

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ПРОФЕССОРА В. Ф. ВОЙНО-ЯСЕНЕЦКОГО»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Андреев Роман Иванович

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЦЕЛЕВОЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ
ТЕРАПИИ В ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ОСТРОГО
КАЛЬКУЛЁЗНОГО ХОЛЕЦИСТИТА**

14.01.17 – хирургия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Винник Юрий Семенович

Научный консультант:
доктор медицинских наук
Диденко Любовь Васильевна

Красноярск – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Эпидемиология, этиопатогенез желчнокаменной болезни, калькулёзного холецистита.....	13
1.2 Диагностика и лечение желчнокаменной болезни, калькулёзного холецистита.....	19
1.3 Микробиологический аспект желчнокаменной болезни.....	27
1.3.1 Классические методы микробиологической диагностики.....	27
1.3.2 ПЦР-диагностика и газожидкостная хромато-масс-спектрометрия в идентификации инфекционного агента при калькулёжном холецистите.....	31
1.3.3 Роль биоплёнок в этиопатогенезе острого калькулёзного холецистита и их клиническая значимость.....	43
1.3.4 К вопросу об антибиотик-ассоциированном дисбиозе.....	49
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	54
2.1 Характеристика клинических наблюдений.....	54
2.2 Инструментальные методы исследования.....	67
2.3 Лабораторные методы исследования.....	68
2.4 Принципы расширенной экспресс-идентификации микроорганизмов и возможности раннего назначения рациональной антимикробной химиотерапии.....	84
2.5 Статистическая обработка материала.....	85
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ... ..	87
3.1 Результаты идентификации микрофлоры у больных желчнокаменной болезнью бактериологическим методом.....	88
3.2 Исследование крови методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии для детектирования микробных маркеров у здоровых лиц.....	97
3.3 Исследование микрофлоры желчного пузыря методом газожидкостной	

хромато-масс-спектрометрии у больных калькулёзным холециститом.....	100
3.4 Результаты определения чувствительности микроорганизмов к антибиотическим химиопрепаратам при разных формах калькулёзного холецистита.....	140
ГЛАВА 4 К ВОПРОСУ О РОЛИ МИКРОБНЫХ БИОПЛЁНОК В ЭТИОПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРОГО КАЛЬКУЛЁЗНОГО ХОЛЕЦИСТИТА.....	147
ГЛАВА 5 ОПТИМИЗАЦИЯ ЛЕЧЕБНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ ПРИ КАЛЬКУЛЁЗНОМ ХОЛЕЦИСТИТЕ.....	165
5.1 Повышение эффективности лечения больных калькулёзным холециститом.....	165
5.2 Результаты коррекции дисбиоза у пациентов с острым калькулёзным холециститом.....	179
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	181
ВЫВОДЫ.....	199
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	200
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	201
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	203
СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА.....	223

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность избранной темы

Желчнокаменная болезнь (ЖКБ) известна человечеству с давних времен. Первые письменные упоминания о желчных камнях относятся к XIV веку [29; 31]. При раскопках древних захоронений среди останков человека обнаружены следы желчных камней. Например в Древнем Китае более 2 000 лет назад для лечения болезней печени использовали медвежью желчь. Желчные камни обнаружены и в египетских мумиях. Также известно, что некоторыми сведениями о желчнокаменной болезни располагал Гиппократ (V–IV век до н. э.) и Авиценна (Ибн Сина, 980–1037 гг.). Гален (Claudius Galenus, 129 г. – ок. 200 или 216 г.) и Везалий (Andrea Vesalius, 1514–1564 гг.) обнаруживали желчные камни при вскрытии трупов. Но наиболее подробное исследование желчных камней и клинической картины холецистита в 1760 году представил Giovanni Morgagni. Химическое исследование желчных камней впервые было проведено С. Galeati (1746 г.), а А. Waeter (1796 г.) впервые создал атлас рисунков желчных камней [11; 33].

Несмотря на это, и в наше время, проблема ЖКБ остается достаточно актуальной. Примерно четверть населения земного шара старше 60 лет и треть населения старше 70 лет имеют камни желчного пузыря [97; 198]. Авторы из США установили, что приблизительно у 1 млн жителей этой страны ежегодно формируются желчные конкременты, а число холецистэктомий (ХЭ) в США достигает 600 000 в год [64]. В настоящее время в США насчитывается более 30 млн больных желчнокаменной болезнью и более 15 млн пациентов после перенесённой холецистэктомии, что составляет около 15 % от всего населения страны. Затраты на лечение пациентов с холелитиазом в США только в 2000 году составили 6 млрд долларов. Распространённость ЖКБ в Канаде достигает 25 %, причем на долю ЖКБ приходится около 130 тысяч госпитализаций в год. В Чили распространённость ЖКБ составляет 22–35 %, в Аргентине – около 20 %, в Перу – 13–14 %. Среди коренного населения Африки ЖКБ встречается редко – менее чем

