

ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СПОСОБНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ФОРМИРОВАТЬ БИОПЛЕНКУ

ПЕТУХОВ В.И., ОКУЛИЧ В.К., ПЛОТНИКОВ Ф.В., СЕНЬКОВИЧ С.А.

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Резюме.

Целью исследования было изучить особенности клинического течения раневого процесса в зависимости от способности выделенного возбудителя формировать биопленку.

Бактериологическими методами обследовано 83 пациента с инфекцией мягких тканей различной локализации. Идентификация и оценка чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам проводили на биохимическом анализаторе АТВ Expression. Оценку способности формировать биоплёнку проводили спектрофотометрически, окраска кристаллическим фиолетовым. С целью изучения динамики раневого процесса оценивали исчезновение отека, гиперемии, ограничение и исчезновение уплотнений, инфильтратов, ускорение сроков очищения ран от некротических тканей, появление грануляций и начало эпителизации.

В результате выполненного исследования было обнаружено статистически значимое увеличение сроков очищения раны, появления грануляций, начала краевой эпителизации и длительности госпитализации у пациентов, из ран которых выделены возбудители, способные формировать биоплёнку.

Таким образом, клинические характеристики раны, а также длительность лихорадки и длительность пребывания в стационаре пациентов с гнойными ранами зависят от способности выделенного возбудителя образовывать микробное сообщество – биопленку.

Ключевые слова: биоплёнка, раневая инфекция.

Abstract.

The objectives of the study were to investigate the peculiarities of the clinical course of wound healing process, depending on the ability of the isolated causative agent to form a biofilm.

We examined 83 patients with posttraumatic osteomyelitis in the bacteriological laboratory. Sensitivity of microorganisms to antibiotics was determined with the help of ATB Expression. The ability to form biofilms was assessed by means of spectrophotometry. In order to study the dynamics of wound healing process we evaluated disappearance of edema, hyperemia, and the limitation and disappearance of indurations, infiltrations, accelerated wounds clearance of necrotic tissues, the appearance of granulations and epithelialization beginning.

As a result of the conducted study a statistically significant increase in the time of wound clearance, the appearance of granulations, marginal epithelialization beginning and the length of hospital stay of patients with biofilm was found.

Thus the clinical wound characteristics as well as the length of fever and hospital stay of patients with purulent wounds depend on the ability of the isolated pathogen to form a biofilm.

Key words: biofilm, wound infection.

Проблема гнойно-воспалительных заболеваний в настоящее время остается актуальной для клинической хирургии. Несмотря на значительные успехи, связанные с расширением и углублением знаний об этиологии, патогенезе, клинике хирургической инфекции на основе современных достижений иммуно-

логии, микробиологии, биохимии, снижение числа пациентов с гнойными хирургическими заболеваниями не наблюдается. Гнойные заболевания составляют 35-40% среди всех госпитализированных в хирургические отделения, а частота развития послеоперационных осложнений достигает в среднем 20-30% [1, 2],

что значительно увеличивает экономические потери общества, связанные с затратами на их лечение. Процесс смены ведущих возбудителей хирургической инфекции стал особенно динамичным на рубеже XX-XXI столетий. Так, в 50-60 гг. «чумой XX века» называли стафилококк, 70-80 гг. - грамотрицательную аэробную микрофлору, сейчас установлен факт ассоциативной аэробно-анаэробной микробной агрессии при гнойных хирургических заболеваниях.

Интерес и постоянное внимание к этой проблеме объясняется тяжелым течением раневого процесса, сохранением тенденции к возрастанию количества длительно текущих и рецидивирующих процессов [3, 4]. Длительно текущая местная инфекция и задержка в заживлении раны, нарушение общих и местных механизмов приводят к раневому истощению и генерализации инфекции. Многочисленными авторами увеличение числа осложнений операционных ран и гнойно-воспалительных заболеваний связывается с широким и нерациональным использованием антибиотиков, ростом устойчивости микроорганизмов к ним, также снижением резистентности макроорганизма [5].

