

ТЕЧЕНИЕ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА ПРИ ОСТРОМ ГНОЙНОМ ХОЛАНГИТЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ ФОРМИРОВАТЬ БИОПЛЕНКИ

Харьковский национальный медицинский университет (г. Харьков)

Данная статья является фрагментом научно-исследовательской работы кафедры «Розробка сучасних методів хірургічного лікування і профілактики ускладнень захворювань і травм органів грудної клітини і черевної порожнини», № гос. регистрации 011U000649.

Вступление. Гнойный холангит (ГХ) – одно из наиболее частых и тяжелых осложнений доброкачественных и злокачественных заболеваний желчных путей, вызванных нарушением их проходимости. Это заболевание наблюдается у 17–83% больных с холедохолитиазом, стенозом Фатерова соска, внутренними желчными свищами [1]. Летальность, по данным различных авторов, колеблется в пределах от 4,7% до 60%, по-прежнему остается высокой, в среднем достигая 20–30% [2].

Недостаточно высокая эффективность проводимого лечения этой патологии в определенной мере объясняется образованием микроорганизмами биопленок – консорциума бактериальных клеток, заключенных в полимерный (полисахаридный) матрикс и фиксированных на дренажах, катетерах и самой раневой поверхности [3]. В настоящее время роль микробных биопленок в инфекционной патологии не полностью оценена, однако имеются указания, что до 80% инфекционных заболеваний связаны с образованием этих бактериальных структур [4]. Микроорганизмы в биопленке более устойчивы к действию как антибактериальных препаратов, так и факторов неспецифического иммунного ответа организма человека [5–7]. В ряде работ показана роль бактериальных пленок в колонизации ран и течении инфекционных процессов [8, 9], однако способность к образованию биопленок возбудителями острого гнойного холангита изучена недостаточно полно.

Цель исследования – определить способность возбудителей острого гнойного холангита формировать биопленки и оценить их влияние на выраженность воспалительного ответа.

Объект и методы исследования. Были обследованы 60 больных в возрасте от 16 до 65 лет с острым гнойным холангитом, находившихся на стационарном лечении в Харьковской городской клинической многопрофильной больнице №17 по поводу ЖКБ, холедохолитиаза, стенозирующих поражений Фатерова сосочка.

С целью декомпрессии желчных путей проводили эндоскопическую папиллосфинктеротомию после предварительной ретроградной холангиографии, с целью плановой санации желчных протоков раствором антисептика производили установку назобилиарного дренажа и, по показаниям, проводили инфузионную, дезинтоксикационную и симптоматическую терапию. Всем больным выполнялось клиничко-лабораторное обследование. Клиническая оценка течения заболевания проводилась с учетом наличия и времени регрессии признаков синдрома системного воспалительного ответа – SIRS [10], длительности течения заболевания.

Бактериологическое исследование проводилось общепринятыми методами с идентификацией микроорганизмов до вида [11]. Антибиотикочувствительность определяли дискодиффузионным методом, перечень антибиотиков составляли в соответствии с действующими нормативными документами [12]. Способность микроорганизмов формировать биопленки оценивали по оптической плотности (ед. ОП) на биохимическом анализаторе LabLine-90 [13, 14].

Для изучения способности микроорганизмов к формированию биопленок пользовались следующими методами [16]. Бактериальную культуру *S. aureus* и *C. albicans* засеивали на скошенный агар и инкубировали в термостате 24 часа при температуре 37°C. Слив из агаровой культуры проводили добавлением 1 мл физиологического раствора и доводили до стандарта щільності по Мак-Фарланду 109 клеток / мл. Формирование биопленок на дне пластиковых планшетов, которые имеют 96 лунок, проводили следующим образом: в каждую лунку вносили по 150 мкл питательной среды (питательный бульон для *S. aureus*, жидкая среда Сабуро для *C. albicans*), и 10 мкл культуры, кроме последней лунки, которая составляла контрольные показатели. Инкубацию планшетов проводили в термостате при 37°C 24 часа. На следующий день содержимое лунок отбирали, и отмывали трижды физиологических раствором. В лунки вносили 150 мкл дистиллированной воды и 15 мкл 1% спиртового раствора генцианвиолета и инкубировали при комнатной температуре 45 минут. Краситель отбирали и промывали лунки трижды дистиллированной водой. Далее в лунки вносили по 250 мкл этилового спирта и инкубировали при комнатной температуре 45 минут.