в 1 % случаев [33; 101]. Так, в Нигерии на 7 000 брюшнополостных операций приходится всего две холецистэктомии. А у коренных американских индейцев распространённость желчнокаменной болезни среди мужчин племени пима составляет 45 %, а среди женщин доходит до 75 %. Американки мексиканского происхождения, унаследовавшие около 35 % генов от древних американских индейцев, примерно в 3 раза чаще страдают ЖКБ, чем афроамериканки, практически не имеющие американо-индейских генов [24]. В европейских странах показатели распространённости желчнокаменной болезни составляют, по данным разных исследователей, от 6 до 30 и даже до 40–50 % (например, в Швеции). В азиатских странах ЖКБ встречается существенно реже – в 3–6 % случаев. В России, по данным эпидемиологических исследований и оценкам экспертов, частота ЖКБ составляет от 5 до 25 % [33].

Кроме того, число осложнённых форм ЖКБ продолжает неуклонно расти и составляет в нашей стране 15–20 % от общего числа urgentных хирургических больных [29; 89]. Острый калькулёзный холецистит (ОКХ) занимает сегодня третье место в структуре неотложных хирургических заболеваний органов брюшной полости, уступая лишь острому аппендициту и острому панкреатиту. Больные острым калькулёзным холециститом составляют от 10 до 50 % от общего числа больных с острой хирургической патологией [32]. Число больных желчнокаменной болезнью каждые 10 лет увеличивается примерно в 2 раза [90; 106], а количество холецистэктомий в нашей стране достигает 100 000 в год [99], а по данным других авторов, превышает 120 000–150 000 в год [57]. У женщин желчнокаменная болезнь встречается в 2–6 раз чаще, чем у мужчин [32; 57; 175].

Согласно исследованиям ряда авторов, в последнее время прослеживается тенденция к увеличению заболеваемости в старших возрастных группах. По данным литературы, до 25 % населения старше 60 лет развитых европейских стран и около 33 % старше 70 лет имеют желчные камни. В среднем в развитых странах ЖКБ выявляется у 10–15 % взрослого населения [22; 32; 47; 57]. Согласно данным ведущих клиник, у людей пожилого и старческого возраста острый холецистит является одной из доминирующих проблем. Эти пациенты составляют

66 % общего числа больных острым холециститом [83; 132].

Однако, всё чаще встречаются упоминания о желчнокаменной болезни у детей и молодых людей. У детей это наследственно детерминированная болезнь печени и желчевыводящих путей (ЖВП), в основе которой лежит нарушение процессов холереза и холекинеза. Болезнь сопровождается непрерывно рецидивирующим воспалительным процессом, закономерным исходом которого является склероз и дистрофия желчного пузыря. Холелитиаз наблюдается у 0,1–1 % детей с заболеваниями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) [111]. А по данным украинских авторов, число детей, страдающих желчнокаменной болезнью, достигает 5 % [124]. Рост заболеваемости желчнокаменной болезнью у детей отмечают и зарубежные авторы. Согласно их данным, заболеваемость ЖКБ у детей колеблется от 0,15 до 0,22 %. Кроме того, исследователи отмечают, что химический состав желчных конкрементов у детей отличается от взрослых. Если у взрослых наиболее распространены холестериновые конкременты, то у детей преобладают пигментные [134]. Однако распространённость детского ожирения коррелирует с увеличением доли холестериновых камней [157].

В настоящее время основополагающую роль в развитии воспаления в желчном пузыре отводят микроорганизмам, в соответствующей литературе появляются сведения о выявлении микроорганизмов в различных биологических средах у больных желчнокаменной болезнью, острым калькулёзным холециститом [67; 87; 97].

Рутинные методы микробиологической диагностики имеют недостаток, такой, как длительность выявления микроорганизмов, а результаты исследования во многом зависят от соблюдения правил забора и транспортировки материала, которая должна осуществляться в самые короткие сроки. Кроме того, при помощи бактериологического метода достаточно сложно выявить труднокультивируемые микроорганизмы, например, анаэробные, роль которых в развитии воспаления желчного пузыря несомненна [28].

Альтернативные методы детекции микроорганизмов, такие, как метод газожидкостной хромато-масс-спектрометрии, применяются в клинической

практике достаточно давно [37; 78; 79; 80]. Однако в литературе не встречается данных о применении этого метода в выявлении микробного пейзажа гепатодуоденальной зоны у больных желчнокаменной болезнью, калькулёзным холециститом.

В последние годы появляются данные о бактериальных биоплёнках. Ранее считалось, что последние могут образовываться только на абиотических поверхностях, таких, как катетеры, контактные линзы и т. д., однако исследования показывают, что микробные биоплёнки играют ключевую роль в развитии хронических заболеваний. Находясь в биоплёнке, бактерии более защищены от воздействия неблагоприятных факторов, одним из которых являются антимикробные химиопрепараты, чем планктонные формы микроорганизмов [5; 14; 15; 23; 66; 109; 139; 148; 151; 180; 182]. Тем не менее, в литературе не встречается данных о возможности образования биоплёнок на поверхности желчных конкрементов, а также на слизистой оболочке желчного пузыря и, что более важно, на внутренней поверхности общего желчного протока (ОЖП).