Клинические особенности инфекционного процесса во многом обусловлены биологическими свойствами микроорганизмов, а именно наличием у них патогенного и персистентного потенциалов. В последнее десятилетие изучению механизмов выживания бактерий придается особое значение. На сегодняшний день основной частью микробиологов признано, что большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных окружающих средах существует в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ – биопленок [6]. Биопленка – микробное сообщество, характеризующееся клетками, которые прикреплены к поверхности или друг к другу, заключены в матрикс синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ, и демонстрируют изменение фенотипа, выражающееся в изменении параметров роста и экспрессии специфичных генов [7]. Имеются данные, что до 80% инфекционных заболеваний связаны с образованием этих микробных структур [8].

Характерное свойство всех биопленок – их поразительная устойчивость к физическим

и биохимическим воздействиям, включающим антибиотикорезистентность [6]. Несмотря на то, что эта устойчивость признана много лет, ее биологическое обоснование до сих пор до конца не объяснено. Факторы, которые частично объясняют устойчивость фенотипа, включают высокую клеточную плотность и физическое вытеснение антибактериальных препаратов. В пределах биопленки могут происходить физиологические изменения, включающие реакцию общего стресса, закрытие ключевых метаболических процессов и индукцию защитных механизмов [7]. Популяция клеток в составе биопленки гетерогенна, содержит быстро- и медленно растущие бактерии. Ряд из них устойчивы к антибиотикам за счет экспрессии инактивирующих ферментов, другие не экспрессируют подобные системы. Общая резистентность зависит от взаимодействия между целой популяцией клеток и терапии, направленной против мультиклеточного сообщества, что в определенной мере объясняет недостаточную эффективность проводимого лечения хирургической инфекции [6].

Цель исследования – изучить особенности клинического течения раневого процесса в зависимости от способности выделенного возбудителя формировать биопленку.

Методы

В ходе исследования было проведено комплексное обследование и лечение 83 пациентов с гнойно-воспалительными процессами мягких тканей, проходивших курс стационарного лечения в Республиканском научно-практическом центре «Инфекция в хирургии» (РЦИХ) на базе отделения гнойной хирургии УЗ «Витебская областная клиническая больница» в 2012-2013 годах. Критерии включения: наличие гнойной раны, возраст старше 18 лет, компенсация соматической патологии, наличие информированного согласия. Критерии исключения: возраст меньше 18 лет, беременность, период лактации, наличие сахарного диабета, наличие инфекции костей и суставов, декомпенсация соматической патологии, отсутствие информированного согласия. Лечебные мероприятия у пациентов с гнойно-воспалительными процессами были комплексными и включали хирургическое и медикаментозное лечение. Пациентам проводили хирургиче-

скую обработку гнойного очага, пластическое закрытие раневых дефектов выполняли расщеплённым кожным лоскутом, вторичными швами, полнослойным лоскутом на сосудистой ножке. Проводилось этиотропное лечение (антибактериальное), направленное на подавление возбудителей заболевания; патогенетическое, направленное на регуляцию патофизиологических процессов в очаге воспаления, и симптоматическое, способствующее восстановлению нарушенных функций организма. При оценке эффективности лечения учитывали общее состояние пациента, уменьшение болей, нормализацию температуры тела. Со стороны раны учитывали исчезновение отека, гиперемии, ограничение и исчезновение уплотнений, инфильтратов, ускорение сроков очищения ран от некротических тканей, появление грануляций и начало эпителизации.

В момент проведения хирургической обработки гнойного очага проводили забор раневого отделяемого для бактериологического исследования. Для выделения стрептококков использовали 5% кровяной Колумбия-агар, стафилококки выделяли на высокоселективном желточно-солевом агаре с азидом натрия, кишечную группу бактерий на среду Эндо с генциан-фиолетовым, псевдомонады выделяли на среде ЦПХ, посев на микробы группы протей производили по методу Шукевича.

Идентификация микроорганизмов проводилась с помощью тест-систем на биохимическом анализаторе АТВ Expression фирмы «bioMerieux» [9]. Оценку чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам проводили на биохимическом анализаторе АТВ Expression фирмы «bioMerieux». Определение чувствительности микроорганизмов к антисептикам проводили согласно рекомендациям [10].