После этого оптическую плотность биопленок измеряли при дождени волны 545 нм на анализаторе LabLine-90. Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Стюдента, коэффициента линейной корреляции Пирсона и коэффициента ранговой корреляции Спирмена [15].

Результаты исследований и их обсуждение.

У всех больных с острым гнойным холангитом при госпитализации наблюдался хотя бы один признак синдрома системной воспалительной реакции.

Достоверное ($p \leq 0,001$) снижение признаков синдрома системного воспалительного ответа у пациентов с острым гнойным холангитом отмечалось через $4,1 \pm 0,5$ сут после проведенного оперативного вмешательства. Сроки лечения в стационаре составили в среднем $14,3 \pm 2,5$ сут. Из очагов хирургической инфекции во время оперативного вмешательства было выделено 64 штамма возбудителей. Большую часть (28 штаммов) составил *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Реже встречались энтеробактерии – 16 штаммов (5 штаммов *Escherichia coli*, 6 – *Klebsiella pneumoniae*, 3 – *Enterobacter* spp., 2 – *Proteus mirabilis*). У 11 пациентов с острым гнойным холангитом, из очагов хирургической инфекции выделены штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, различных по чувствительности к антибиотикам и 9 штаммов грибов *C. albicans*.

У 38 пациентов возбудитель был выделен в монокультуре, у 22 – в ассоциациях: *S. aureus* + *S. epidermidis* (5 случаев), *S. aureus* + *E. coli* (4), *S. aureus* + *P. aeruginosa* (3), *S. aureus* + *C. albicans* (4), *S. aureus* + *Kl. pneumoniae* (6).

При изучении чувствительности к противомикробным препаратам установлено, что штаммы *S. aureus* характеризовались высоким уровнем чувствительности к цефтриаксону, фузидину и цефазолину (рис.).

Особенного внимания заслуживает факт выявления большого количества 17 штаммов *S. aureus*, устойчивых к ванкомицину и метициллину.

В отношении энтеробактерий достоверную ($p \leq 0,05$) чувствительность установлено к цефепиму и карбапенемам. Выявлено, что 3 штамма *E. coli* и 2 штамма *K. pneumoniae* являются продуцентами β -лактамаз расширенного спектра действия. Все штаммы *Kl. pneumoniae* были чувствительны к меропенему и имипенему.

Анализ способности к формированию биопленок возбудителями выделенными от пациентов с острым гнойным холангитом *in vitro* показал неравномерность распределения этого признака среди групп патогенов.

Наиболее высокие значения способности к формированию биопленок определены у *S. aureus* и *K. pneumoniae*. Данный способность у *E. coli* встречался несколько реже и характеризовался более низкими значениями.

Выявлена прямая корреляционная зависимость между способностью микроорганизмов к образованию биопленки и длительностью течения заболевания (коэффициент линейной корреляции $r=0,61$). В то же время корреляция указанной способности со сроками регрессии клинических признаков SIRS была менее значимой и носила обратный характер ($r=-0,48$). Корреляционная связь способности