Применение эмпирической антимикробной химиотерапии зачастую не даёт желаемого эффекта от лечения, применение вслепую антибиотиков широкого спектра действия не может гарантировать элиминацию патогенной флоры, однако, в то же время, может привести к дисбиотическим процессам ввиду массовой гибели нормальной микрофлоры кишечника [19; 133; 165].

Решение этих проблем может способствовать улучшению результатов лечения пациентов с желчнокаменной болезнью, калькулёзным холециститом.

Цель исследования

Улучшение результатов антимикробной химиотерапии у больных острым калькулёзным холециститом.

Задачи исследования

1. Провести анализ качественного и количественного состава микрофлоры биотопов пищеварительного тракта у больных калькулёзным холециститом.

2. Внедрить метод газожидкостной хромато-масс-спектрометрии для экспресс-диагностики микрофлоры желчного пузыря и динамического контроля клинической эффективности антибактериальной терапии у больных острым калькулёзным холециститом.

3. Изучить микробные биоплёнки на поверхности желчных конкрементов, слизистой оболочке желчного пузыря и внутренней поверхности общего желчного протока.

4. Повысить эффективность целевой антибактериальной терапии у пациентов с острым калькулёзным холециститом.

Научная новизна

Впервые использован метод газожидкостной хромато-масс-спектрометрии для детекции микроорганизмов билиарного тракта, участвующих в этиопатогенезе острого калькулёзного холецистита с определением коэффициента (0,12), позволяющего топически верифицировать источник метаболитов микрофлоры.

Впервые изучены микробные биоплёнки на поверхности и внутри желчных конкрементов, слизистой оболочке желчного пузыря и внутренней поверхности общего желчного протока при помощи сканирующей электронно-ионной микроскопии.

Предложен вариант повышения эффективности целевой антимикробной химиотерапии у больных острым калькулёзным холециститом, основанный на результатах применения газожидкостной хромато-масс-спектрометрии и электронно-ионной микроскопии в качестве диагностического метода и метода динамического контроля клинической эффективности проводимой терапии.

Практическая значимость работы

Изучены микробиологические особенности течения калькулёзного холецистита.

В клиническую практику внедрён метод экспресс-диагностики микрофлоры

при калькулёзном холецистите и метод динамического контроля клинической эффективности антибактериальной терапии у пациентов с острым калькулёзным холециститом.

Улучшены результаты антимикробной химиотерапии у больных острым калькулёзным холециститом, позволяющие сократить частоту развития послеоперационных осложнений инфекционно-воспалительного характера.

Положения, выносимые на защиту

1. При развитии желчнокаменной болезни существует взаимосвязь между формой калькулёзного холецистита, спектром и количеством аэробной, факультативно-анаэробной и анаэробной микрофлоры билиарного тракта.

2. При проведении газожидкостной хромато-масс-спектрометрии концентрация жирных кислот, альдегидов и стероидов в крови коррелирует с количеством микроорганизмов в пузырной желчи, желчном конкременте и биоптате стенки желчного пузыря, что позволяет применять этот метод в качестве топической диагностики и метода динамического контроля клинической эффективности проводимой антимикробной химиотерапии.

3. У больных калькулёзным холециститом на поверхности и внутри желчных конкрементов, на поверхности слизистой оболочки желчного пузыря и внутренней поверхности общего желчного протока присутствуют бактериальные биоплёнки, участвующие в патогенезе острого калькулёзного холецистита.

4. Ранняя диагностика микрофлоры билиарного тракта, участвующей в этиопатогенезе острого воспаления в желчном пузыре, а также целевая антимикробная химиотерапия позволяют снизить частоту послеоперационных осложнений и улучшить результаты комплексного лечения пациентов с острым калькулёзным холециститом.

Апробация работы

Основные положения работы представлены на Всероссийской научной конференции «Молодёжь и наука – третье тысячелетие» (Красноярск, 2007, 2008);

на Международной заочной научной конференции «Медицина: вызовы сегодняшнего дня» (Челябинск, 2012 г.); на 1-ой Международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины» (Москва, 2012); на 2-ой Всероссийской научной конференции молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012); на секции «Хирургия» IV (66) Международного научно-практического конгресса студентов и молодых учёных «Актуальные проблемы современной медицины» (Киев, 2012) по гранту Российского фонда фундаментальных исследований с научным проектом «Значение микробиологической диагностики при калькулёзном холецистите»; на 7-ой Всероссийской конференции общих хирургов с международным участием совместно с Пленумом проблемных комиссий «Неотложная хирургия» и «Инфекции в хирургии» Межведомственного научного совета по хирургии РАМН и Минздравсоцразвития России (Красноярск, 2012); на региональном очном этапе конкурса научно-инновационных проектов в рамках общероссийского научно-практического мероприятия эстафеты «Вузовская наука – 2013» (Томск, 2013); на Общероссийской научной конференции «Современные проблемы науки и образования» (Москва, 2014); на заседании Красноярского краевого научно-практического общества хирургов (Красноярск, 2015).