Полученные данные подвергались статистической обработке с помощью пакета прикладных таблиц «Statistica» (Version 6-Index, StatSoft Inc., США). Перед использованием методов описательной статистики определяли тип распределения количественных признаков с использованием критерия Шапиро-Уилка. При распределении признака, отличном от нормального, вычисляли медиану (Me), нижний 25-й (LQ) и верхний 75-й квартили (UQ). Данные представляли в виде Me (LQ; UQ). Для оценки статистической значимости между

несвязанными группами применялся непараметрический критерий Манна-Уитни (U).

В зависимости от наличия способности возбудителей, выделенных от пациентов с хирургической инфекцией, образовывать биоплёнку, пациенты разделены на две группы. В первую группу включено 34 пациента, от которых выделены микроорганизмы, не способные образовывать биоплёнку. В первой группе мужчин – 18 (53%), женщин – 16 (47%). Средний возраст составил 49 (27; 58) лет. Во вторую группу включены 31 пациент, от которых выделены микроорганизмы, способные образовывать биоплёнку. Среди них мужчин – 20 (64,5%), женщин – 11 (36,5%). Средний возраст составил 42 (25; 64) лет. Данные группы статистически значимо не отличаются по полу, возрасту, нозологической структуре заболеваний. Распределение пациентов в группах по нозологии представлено в таблице 1.

Результаты и обсуждение

Для определения способности микроорганизмов образовывать биоплёнку использовали ранее разработанный нами способ [11]. Готовили взвесь микроорганизмов в бульоне Мюллера-Хинтона с оптической плотностью на денситометре 0,5 единиц оптической плотности, что соответствует концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл. В лунки планшета вносили по 150 мкл полученной взвеси бактерий, на один штамм отводили 12 лунок. Отрицательным контролем служили лунки с 150 мкл бульона Мюллера-Хинтона без бактерий. Планшет инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 24 часов. Из лунок планшета с помощью стерильной пипетки удаляли содержимое. Лунки промывали четырехкратно дистиллированной водой с помощью автоматической мойки МВ-350 производства «Технофорум». Биопленку фиксировали путем добавления в лунки по 160 мкл 2,5% раствора глутаральдегида и инкубации в течение 5 минут. Планшет четырехкратно промывали и вносили по 180 мкл 0,25% раствора кристаллического фиолетового на 5 минут, после чего снова повторяли процедуру отмывки четыре раза и высушивали в течение 10 минут. В лунки добавляют по 200 мкл 33% раствора уксусной кислоты и инкубировали при комнатной температуре 10 минут до полной экстракции кристаллического фиолетового в кислоту. Для

Таблица 1 – Распределение пациентов в исследуемых группах пациентов по нозологии

Нозологические формы заболевания	Первая группа (n=34)	Вторая группа (n=31)
Абсцессы (n=27)	18 (52,9%)	11 (35,4%)
Флегмоны (n=8)	5 (14,7%)	3 (9,6%)
Посттравматические инфицированные раны (n=18)	7 (20,5%)	11 (35,4%)
Послеоперационные инфицированные раны (n=7)	2 (5,8%)	5 (16,1%)
Гнойно-воспалительные заболевания пальцев и кисти (n=3)	2 (5,8%)	1 (3,2%)

измерения планшет помещали в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при длине волны 620 нм определяли оптическую плотность в лунках. Определяли минимальное значение оптической плотности (ОПБмин) для лунок с микроорганизмами, образующими биоплёнку: ОПБмин = среднее значение ОП лунок контроля + (3×стандартное отклонение среднего значения ОП лунок контроля). По полученным данным определяли среднее значение двенадцати лунок и оценивали способность образования микроорганизмом биопленки *in vitro*. При значении оптической плотности опытных лунок = ОП ≤ ОПБмин – считали микроорганизм не образующим биоплёнку; при значении оптической плотности опытных лунок = ОП > ОПБмин – считали микроорганизм образующим биоплёнку.

