотипа на целых 70%. Именно это во многих случаях объясняет получение отрицательных результатов при посеве. Биопленки делятся на части, гарантируя колонизацию отдаленных участков своих экосистем. Это приводит к смене выработанной защитной стратегии клеток. Начинается их производство в планктонной форме в определенных местах в достаточном количестве для распространения по всей экосистеме (Sauer и др., 2004) (см. рис. 1.1). Планктонный фенотип предназначен для перемещения бактерий далеко от биопленки туда, где есть благоприятные условия для формирования новых колоний. Эти обтекаемые планктонные клетки не имеют межклеточных связей, их клеточные стенки приспособлены для сохранения стабильности в различных средах, и они специально приспособлены для прилипания к поверхностям (включая агар) и образования новых сообществ. Именно для обнаружения этих клеток и был первоначально разработан метод посева. До разработки вакцин происходило следующее: планктонные бактерии (например, холерный вибрион) проникали в кишечник человека из внешних источников, подавляли местную защиту и создавали некоторое число «центров колонизации», распространявших планктонные клетки, составлявшие основу разрушительной инфекции. Диагностика была проста, так как планктонные бактерии росли на агаровых пластинках, и, следовательно, все современные технологии были мобилизованы на борьбу с эпидемией. Источники других инфекционных заболеваний (например, брюшного тифа и дифтерии) находились внутри человеческого организма. Болезнь также протекала остро. Планктонные клетки атаковали организм и либо подавляли его защиту в течение недели или менее, либо вырабатывался иммунитет и более высокая сопротивляемость в случае повторной встречи с микроорганизмом. Опять же,

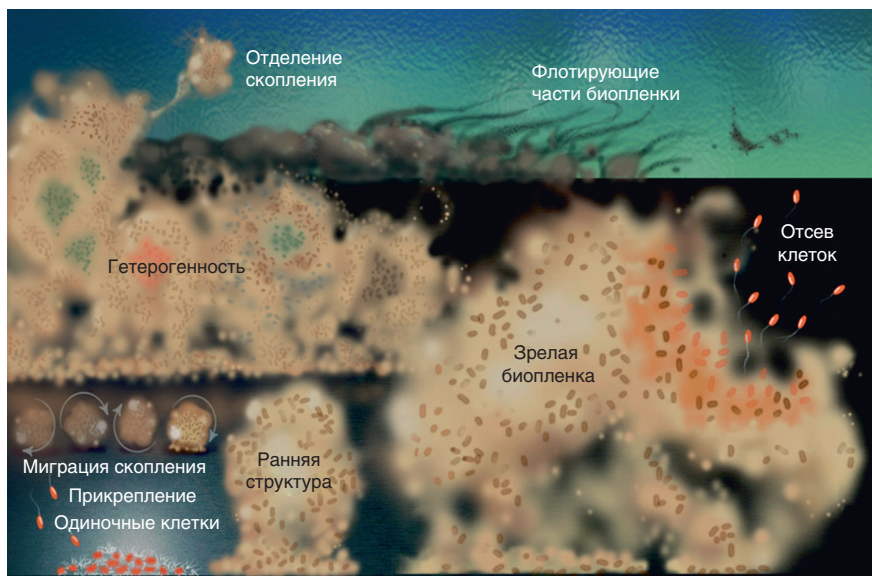


Рис. 1.1. Схематическое отображение расположения и роли планктонных и биопленочных клеток в типичном сообществе биопленок

наличие планктонных бактерий и их видов можно было определить методом посева. Это давало возможность выработать профилактическую и терапевтическую стратегию. Когда распространенность острых бактериальных инфекций значительно снизилась благодаря применению вакцин, которые позволяли достигать эффективных уровней иммунитета, и когда расширились возможности медицины реагировать на эти заболевания на фоне разработки антибиотиков, которые уничтожали планктонные клетки, бактерии начали развивать свою основную альтернативную стратегию — биопленки. Вначале было замечено, что заболевания, вызываемые биопленками, имеют связь с нестерильным медицинским инструментом или с поврежденными тканями человека (например, муковисцидоз). Они привлекли внимание потому, что сохранялись даже несмотря на активную защитную реакцию организма и были глубоко устойчивы к традиционной антибактериальной терапии (Costerton и др., 1999).

Однако вскоре стала проявляться еще одна характерная особенность биопленочных инфекций. Суть ее заключается в том, что метод посева был очень неэффективен в обнаружении и идентификации их возбу-