Диссертационная работа апробирована на заседании проблемной комиссии «Актуальные вопросы хирургии» ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (Красноярск, 2015).

Диссертация выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, номер государственной регистрации 01201456498.

Внедрение результатов работы

Клиническая апробация предложенных лечебно-диагностических

мероприятий проведена в хирургическом отделении КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 4», I хирургическом отделении КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 7», I хирургическом отделении НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Красноярск ОАО «РЖД»», хирургическом отделении ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера».

Методы диагностики и лечения внедрены в работу КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 4», КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 7», НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Красноярск ОАО «РЖД»», ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера».

Отдельные фундаментальные и прикладные положения работы включены в учебную программу кафедры общей хирургии им. проф. М. И. Гульмана ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России.

Изданы методические рекомендации «Микробиологическое обоснование оптимизации лечебно-диагностических мероприятий при калькулёзном холецистите».

Публикации

По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 6 статей в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученых степеней доктора и кандидата наук.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 230 страницах машинописного текста и состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Полученные результаты проиллюстрированы с помощью 23 таблиц и

63 рисунков. Указатель литературы представлен 201 источником, из которых 71 – зарубежных авторов.

Личный вклад автора

Состоит в разработке структуры и последовательности исследования, непосредственного участия на всех этапах работы, выполнении лечебно-диагностических мероприятий у больных калькулёзным холециститом (в т. ч. в выполнении оперативных вмешательств), систематизации материала, статистической обработке, анализе и интерпретации результатов.

Работа выполнена на кафедре общей хирургии им. проф. М. И. Гульмана ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (заведующий кафедрой – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, заслуженный деятель науки РФ Ю. С. Винник), кафедре микробиологии им. доц. Б. М. Зельмановича ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (заведующий кафедрой – кандидат биологических наук, доцент О. В. Перьянова), на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России (заведующий ЦНИЛ – доктор медицинских наук, профессор Ю. В. Котловский), на базе лаборатории анатомии микроорганизмов Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи (заведующий лабораторией – доктор медицинских наук Л. В. Диденко).

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Эпидемиология, этиопатогенез желчнокаменной болезни, калькулёзного холецистита

Желчнокаменная болезнь – полиэтиологическое, мультифакториальное и многостадийное обменное заболевание, характеризующееся образованием желчных камней в желчном пузыре (холецистолитиаз) и/или печеночных желчных протоках (внутрипечёночный холелитиаз), в общем желчном протоке (холедохолитиаз) [85].

Желчный камень – не свойственная человеку в нормальном состоянии структура или масса, организованная из плохо растворимых в желчи макромолекулярных веществ и состоящая в большинстве случаев из холестерина, которую обнаруживают в желчном пузыре (ЖП) или билиарном древе.

Калькулёз (calculosis), или камнеобразование – это процесс формирования конкрементов в желчном пузыре, почках или других органах и тканях организма [64].

В последние годы подтверждена существенная роль факторов риска в развитии желчнокаменной болезни. К ним относятся принадлежность к женскому полу, возраст, избыточная масса тела, беременность, приём эстрогенов, расовая принадлежность, наследственность, сахарный диабет, болезнь Крона, цирроз печени, гемолитическая анемия, гиперлипидемия. Кроме того, в литературе появились данные о наличии у большинства пациентов с ЖКБ (до 62 %) функционального нарушения эвакуаторной функции кишечника в виде «брадиаритмии». Это способствует избыточному поступлению холестерина в гепатобилиарную систему в результате его повышенной энтерогепатической циркуляции и является одним из предвестников образования конкрементов в желчном пузыре, которые почти в 80 % случаев содержат холестерин. Это позволяет говорить ещё об одном факторе риска в развитии ЖКБ – замедлении пассажа содержимого по кишечнику [98; 169].

Несмотря на тот факт, что мужчины реже страдают желчнокаменной

болезнью, авторами из Германии были представлены данные о том, что мужской пол является фактором риска развития тяжёлого воспаления желчного пузыря. Хотя механизм этого явления до сих пор остаётся до конца не изученным, из исследований видно, что у пациентов мужского пола гангренозная и гангренозно-перфоративная формы острого калькулёзного холецистита встречались чаще, чем у женщин на 8,7 и 23,2 % соответственно [135]. Также в литературе встречаются данные, указывающие на мужской пол как фактор риска сложной лапароскопической холецистэктомии [147; 186].

Генетические особенности желчнокаменной болезни мало изучены, хотя наследственная предрасположенность является одним из классических факторов её риска. Отмечается повышенная распространённость рассматриваемой патологии среди первого поколения родственников больных, страдающих ЖКБ. Частота калькулёзного холецистита среди родственников больных желчнокаменной болезнью составила 8,5 % против 2,2 % у здоровых лиц. Среди монозиготных близнецов конкордантными (идентичными по одному определённому признаку) по ЖКБ являются 26,6 %, а среди дизиготных – 6,5 %, отношение конкордантности монозигот к дизиготам для желчнокаменной болезни составляет 4,1, что сравнимо с таковым для сахарного диабета (4,9) и псориаза (4,7) [24].

