

УДК: 57.069.4:582.263

Т.С. Кустова\*<sup>1</sup>, Т.А. Карпенюк<sup>1</sup>, А.В. Гончарова<sup>1</sup>,  
В.П. Соломко<sup>2</sup>, Ж.А. Искакбаева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан,

<sup>2</sup>Научный центр противоиных препаратов, г. Алматы, Казахстан

\*e-mail: kus\_talya@yahoo.com

### Идентификация микроорганизмов раневой поверхности больных с гнойно-некротическими формами диабетической стопы для разработки корригирующих фитопрепаратов

Идентифицированы доминирующие микроорганизмы раневой поверхности больной с гнойно-некротической формой диабетической стопы. Наличие среди них *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida krusei* свидетельствует о смешанном характере микрофлоры, которая плохо поддается лечению традиционными антибактериальными препаратами.

**Ключевые слова:** диабетическая стопа, идентификация культур, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida krusei*

Т.С. Кустова, Т.А. Карпенюк, А.В. Гончарова,  
В.П. Соломко, Ж.А. Искакбаева

#### Фитопрепараттарды жасау үшін диабетикалық табанның ірінді-некрозды түрімен ауратын науқас адамдардың жара бетіндегі микроорганизмдерді идентификациялау

Диабетикалық табанның ірінді-некрозды түрімен ауратын науқас адамдардың жара бетіндегі доминантты микроорганизмдер белгіленді. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida krusei* бар болуы аралас микрофлора екендігін корсетеді, сол себептен дәстүрлі антибактериалды препараттармен емделуге жатпайды.

**Түйін сөздер:** диабетикалық табанның, доминанты микроорганизмдер, дәрілік өсімдіктер

T.S. Kustova, T.A. Karpenyuk, A.V. Goncharova,  
V.P. Solomko, Zh.A. Iskakbayeva

#### Identification of microorganisms in wound surface of patients with pyonecrotic forms of diabetic foot syndrome for development of herbal remedies

Dominant microorganisms were identified in wound surface of patients with pyonecrotic forms of diabetic foot syndrome. Presence of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida krusei* indicates a mixed microflora that poorly responds to traditional treatment with antibacterial drugs.

**Keywords:** diabetic foot, microorganisms identification, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida krusei*

Сахарный диабет – сложное системное заболевание с комплексом обменных изменений, которые в конечном итоге могут привести к поздним диабетическим осложнениям (развитию инфаркта миокарда, инсульта, тяжелым поражениям сосудов сетчатки глаза, конечностей, почек и других систем). В Казахстане более 200000

человек страдают диабетом, лечение которого является острой медико-социальной проблемой. При этом растет экономический ущерб как от частых госпитализаций, использования дорогостоящих методов обследования, так и от затрат на медикаментозное и оперативное лечение. Одним из распространенных осложнений сахарно-

го диабета является поражение стоп («диабетическая стопа»). Причинами развития синдрома диабетической стопы является поражение нервов, поражение периферических сосудов и инфекции, которые развиваются вследствие нарушенного кровоснабжения и иннервации стоп. Травмированная кожа у здоровых людей при достаточном кровоснабжении заживает легко и достаточно быстро, а при диабете, когда нарушен ток крови по сосудам, любая травма стопы приводит к длительно незаживающему процессу. К месту травмы присоединяется инфекция и начинается процесс воспаления и некротизирования (отмирания тканей).

Местные антисептические и антибактериальные препараты назначают, как правило, индивидуально, в зависимости от полученных результатов из содержимого язв, что требует поиска новых средств, обладающих антимикробным действием.

Принцип непрерывного лечения, необходимый при данном заболевании предполагает чередование специфических и дополнительных методов, в частности использование лекарственных растений, богатых веществами, оказывающими положительное влияние на организм человека [1-6]. При правильном применении растительные препараты обладают более мягким действием, менее токсичны, чем синтетические, и, в большинстве случаев, не вызывают привыкания и аллергии. [7-15].