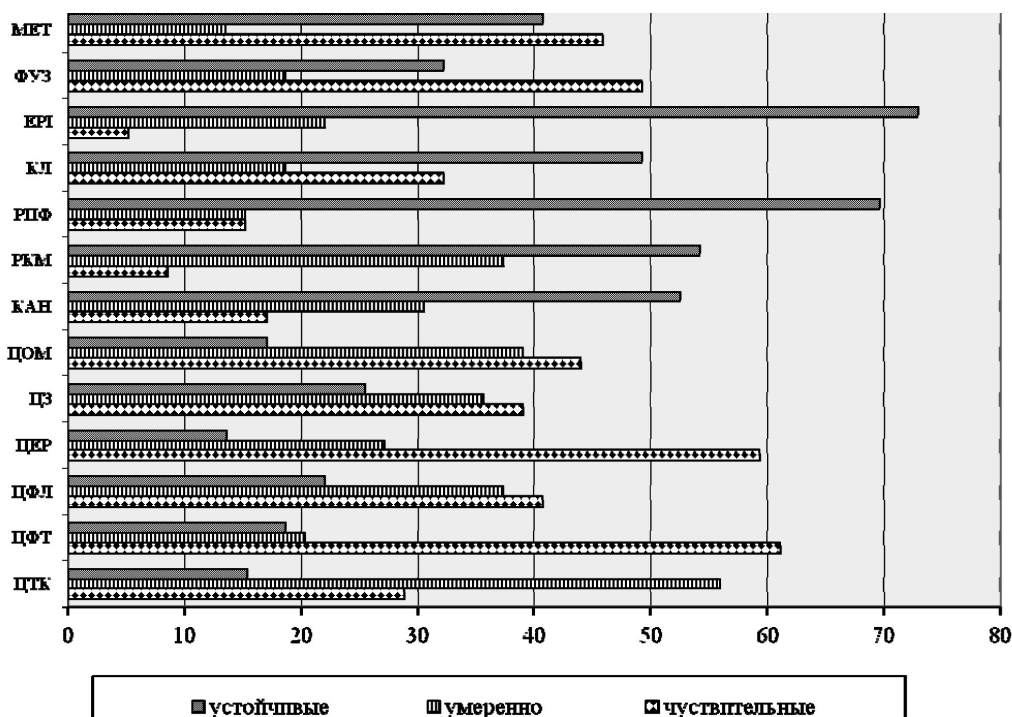


Рис. Антибиотикоустойчивость штаммов *S. aureus* у больных с острым гнойным холангитом.

возбудителей образовывать биопленку со сроками появления грануляций в ранах была слабой ($r = -0,24$), как и с уровнем чувствительности микроорганизмов к использованным в работе антибиотикам ($r = -0,28$).

Обсуждение. Роль стрептококков, энтерококков и анаэробов в раневой инфекции достаточно велика [1, 6-8, 10], однако у обследованных больных с острым холангитом только в 12,6% случаев выделены данные микроорганизмы с дренажных конструкций. Проведенные исследования выявили значительную связь способности бактерий формировать биопленку с резистентностью к разным антибиотикам. Установлена сильная корреляционная зависимость между способностью микроорганизмов к образованию биопленок и длительностью течения заболевания, что дает возможность использовать указанное свойство как маркер прогноза течения заболевания.

Поскольку бактерии в биопленке более устойчивы к действию как антимикробных препаратов [7, 17 – 18] не вызывает сомнения, тот факт что одним из направлений лечения хирургических инфекций

должно быть подавление способности образовывать биопленки [5, 17, 19, 20] и разрушение уже имеющихся [17, 21]. Высокая выживаемость микроорганизмов в биопленке обусловлена разными механизмами, в том числе и наличием в пленке клеток персистентов, что приводит к затяжному течению заболевания.

Выводы. Клинические штаммы *S. aureus*, *C. albicans* и *K. pneumoniae* выделенных от пациентов с острым гнойным холангитом, достоверно ($p \leq 0,05$) имели более выраженную способность формированию биопленок, что повышает вероятность колонизации этими микроорганизмами дренажных конструкций.

Прямая корреляционная зависимость между способностью микроорганизмов к образованию биопленки и длительностью течения заболевания указывает на необходимость комбинированной антимикробной терапии при острых холангитах.

Перспективы дальнейшего исследования: планируется изучить способность к формированию биопленок микроорганизмами выделенных из камней желчного пузыря при острых гнойных холангитах.