Желчные камни можно классифицировать по химическому составу. Выделяют холестериновые, пигментные (коричневые и чёрные) и смешанные желчные конкременты. При этом используют следующие критерии: при содержании холестерина в конкременте, равном 50 % и более от его массы, конкремент относят к холестериновым камням; от 20 до 50 % – к мешанным; менее 20 % – к пигментным. Подвиды пигментных желчных камней различаются по химической характеристике пигмента: в чёрных желчных камнях преобладают билирубинаты кальция и полимеризованный билирубин, коричневые желчные камни содержат неконъюгированный билирубин и гидролизаты фосфолипидов. В европейской популяции и в США преобладают холестериновые камни (до 90 % от всех пациентов с холелитиазом) [30; 64; 102].

По форме различают желчные камни в виде тутовых ягод (31 %); чаще они холестериновые, очень быстро увеличиваются и наблюдаются преимущественно у женщин. Граненые (6 %) камни, чаще холестерин-пигментноизвестковые, наблюдаются в основном у мужчин, имеют меньшую тенденцию к росту. Смешанные конкременты могут иметь вид тутовых ягод или быть яйцеобразной формы [112].

Кристаллический моногидрат холестерина – главный компонент более чем 80 % желчных конкрементов. Холестерин выделяется гепатоцитами в желчный каналец наряду с лецитином в форме больших униламеллярных везикул. Механизмы формирования самих везикул и факторы, контролирующие этот процесс, изучены недостаточно и являются предметом активного исследования.

Выход везикул в желчь дополнительно обеспечивается синтезом эфиров холестерина, преобразованием холестерина в желчные кислоты, а также синтезом и секрецией липопротеинов очень низкой плотности. Желчь становится более насыщенной холестерином в результате её концентрирования в желчном пузыре.

Муцины слизи желчного пузыря не только ускоряют слияние везикул и начальное образование агрегатов с кристаллами холестерина, но и формируют вязкую гель-золь-матрицу, в которой фиксируются сформированные кристаллы и агрегаты, образуя вязкую гелеобразную субстанцию, получившую образные названия «сладж», или «желчный ил», или «желчная замазка». Ситуация усугубляется тем, что кристаллы холестерина и агрегаты сами способны стимулировать гиперсекрецию слизи слизистой оболочкой желчного пузыря, то есть формируется порочный круг [64].

Воспалительный процесс в слизистой оболочке желчного пузыря сопровождается гиперсекрецией белка, при этом гиперпродукция муцинов оказывает влияние на нуклеацию. В связи с этим отметим, что чилийские авторы, используя метод гибридизации, обнаружили присутствие рибосомальной РНК микроба из семейства *Helicobacter* у пациентов с желчными камнями в желчи и слизистой оболочки желчного пузыря. Они выдвинули предположение о

возможной патогенетической роли микроба *Helicobacter bilis* в развитии хронического воспаления слизистой оболочки желчного пузыря, которое отмечается у 90 % больных с холелитиазом [159].

Перенасыщение желчи холестерином сопровождается замедленным освобождением желчного пузыря, так как диффузия холестерина в плазматические мембраны гладкомышечных клеток приводит к нарушению их сократительной способности [64].

Различные нарушения микробиоценоза кишечника (синдром избыточного бактериального роста, дисбиоз толстой кишки) могут сопровождаться повышенной и преждевременной деконъюгацией желчных кислот (ЖК), особенно при избыточном росте анаэробной флоры. Это приводит к увеличению содержания токсичных вторичных ЖК (прежде всего, литохолевой и деоксихолевой) и уменьшению продукции третичной желчной кислоты – урсодеоксихолевой. Результатом дисбиотических изменений являются повреждение эпителия кишечника (как токсичными желчными кислотами, так и ферментами и эндотоксинами бактерий) и нарушение моторно-эвакуаторной функции кишечника. Всё это ещё больше усугубляет нарушенный метаболизм ЖК, способствуя повышению литогенности желчи и образованию желчных камней. Кроме того, нарушаются функции печени, включая деятельность купферовских клеток и системы мононуклеарных макрофагов, формируется и прогрессирует дислиппротеинемия [33; 53].

Известно, что при холецистолитиазе печень секретирует желчь с повышенной концентрацией желчных кислот, в основном за счёт вторичных тауро- и гликоконъюгатов дезоксихолевой кислоты. В желчном пузыре больных ЖКБ степень концентрации суммарных холатов значительно ниже, чем в норме. При этом сохраняется превалирование вторичных желчных кислот, а конценрация глико- и таурохолевой кислот достоверно ниже нормы. По-видимому, при холецистолитиазе стенка желчного пузыря избирательно реабсорбирует отдельные кислоты, преимущественно первичные, что способствует возрастанию уровня вторичных холатов, обладающих повышенной гидрофобностью [63]. Также это

может быть связано с тем, что у больных желчнокаменной болезнью в составе кишечной микрофлоры увеличивается концентрация 7- α -дегидроксилирующих бактерий рода *Clostridium*, трансформирующих первичные желчные кислоты во вторичные [164]. Пул желчных кислот восстанавливается за счёт интенсификации энтеро-гепатической циркуляции и увеличения квоты дезоксихолата, что сопровождается увеличением секреции холестерина и фосфолипидов печенью [63; 149]. В литературе имеются данные о том, что в будущем планируется при помощи генной инженерии создать кишечные бактерии с пониженной способностью к образованию дезоксихолатов или внедрить применение заместительной терапии в отношении 7- α -гидроксилазы [201].