В ходе проведенного исследования изучена динамика раневого процесса. Очищение гнойной раны у пациентов первой исследуемой группы происходило в среднем на 5,5 (4; 7) сутки, тогда как у пациентов второй группы очищение раны происходило на 9,5 (4; 16) сутки, различия статистически достоверны при $p=0,02$. У пациентов первой группы появление грануляций в ране наблюдалось на 4,5 (4; 7) сутки, тогда как во второй группе признаки грануляции появлялись лишь на 6,5 (4; 14) сутки, $p=0,03$. Начало краевой эпителизации при выявлении способности возбудителя к формированию биопленки на поверхности раны также наступало позже, чем в случае отсутствия у возбудителя способности образовывать биопленку, соответственно, во второй группе эпителизация появлялась на 9 (4; 16) сутки, в первой - на 7 (5; 8) сутки, $p=0,02$. Длительность лихорадки

у пациентов первой и второй группы с гнойными ранами составила 0 (0; 3) сутки и 3 (2; 8) сутки, соответственно, $p=0,0007$. Средняя длительность госпитализации в исследуемых группах также статистически значимо отличалась в зависимости от способности возбудителя образовывать биопленку: в первой группе средний койко-день составил 11 (8; 18) суток, во второй - 21 (11; 38) суток, $p=0,001$.

Такие показатели, как самочувствие пациента, выраженность болевого синдрома, отёка, гиперемии мягких тканей, количество раневого отделяемого и размеры ран пациентов первой и второй группы в течение первых десяти суток лечения статистически значимо не отличались, что указывает на отсутствие влияния способности формировать биоплёнку на видимые различия между раневыми дефектами до и в первые сутки лечения. Однако на 10 сутки госпитализации перечисленные выше показатели пациентов двух сравниваемых групп были различны: самочувствие достоверно лучше было у пациентов первой группы, а выраженность болевого синдрома, отёка, гиперемии мягких тканей, количество отделяемого раневого отделяемого и размеры ран оказались выше у пациентов второй группы, что указывает на недостаточную эффективность лечения пациентов с хирургической инфекцией мягких тканей, возбудители которой способны формировать биоплёнки. Описанные результаты представлены в таблице 2.

Заключение

1. Клинические характеристики раны, а также длительность лихорадки и длитель-

Таблица 2 - Результаты лечения гнойных ран

Показатель	Первая группа (n=34)	Вторая группа (n=31)	p
Койко-день	11 (8; 18)	21 (11; 38)	p=0,001
t тела max°	36,85 (36,8; 37,6)	37,7 (37,1; 38,5)	p=0,003
Длительность лихорадки, сутки	0 (0; 3)	3 (2; 8)	p=0,0007
Сроки очищения ран, сутки	5,5 (3; 8)	9,5 (4; 16)	p=0,02
Сроки появления грануляций, сутки	4,5 (4; 7)	6,5 (4; 14)	p=0,03
Сроки начала краевой эпителизации, сутки	7 (5; 8)	9 (4; 16)	p=0,02
Размеры (1 день)	3 (1,5; 5)	5,4 (2; 16,2)	p>0,05
Самочувствие (1 день)	3 (3; 3)	3 (3; 4)	p>0,05
Боль (1 день)	8 (8; 8)	8 (7; 8)	p>0,05
Отёк (1 день)	8 (7; 8)	8 (7; 8)	p>0,05
Гиперемия (1 день)	8 (7; 8)	8 (7; 8)	p>0,05
Отделяемое (1 день)	8 (7; 8)	7 (6; 8)	p>0,05
Размеры (5 день)	2,2 (1,5; 4,8)	4,2 (1,3; 15,2)	p>0,05
Самочувствие (5 день)	4 (4; 4)	4 (3; 4)	p>0,05
Боль (5 день)	6 (6; 7)	7 (5; 8)	p>0,05
Отёк (5 день)	6 (5; 7)	6 (5; 7)	p>0,05
Гиперемия (5 день)	6 (4; 6)	6 (5; 7)	p>0,05
Отделяемое (5 день)	5 (4; 7)	5 (4; 7)	p>0,05
Размеры (10 день)	2,25 (0,7; 4,5)	8 (1,9; 15,1)	p=0,02
Самочувствие (10 день)	4 (4; 5)	4 (3; 4)	p=0,007
Боль (10 день)	5 (4; 5)	6 (5; 7)	p=0,002
Отёк (10 день)	4 (3; 5)	5 (4; 7)	p=0,03
Гиперемия (10 день)	4 (3; 5)	5 (4; 6)	p=0,05
Отделяемое (10 день)	3 (2,5 ; 4,5)	5 (3; 7)	p=0,04

ность пребывания в стационаре пациентов с гнойными ранами зависят от способности выделенного возбудителя образовывать микробное сообщество – биопленку.