Литература

1. Бухарин О. В. Механизмы выживания бактерий / О. В. Бухарин, А. Л. Гинцбург, Ю. М. Романова, Г. И. Эль-Регистан. – М.: Медицина, 2005. – 213 с.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. / С. Гланц. – М.: Практика, 1998. – 112 с.
3. Ефименко Н. А. Инфекции в хирургии / Н. А. Ефименко, И. А. Гучев С. В. Сидоренко // Фармакотерапия и профилактика – 2004. – № 2. – С. 12-14.
4. Гучев С. В. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам / С. В. Гучев // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. – 2004. – №6 (4). – С. 306–59.
5. Сидоренко С. В. Роль бактериальных биопленок в патологии человека / С. В. Сидоренко // Инф. в хир. – 2004. – №2 (3). – С. 16–20.
6. Скала Л. З. Практические аспекты современной клинической микробиологии / Л. З. Скала, С. В. Сидоренко, А. Г. Нехорошева // Инфекции в хирургии – 2004. – №4 (2). – С. 32–35.
7. Тец В. В. Биопленки возбудителей уроинфекций и использование фторхинолонов / В. В. Тец, Н. К. Артеменко, Н. В. Заславская // Consilium Medicum. – 2008. – №4. – С. 110–114.
8. Ерюхина И. А. Хирургические инфекции: руководство. [для студ. виш. навч. закл.] / И. В. Ерюхина, Б. И. Гельфанда. – СПб.: Питер, 2003. – 327 с.
9. Шагинян И. А. Формирование биопленок клиническими штаммами бактерий комплекса *Burkholderia cepacia* в зависимости от их фенотипических и генотипических характеристик / И. А. Шагинян, Г. А. Данилина, М. Ю. Чернуха // Журн. Микробиол. – 2007. – № 1. – С. 3–9.
10. Bjarnsholt T. Silver against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms / T. Bjarnsholt, K. Kirketerp-Moller, S. Kristiansen // APMIS. – 2007. – № 115 (8). – P. 921–928.
11. Costerton J. W. Microbial biofilms / J. W. Costerton, Z. Lewandowski, D. E. Caldwell // Ann. Rev. Microbiol. – 1995. – №49. – P. 711–715.
12. Edwards R. Bacteria and wound healing / R. Edwards, K. G. Harding // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2004. – № 17 (2). – P. 91–96.
13. Davis S. C. Microscopic and physiologic evidence for biofilm-associated wound colonization in vivo / S. C. Davis, C. Ricotti, A. Cazzaniga // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2008. – № 16 (1). – P. 23–29.
14. Harrison-Balestra C. A wound-isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows a biofilm in vitro within 10 hours and is visualized by light microscopy / C. Harrison-Balestra, A. L. Cazzaniga, S. C. Davis // Dermatol. Surg. – 2003. – № 29 (6). – P. 631–635.
15. Kirketerp-Moller K. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds / K. Kirketerp-Moller, P. O. Jensen, M. Fazli // J. Clin. Microbiol. – 2008. – №46 (8). – P. 2717–2722.
16. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells / K. Lewis // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 2008. – № 3(22). – P. 127–131.
17. Mertz P. M. A new in vivo model for the evaluation of topical antiseptics on superficial wounds. The effect of 70% alcohol and povidone-iodine solution / P. M. Mertz, O. M. Alvarez, R. V. Smerbeck // Arch. Dermatol. – 1984. – №1 (1). – P. 58–62.
18. Nalca Y. Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: a global approach / Y. Nalca, L. Jansch, F. Bredenbruch // Antimicrob. Agents Chemother. – 2006. – № 5 (5). – P. 1680–1688.

19. O'Toole G. F. Biofilm formation as microbial development / G. F. O'Toole, H. B. Kaplan, R. Kolter // *Ann. Rev. Microbiol.* – 2000. – № 5(4). – P. 49–53.
20. Palmer R. Jr. Broadened Horizons and New Emphases / R. Jr. Palmer, P. Stoodley // *J. Bacteriol.* – 2007. – №1 (22). – P. 48–60.
21. Russell A. D. Biocide use and antibiotic resistance: The relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations / A. D. Russell // *Lancet Infect. Dis.* – 2003. – № 3. – P. 794–803.

УДК 616.361-002.3-036.11:579.22

ТЕЧЕНИЕ ПОСЛЕОПЕРАЦИОННОГО ПЕРИОДА ПРИ ОСТРОМ ГНОЙНОМ ХОЛАНГИТЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ ФОРМИРОВАТЬ БИОПЛЕНКИ

Шевченко Р. С.

Резюме. Исследовали способность микроорганизмов выделенных с дренажных конструкций к формированию биопленок у пациентов с острым гнойным холангитом. Оценивали их влияние на течение воспалительного ответа и течение послеоперационного периода. Установлено достоверно ($p \leq 0,05$) более высокие значения способности к формированию биопленок у *S. aureus* и *K. pneumoniae*. Выявлена прямая корреляционная зависимость между способностью микроорганизмов к образованию биопленки и длительностью течения заболевания (коэффициент линейной корреляции $r=0,62$). Корреляционная связь способности возбудителей образовывать биопленку со сроками появления грануляций была слабой ($r=-0,26$), как и с уровнем чувствительности микроорганизмов к использованным в работе антибиотикам ($r=-0,28$). Проведенные исследования выявили значительную связь способности бактерий формировать биопленки с резистентностью к разным антибиотикам. Установлена сильная корреляционная зависимость между способностью микроорганизмов к образованию биопленок и длительностью течения заболевания, что дает возможность использовать указанное свойство как маркер прогноза течения заболевания.

Ключевые слова: острый гнойный холангит, формирование биопленок, антибиотикочувствительность.

УДК 616.361-002.3-036.11:579.22

ПЕРЕБІГ ПІСЛЯОПЕРАЦІЙНОГО ПЕРІОДУ ПРИ ГОСТРОМУ ГНІЙНОМУ ХОЛАНГІТІ ЗАЛЕЖНО ВІД ЗДАТНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ФОРМУВАТИ БІОПЛІВКИ

Шевченко Р. С.