Пигментные желчные конкременты, составляющие примерно 20 % от общего количества желчных камней, содержат кальция билирубинат наряду с другими нерастворимыми солями кальция (карбонаты, фосфаты, пальмитаты). Чёрные конкременты образуются в результате взаимодействия неконъюгированного билирубина с кальцием уже при низких концентрациях, при этом формируются нерастворимые соли. Через некоторое время билирубин в таких осадках окисляется и за счёт ковалентного связывания полимеризуется с образованием субстанций чёрного цвета. Такие полимеры билирубина нерастворимы в большинстве известных растворителей. Кроме того, в таких камнях в значительных количествах присутствуют пигменты типа порфиринов, имеющие неспаренные электроны, в результате чего создаются условия для дальнейшей полимеризации и ещё большей нерастворимости камня.

Коричневые желчные конкременты образуются в ситуациях, приводящих к застою желчи в сочетании с контаминацией её бактериями, гидролизующими конъюгированный билирубин и фосфолипиды. В результате происходит повышение концентрации билирубина и жирных кислот, достаточное для образования и преципитации плохо растворимых билирубинатов кальция и кальциевых солей жирных кислот [64].

На сегодняшний день имеется множество классификаций желчнокаменной болезни: по D. M. Small (1974 г.), X. X. Мансурова (1982 г.), Ю. М. Дедерера и

соавт. (1983 г.), С. А. Дадвани и соавт. (2000 г.), И. И. Дегтяревой и И. Н. Скрыпник (2000 г.) [30; 31; 128].

Современное понимание механизмов формирования желчных камней базируется на многочисленных исследованиях, в результате которых доказано, что ЖКБ является результатом образования дестабилизированной желчи повреждёнными гепатоцитами, последующей нуклеации кристаллов моногидрата холестерина, кристаллизации в муциновом матриксе на фоне гипомоторной дисфункции желчного пузыря. Эти факты послужили основой для разработки классификации ЖКБ, рекомендованной к применению в клинической практике на 3-ем съезде научного общества гастроэнтерологов России (А. А. Ильченко, 2004 г.).

Авторы классификации оговаривают, что становление ЖКБ не всегда проходит последовательно приведённые стадии. Так, осложнения заболевания могут наблюдаться на любом этапе, в том числе на его первой стадии [33; 43; 44; 128].

По нашему мнению, классификация А. А. Ильченко наиболее полно отражает стадийность процесса, его локализацию, состав конкрементов и клиническое течение заболевания.

Современные классификации холецистита в основном являются усовершенствованными классификациями Керра (1907 г.), Ашоффа (1909 г.) и С. П. Федорова (1934 г.) – классификации Д. Ф. Скрипниченко (1970 г.), А. М. Джавадяна и Л. Б. Крылова (1976 г.), В. И. Стручкова и соавт. (1978 г.), В. И. Мамчич (1982 г.), А. А. Шалимова и соавт. (1993 г.).

Классификация В. Н. Чернова и И. В. Суздальцева (2002 г.):

а) острый неосложнённый холецистит:

1) острый транзиторно-обтурационный холецистит (бескаменный, калькулёзный) – с нестойкой обтурацией пузырного протока;

2) острый стабильно-обтурационный холецистит (бескаменный, калькулёзный) – со стойкой обтурацией пузырного протока:

- катаральный;

- деструктивный (флегмонозный, гангренозный);

б) острый осложнённый холецистит: перфорация желчного пузыря, холедохолитиаз, холангит, склерозирующий папиллит, острый панкреатит, перитонит местный или разлитой, гепаторенальный синдром, перивезикальный абсцесс и прочие [32; 102; 112].

Клинико-морфологическая классификация острого холецистита
В. С. Савельев, А. И. Кириенко (2009 г.):

а) форма холецистита:

- катаральный;
- флегмонозный;
- гангренозный;

б) осложнения:

- околопузырный инфильтрат;
- перивезикальный абсцесс;
- перфорация жёлчного пузыря;
- перитонит;
- механическая желтуха;
- холангит;
- наружный или внутренний жёлчный свищ [50].

1.2 Диагностика и лечение желчнокаменной болезни, калькулёзного холецистита

В последние три десятилетия достигнуты значительные успехи в решении вопросов диагностики, во многом обусловленные прогрессом в области разработки медицинской техники и фундаментальных наук. Благодаря этим достижениям во врачебной практике появились эффективные методы диагностики: ультразвуковое исследование (УЗИ), компьютерная томография (КТ), магнитно-ядерная томография (МЯТ), прямые методы контрастирования билиарного тракта.