Представители флоры Казахстана характеризуются малой изученностью на антибактериальную активность, корригирующую патогенез такого осложнения сахарного диабета как диабетическая стопа. Для проведения исследований по подбору фитоэкстрактов, перспективных для лечения больных с гнойно-некротическими формами диабетической стопы, необходимо правильно подобрать микроорганизмы, на которых будет испытываться антимикробная активность лекарственных растений, что обуславливает актуальность данного исследования.

### **Материалы и методы**

Материалом исследования послужило содержимое язв больной с гнойно-некротической формой диабетической стопы.

В работе использованы микробиологические (бактериологические) методы исследования открытых инфицированных ран [16]

а) Микроскопия исследуемого материала

Материал, взятый одним из стерильных ватных тампонов, размазывали по стерильному предметному стеклу, окрашивали по Грамму и просматривали под микроскопом. При обнаружении микроорганизмов отмечали их морфологическую характеристику (грамположительные и грамотрицательные палочки, кокки и др.).

б) Посев исследуемого материала на питательные среды и идентификация культур

Материал, взятый другим ватным стерильным тампоном из того же участка раны, засеивали на чашку с 5% кровяным агаром, на «среду для контроля стерильности» и сахарный бульон.

Посев на чашку с агаром производили методом «тампон-петля»: тампоном проводилась «дорожка» по диаметру чашки, затем другой стороной тампона в обратном направлении засеивали еще одну «дорожку», параллельную первой. После этого материал рассеивали по чашке при помощи петли штрихами, перпендикулярными к «дорожкам».

Такой посев позволяет выделить микроорганизмы в виде отдельных колониеобразующих единиц даже из ассоциации микроорганизмов.

Засеянные жидкие и плотные питательные среды термостатировали при 37°C в течение 18-24 часов. При обнаружении роста отдельных колоний, выделяли чистые культуры на чашках с кровяным агаром, с Сабуро-Глюкоза 2% агаром.

Идентификацию культур проводили с помощью трех наборов фирмы MIKRO-LA-TEST: STAPHYtest16, NEFERMtest24 и CANDIDAtest21.

Из чистой 24 часовой культуры готовили суспензию в физиологическом растворе. Тщательно гомогенизировали суспензию. Мутность суспензии для STAPHYtest16 и NEFERMtest24 составила 2 единицы по шкале мутности McFarland, для CANDIDAtest21 составила 0,5 единицы по шкале мутности McFarland. Вносили в каждую лунку по 0,1 мл суспензии. Дальнейшие манипуляции проводили согласно инструкциям, прилагаемым к наборам.

По завершении времени инкубации идентификацию проводили с помощью компьютерной программы «Микроб-Авто» на бактериологическом анализаторе Multiskan Ascent, фирмы Thermo.

**Таблица 1** – Морфофункциональные признаки культур, выделенных из раневой поверхности

Параметры	<i>S. aureus</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Candida krusei</i>
Микроскопия исследуемого материала			
Морфология	Грамположительные кокки в скоплениях (грозди)	Грамотрицательные палочки	Грамположительно окрашенные клетки
Культуральные свойства микроорганизмов (рост на твердой среде)			
Форма колоний:	Круглая	Круглая	Круглая
Размер:	2,3 мм	2,3мм	3-4мм
Поверхность:	Гладкая	Гладкая	Гладкая
Профиль:	Выпуклый	Выпуклый	Плоская
Оптические свойства:	Непрозрачный	Прозрачный	Непрозрачный
Цвет:	Желтый	Зеленый	Серый
Край колонии:	Ровный	Ровный	-
Структура колонии:	Однородная	Однородная	Неоднородная с мелкой зернистостью в центре
Консистенция:	Мягкая	Мягкая	Плотная

### Результаты и их обсуждение

Литературные данные о наиболее часто выделяемых микроорганизмах у больных с гнойно-некротическими формами диабетической стопы сильно разнятся в разных источниках. На характер инфекции у больных синдромом диабетической стопы оказывают влияние глубина поражения, тяжесть заболевания и предшествующий прием антибиотиков. Считается, что первыми контаминируют рану или кожные дефекты аэробные грамположительные кокки. Длительно существующие язвы и сопровождающие их инфекционные осложнения характеризуются смешанной микрофлорой, состоящей из грамположительных кокков (стафилококки, стрептококки, энтерококки), представителей Enterobacteriaceae, облигатных анаэробов и в ряде случаев – неферментирующих грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*). У больных, неоднократно леченных в стационаре антибиотиками широкого спектра действия и подвергавшихся оперативным вмешательствам, нередко высеваются полирезистентные штаммы возбудителей [17].