Резюме. Досліджували здатність мікроорганізмів до формування біоплівки виділених з дренажних конструкцій у пацієнтів з гострим гнійним холангітом. Оцінювали їх вплив на перебіг запальної відповіді і протягом післяопераційного періоду. Встановлено достовірно ($p \leq 0,05$) більш високі значення здатності до формування біоплівки у *S. aureus* і *K. pneumoniae*. Виявлено пряму кореляційну залежність між здатністю мікроорганізмів до утворення біоплівки і тривалістю перебігу захворювання (коефіцієнт лінійної кореляції $r = 0,62$). Кореляційний зв'язок здатності збудників утворювати біоплівку з термінами появи грануляцій в ранах була слабкою ($r = -0,27$), як і з рівнем чутливості мікроорганізмів до використаних в роботі антибіотиків (r від $-0,21$ до $0,36$). Проведені дослідження виявили зв'язок здатності бактерій формувати біоплівки з резистентністю до різних антибіотиків. Наявність кореляційної залежності між здатністю мікроорганізмів до утворення біоплівки і тривалістю перебігу захворювання дозволяє оцінювати вказану властивість як маркер прогнозу перебігу захворювання.

Ключові слова: гострий гнійний холангіт, формування біоплівки, антибіотикочутливість.

UDC 616.361-002.3-036.11:579.22

During Postoperative Acute Purulent Cholangitis Depending on the Ability of Microorganisms to Form a Biofilm

Shevchenko R. S.

Summary. Introduction. Suppurative cholangitis (GC) – one of the most frequent and severe complications of benign and malignant biliary tract disease caused by the violation of their patency. This disease occurs in 17-83% of patients with choledocholithiasis, stenosis of major duodenal papilla, internal biliary fistulas.

Purpose – to determine the ability of pathogens of acute suppurative cholangitis to form biofilms and to assess their impact on the severity of the inflammatory response.

Materials and Methods. There were 60 patients aged 16 to 65 years with acute suppurative cholangitis, were hospitalized in the Clinical Hospital № 17, city Kharkov, Ukraine, multidisciplinary about cholelithiasis, choledocholithiasis, stenotic lesions of major duodenal papilla. In order to decompress the biliary tract was performed papillosphincterotomy endoscopic retrograde cholangiography after a preliminary, to the planned reorganization of bile ducts with an antiseptic solution made installation nazobiliarnogo drainage. All patients fulfilled the clinical and laboratory examination. Clinical evaluation of the disease was carried out taking into account the availability and time of regression of signs of systemic inflammatory response syndrome – SIRS, duration of the

disease. Bacteriological examination was carried out by conventional methods with the identification of microorganisms to the species. Antibiotic sensitivity was determined by the method, the list of antibiotics accounted for in accordance with existing regulations. The ability of microorganisms to form biofilms was assessed by optical density on a biochemical analyzer LabLine-90.

Results. The disappearance of the clinical signs of SIRS patients experienced a $3,2 \pm 0,5$ days after surgery. Foci of surgical infection during surgery were allocated 64 strains of pathogens. Most (28 strains) was *Staphylococcus aureus*. Less common Enterobacteriaceae – 20 strains. In 10 patients with acute suppurative cholangitis c, from the centers of surgical infection identified 10 strains of *Pseudomonas aeruginosa*, different sensitivity to antibiotics. In 38 patients the causative agent was isolated in a monoculture. Dedicated staphylococci were characterized by a high level of sensitivity to fuzidinu, cefatoksim, cefaclor, and vancomycin. Significantly ($p \leq 0,05$) higher values the ability to form biofilms identified in *S. aureus* and *K. pneumoniae*. Direct correlation between the ability of microorganisms to the formation of biofilms and the duration of the disease (the linear correlation coefficient $r = 0,62$). At the same time, the correlation between this ability with the terms of the regression of clinical signs of SIRS was less significant and wore reversed ($r = -0,48$). Correlation of the ability of pathogens to form biofilms with the terms of the appearance of granulation tissue in wounds was weak ($rP = -0,27$), as well as with the level of sensitivity of microorganisms to antibiotics used in the work (r from 0. 21 to 0. 36.). The studies revealed a significant association ability of bacteria to form a biofilm resistance to different antibiotics. The presence of correlation between the formation of microorganisms sposobnostiyu bioplenkok and duration of the disease allows to estimate the specified property as a marker for prognosis of the disease.

Key words: cholangitis, form biofilms, antibiotic sensitivity.

Рецензент – проф. Малик С. В.

Стаття надійшла 12. 06. 2013 р.