Наряду с этим утратили своё значение такие методы исследования, как пероральная холецистография и внутривенная холеграфия. Широкий спектр диагностических и лечебных методов привёл к пересмотру стратегии и тактики при ЖКБ [32].

Первое упоминание о применении УЗИ для диагностики заболеваний печени и ЖВП принадлежит J. Ludwig (1950 г.). УЗИ, с использованием современных ультразвуковых аппаратов с цветовым картированием и возможностью получения трёхмерного изображения, по праву заняло лидирующее положение в диагностике ЖКБ. К основным преимуществам УЗИ относят неинвазивный характер метода, отсутствие лучевой нагрузки, мобильность, возможность многократного повторения, полипозиционного исследования, а также возможность выполнения других диагностических и лечебных процедур под ультразвуковым наведением. УЗИ, выполняемое на современных аппаратах с высокой разрешающей способностью, по своей чувствительности и специфичности превышает 95 %. Возможно выявление камней до 2 мм в диаметре. При УЗИ определяют размеры желчного пузыря, степень утолщения стенки желчного пузыря, выявляют его перегибы, перетяжки, внутрисполостные структуры – камни, полипы, билиарный песок. Оправдано проведение нагрузочных проб для изучения функциональной активности ЖП (сократительная способность). С помощью УЗИ можно определить расширение внутри- и внепеченочных протоков, наличие в них конкрементов (в 50–60 % наблюдений). В случае расширения при УЗИ общего желчного протока более 7–8 мм вероятность возможного холедохолитиаза достигает 75 %. Также важно оценить состояние поджелудочной железы [26].

Эндоскопическое УЗИ является более инвазивным и дорогим методом исследования по сравнению с обычным УЗИ. Чувствительность метода в выявлении камней общего желчного протока достигает 93 %, специфичность – 95 %. В последнее время появляются работы, свидетельствующие о высокой эффективности внутрипротокового УЗИ, выполняемого с помощью тонких гибких датчиков, проводимых через рабочий канал эндоскопа. Метод позволяет с

высокой чувствительностью (98 %) и специфичностью (92 %) выявлять протоковые опухоли, конкременты и другие патологические изменения желчных протоков. Интраоперационное УЗИ (ИОУЗИ) впервые было использовано для выявления камней в желчных протоках в 1963 г. Технические достижения последних лет обеспечили ИОУЗИ наибольшую чувствительность в выявлении поражений печени, желчных протоков и поджелудочной железы. С развитием лапароскопической холецистэктомии (ЛХЭ) вновь оживились дискуссии о средствах и необходимости пред- и интраоперационного обследования желчных протоков с целью выявления холангиолитиаза, возможных аномалий протоковой системы. Лапароскопическое ИОУЗИ является высокочувствительным методом в выявлении камней, аномалий протоков и опухолей, занимает меньше времени, чем интраоперационная холангиография, не сопровождается лучевой нагрузкой на пациента и медицинский персонал [26; 30].

В настоящее время широкое применение в диагностике заболеваний печени нашла компьютерная томография. Метод впервые предложен и разработан в Великобритании в 1961–1972 годах G. Hounsfield. В настоящее время применяются аппараты различных форм и конфигураций. КТ позволяет выявить очень тонкие структурные изменения в органах, не прибегая к инвазивным методам. Рентгенонегативные конкременты с помощью КТ не определяются, при этом отмечается только неомогенность содержимого пузыря. Хорошие результаты получены в диагностике таких осложнений ЖКБ, как эмпиема, водянка желчного пузыря. Возможности КТ в обнаружении камней общего желчного протока ограничены. Камни видны лишь при их высокой плотности и рентгеноконтрастности. Неизменённые желчные протоки без контрастирования не визуализируются. При нарушении оттока желчи выявляются расширенные как внутри-, так и внепечёночные желчные протоки, при этом удаётся установить и уровень обтурации. Это позволяет применять КТ в дифференциальной диагностике желтух [95; 113].

Эндоскопическая ретроградная холангиопанкреатография (ЭРХПГ) основана на одновременном проведении фиброэзофагогастродуоденоскопии

(ФЭГДС) и рентгенологического исследования желчных и панкреатического протоков путём их трансдуоденального заполнения контрастным веществом [27; 95].

Многие годы ЭРХПГ остаётся основным методом в диагностике холангиолитиаза. Камни в просвете общего желчного протока и общего печёночного протока выявляются как дефекты наполнения различного размера (чувствительность ЭРХПГ составляет 95 %). Важно отметить, что ЭРХПГ из диагностической процедуры может быть трансформирована в лечебную (эндоскопическая папиллосфинктеротомия (ЭПСТ), супрапапиллярная холедоходуоденостомия, экстракция и дробление камней, назобилиарное дренирование при гнойном холангите, желчной гипертензии). Прямые методы холецистохолангиографии более инвазивны, сопровождаются большей лучевой нагрузкой, чем не прямые, однако, как правило, их информативность намного выше, менее выражен резорбтивный эффект рентгеноконтрастного вещества [30; 120; 197].