В связи с этим для точного установления микроорганизмов, поражающих стопы больных диабетом, был проведен бактериальный посев

из раневой поверхности больной. Кожу вокруг раны обрабатывали антисептиком, удаляли с помощью стерильной салфетки некротические массы, детрит и гной. Материал брали с помощью стерильного тампона. Тампон поместили в транспортную среду, в течение 3 часов доставили в лабораторию. Идентификацию микроорганизмов проводили, выделив чистые культуры согласно стандартным процедурам и методикам.

Бактериальный посев из раневой поверхности выявил наличие трех доминирующих микроорганизмов: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida krusei* (таблица 1, 2), что свидетельствует о смешанной флоре раневой поверхности, которая плохо поддается лечению антибактериальными препаратами.

В связи с полученными результатами бактериального посева, для скрининга экстрактов, обладающих антибактериальной активностью были рекомендованы следующие сертифицированные штаммы микроорганизмов: бактерии *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Methicillin-resistant S. aureus* ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, дрожжеподобные грибки *Candida albicans* ATTC № 90028, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida glabrata* ATTC 90030.

Таблица 2 – Идентификация культур микроорганизмов, выделенных из раневой поверхности

Название теста	Анализируемый параметр			Идентификация
	Название теста	Код	Реакция	
1	2	3	4	5
STAPHYtest16	Уреаза	URE	+	<i>S. aureus</i>
	Аргинин	ARG	+	
	Орнитин	ORN	-	
	$\beta$ – Глюкуронидаза	GLR	-	
	Эскулин	ESL	-	
	Нитраты	NIT	+	
	Фосфатаза	PHS	+	
	Галактоза	GAL	-	
	Сахароза	SUC	+	
	Трегалоза	TRE	+	
	Маннитол	MAN	+	
	Ксилоза	XYL	-	
	Мальтоза	MLT	+	
	Манноза	MNS	+	
	Лактоза	LAC	+	
	Ацетоин	VPT	+	
Цитохромоксидаза	OXI	+		
NEFERMtest24	Индол	IND	-	<i>Ps. aeruginosa</i>
	Аргинин	ARG	+	
	Уреаза	URE	+	
	Лизин	LYS	-	
	Глюкоза	GLU	+	
	Фруктоза	FRU	+	
	Инозитол	INO	-	
	Сахароза	SUC	-	
	Фосфатаза	PHS	+	
	N-Ацетил $\beta$ – D-глюкозаминидаза	NAG	-	
	Маннитол	MAN	+	
	Ксилоза	XYL	+	
	Целлобиоза	CEL	-	
	Галактоза	GAL	+	
	Нитраты	NO <sub>3</sub>	+	
	Нитриты	NO <sub>2</sub>	+	
	Эскулин	ESL	+	
	$\gamma$ – Глютамилтрансфераза	GGT	+	
	Лактоза	LAC	-	
	Мальтоза	MLT	-	
	Трегалоза	TRE	-	
	Цитрат Симмонса	SCI	+	
	Цитохромоксидаза	OXI	+	
	CANDIDA test21	N-Ацетил $\beta$ – D-глюкозаминидаза	NAG	
Глюкоза		GLU	+	
Галактоза		GAL	-	
Мальтоза		MALA	-	
$\alpha$ Галактозидаза		$\alpha$ GAL	-	
L-фенилаланин-аминопептидаза		PHE	-	
Уреаза		URE	-	
Рамноза		RHA	-	
Инозитол		INO	-	
Трегалоза		TRE	-	
Лактоза		LAC	-	
L-пролинаминопептидаза		PRO	-	
Мелобиоза		MEL	-	
Ксилоза		XYL	-	
Целлобиоза		CEL	-	
Сахароза		SUC	-	
Раффиноза		RAF	-	
Ростовые трубки		GET	-	
Псевдогифы		PSH	+	
Атроспоры		ATS	-	