2. В случае, если возбудитель обладает способностью формировать биоплёнку, сроки очищения раны, появления грануляций и начало краевой эпителизации значительно увеличиваются.

3. Период лихорадки и срок госпитализации существенно длительнее у пациентов, выделенный возбудитель которых способен образовывать биопленку.

Литература

1. Светухин, А.М. Гнойная хирургия: современное состояние проблемы, - 50 лекций по хирургии / А.М. Светухин, Ю.А. Амирасланов. – М.: Медиа Медика, 2003. – С. 335–44.
2. Гонтарь, Т.Г. Микрофлора гнойных ран кожи и мягких тканей и её чувствительность к антибиотикам. / Т.Г. Гонтарь, Т.А. Батеева // Хирургия-2004 : материалы V Рос. науч. форума. – М., 2004. – С. 44.
3. Стручков, В. И Хирургические инфекции / В. И. Стручков, В.К. Гостищев., Ю.В. Стручков. – М., 1991. – 560 с.
4. Bacteriology of wounds: spectrum of pathogens and sensivity pattern / Lul Raka [et al.] // Surgical infections: prevention and management. – Moscow, 2003. – P. 39.
5. Косинец, А.Н. Антибактериальная терапия в гнойной хирургии: руководство / А.Н. Косинец, В.К. Окулич, В.П. Булавкин.– Витебск : ВГМУ, 2002. – С. 283–84.
6. Stewart, P.S. Antibiotic resistance of bacteria in

- biofilms / P.S. Stewart, J.W. Costerton // Lancet. – 2001. – Vol. 358. – P. 135–38.
7. Mah, T-F.C. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents / T-F.C. Mah, G.A. O'Toole // Trends Microbiol. – 2001. – № 9. – P. 34–39.
 8. Palmer, R. J. Jr. Biofilms 2007: broadened horizons and new emphases / R.J. Jr. Palmer, P. Stoodley // J Bacteriol. – 2007. – № 189(22). – P. 7948–60.
 9. Оптимизация определения чувствительности грамотрицательной микрофлоры к антибиотикам с помощью тест-системы «АБ-ГРАМ(-)» / Ф.В. Плотников [и др.] // Студенческая медицинская наука XXI в. : материалы VII междунар. науч.-практ. конф., 1–2 нояб. 2007 г. – Витебск, 2007. – С. 55–57.
 10. Окулич, В.К. Разработка тест-систем для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам / В.К. Окулич, С.Д. Федянин, Е.А. Конопелько // Роль антропогенных и природных патогенов в формировании инфекционных и неинфекционных болезней человека: Матер. междунар. конф. 8–9 окт. 2002 г. – Минск, 2002. – С. 453.
 11. Красильников, А. П. Справочник по антисептике. – Минск : Выш. шк., 1995. – 123 с.
 12. Кабанова, А. А. Метод определения способности микроорганизмов-возбудителей гнойно-воспалительных процессов челюстно-лицевой области формировать биопленки / А. А. Кабанова, Ф.В. Плотников // Современ. стоматология. – 2013. – №1. – С. 82–84.

Поступила 05.11.2013 г.

Принята в печать 06.12.2013 г.

Сведения об авторах:

Петухов В.И. – д.м.н., профессор, зав. кафедрой хирургии ФПК и ПК УО «ВГМУ»;

Окулич В.К. – к.м.н., доцент кафедры клинической микробиологии УО «ВГМУ»;

Плотников Ф.В. – магистр мед. наук, аспирант кафедры хирургии ФПК и ПК УО «ВГМУ»;

Сенькович С.А. – к.м.н., доцент кафедры клинической микробиологии УО «ВГМУ».

Адрес для корреспонденции: 210023, г.Витебск, пр-т Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», кафедра хирургии ФПК и ПК. Тел.моб.: +375 (29) 591-21-70, e-mail: dr.plotnikov@mail.ru – Плотников Филипп Викторович.