### Литература

- 1 Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. Лечение сахарного диабета и его осложнений (руководство для врачей). – М.: Медицина, 2005. – 511 с.
- 2 Bloomgarden Z. T. Developments in diabetes and insulin resistance // *Diabetes Care*. – 2006. – Vol. 29. – P. 161–167.
- 3 Chung-Hung Chan, Gek-Cheng Ngoh, and Rozita Yusoff. A brief review on anti diabetic plants: Global distribution, active ingredients, extraction techniques and acting mechanisms // *Pharmacological Reviews*. – 2012. № 6(11). – P. 22–28.
- 4 Cefalu W.T, Ribnicky D.M. Modulation of insulin action by botanical therapeutics // *Obesity and Weight Management*. – 2009.- № 5. – P. 277 – 81.
- 5 Dey L, Attele A.S, Yuan C.S. Alternative therapies for type 2 diabetes // *Alternative Medicine Review*. – 2002. №7. – P.45–58.
- 6 Jung M, Park M, Lee H.C, Kang Y.H, Kang E.S, Kim S.K. Antidiabetic agents from medicinal plants // *Current Medicinal Chemistry*. – 2006. – 13. – P.1203–1218.
- 7 Ажунова Т.А., Лемза С.В., Линхоева Е.Г. Фармакотерапевтическая эффективность комплексного растительного средства при экспериментальном диабете / Т.А. Ажунова, С.В. Лемза, Е.Г. Линхоева // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. – 2011. – №1. – С. 104 – 108.
- 8 Abo-Elmatty DM, Essawy SS, Badr JM, Sterner O. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Urtica pilulifera* extracts in type2 diabetic rats // *Journal Ethnopharmacology*. – 2012. – № 142(1). – P. 65-71.
- 9 Pandikumar P, Babu NP, Ignacimuthu S. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Begonia malabarica* Lam.in normal and streptozotocin induced diabetic rats// *Journal Ethnopharmacology*. -2009.- V.124. – P.111–115.
- 10 Grover JK, Vats V, Rathi SS. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential // *Journal Ethnopharmacology*. – 2000. V. 73 – P. 461–470.
- 11 Genta SB, Cabrera WM, Mercado MI, Grau A, Catalan CA, Sanchez SS. Hypoglycemic activity of leaf organic extracts from *Smallanthus sonchifolius*: Constituents of the most active fractions // *Chemico- Biological Interactions*. – 2010- V.185. – P. 143–152.
- 12 Baskaran K, Kizar Ahamath B, Radha Shanmugasundaram K, Shanmugasundaram E.R. Antidiabetic effect of a leaf extract from *Gymnema sylvestre* in non-insulin-dependent diabetesmellitus patients // *Journal Ethnopharmacology*. – 1990. V.30 – P. 295–300.
- 13 Blevins S.M, Leyva M.J, Brown J, Wright J, Scofield R.H, Aston C.E. Effect of cinnamon on glucose and lipid levels in non insulin-dependent type 2 diabetes// *Diabetes Care*.- 2007.- V30 – P. 2236–2237.
- 14 Dugoua J.J, Seely D, Perri D, Cooley K, Forelli T, Mills E, Koren G. From type 2 diabetes to antioxidant activity: A systematic review of the safety and efficacy of common and cassia cinnamon bark // *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. – 2007. – V.85 – P. 837–847.
- 15 Grover J.K, Yadav S.P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: A review. // *Journal Ethnopharmacology*. – 2004. – V93 -P.123–132.
- 16 Приказ Министерства Здравоохранения от 22 апреля 1985 г. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений
- 17 Мультимедийное руководство “Гнойная хирургическая инфекция”. Под редакцией акад. В.Д.Федорова, чл.-корр. А.М.Светухина. М., 2001.