Магнитно-резонансная панкреатохолангиография (МРХПГ) – современный метод в диагностике заболеваний гепатопанкреатодуоденальной зоны (ГПДЗ). Он позволяет без введения контрастных веществ и при отсутствии лучевой нагрузки с высокой точностью установить причину и уровень механической желтухи, характер содержимого желчевыводящих путей, а также наличие конкрементов в желчном пузыре и желчных протоках. Кроме того, имеется возможность построения трёхмерной проекции не только исследуемого органа, но и окружающих его тканей и сосудов. Отсутствие лучевой нагрузки даёт возможность использовать метод для динамического контроля [7; 171].

Интраоперационная холагиография и холангиоскопия позволяют выявить конкременты в желчных протоках у 7–12 % пациентов, у которых до оперативного вмешательства их наличие не подозревалось. Это высокоточный метод выявления патологии билиарной системы непосредственно на операционном столе путём контрастирования желчных путей и рентгенологического контроля [21; 32; 129].

Лечению должны подлежать как больные с симптоматической желчнокаменной болезнью, так и бессимптомные камненосители. Это обусловлено риском развития внезапных осложнений, таких как механическая желтуха, острый деструктивный холецистит, деструктивный панкреатит и т. д. Кроме того, длительное течение ЖКБ может стать причиной развития рака желчного пузыря. К выбору метода лечения нужно подходить индивидуально с учётом особенностей течения заболевания у каждого конкретного больного, наличия сопутствующих патологий, осложнений основного заболевания, физического состояния пациента [117; 130].

Методы лечения ЖКБ можно условно подразделить на инвазивные (хирургические), малоинвазивные и неинвазивные [33; 34; 99; 101].

Основным недостатком литолитической терапии является её невысокая эффективность. Даже при строгом отборе больных растворить камни или уменьшить их размеры удаётся примерно в 60 % случаев, причём эффект достигается при мелких чисто холестериновых конкрементах. Недостаточно высокая эффективность ограничивает применение литолитической терапии как самостоятельного метода лечения ЖКБ [32].

Одним из методов лечения ЖКБ является малоэффективная экстракорпоральная ударноволновая литотрипсия с большим количеством противопоказаний [25; 42; 124].

Неоперативным методам лечения присущ один существенный недостаток – непатогенетичность терапии. Ожидать хороших результатов лечения при их применении в отдалённом периоде не приходится, так как нет возможности воздействовать на все звенья патогенеза заболевания, ещё остаётся желчный пузырь – орган, формирующий конкременты. Вот почему оперативное лечение желчного пузыря рассматривается как радикальный метод лечения ЖКБ, избавляющий больного от желчных колик и опасных осложнений [32].

Именно поэтому на сегодняшний день методом выбора в лечении ЖКБ является оперативное лечение, заключающееся в удалении желчного пузыря посредством традиционного лапаротомного, лапароскопического и

мини-лапаротомного доступов.

Впервые холецистэктомию выполнил немецкий хирург Лангенбух в 1882 году, в России – Ю. Ф. Кассинский в 1886 году. При традиционной холецистэктомии (ТХЭ) применяются различные лапаротомные доступы, предпочтительными считаются верхнесрединный или подрёберный справа по Фёдорову, Кохеру [51]. Удалить желчный пузырь можно, выделяя его от дна в направлении шейки или от шейки ко дну. Выбор способа зависит от выраженности патологических изменений в области печёочно-дуоденальной связки и треугольника Кало, а также опыта оперирующего хирурга [50].

В 70-х годах в городе Свердловске профессор И. Д. Прудков заложил основы хирургии малых доступов. В 1985 г. из такого доступа была выполнена первая мини-инвазивная холецистэктомия (МХЭ). В начале 1990 г. началась разработка, а затем и производство инструментов, составляющих современную основу метода. Комплект инструментов для мини-лапаротомии с элементами открытой лапароскопии производится медицинской компанией «САН» г. Екатеринбурга. Основой метода является кольцевидный ранорасширитель с набором регулируемых ретракторов (зеркал). Это позволяет выполнить холецистэктомию через разрез передней брюшной стенки длиной всего 3–5 см [127]. При правильном использовании инструментов операция технически не отличается от традиционного вмешательства, сохраняя при этом все достоинства малоинвазивных операций. Она выполняема при любых формах ЖКБ и её осложнениях.

Техника малоинвазивного метода позволяет во время хирургического вмешательства помимо холецистэктомии произвести интраоперационную холангиографию, эндоскопическое исследование протоков, а также осуществить сложные реконструктивные операции на внепечёчных желчных протоках. К недостаткам метода можно отнести невозможность выполнения полноценной визуальной и пальпаторной ревизии всех отделов брюшной полости [30; 50; 68; 69]. Преимущества холецистэктомии из мини-доступа, как и обычной холецистэктомии, заключаются в использовании привычной для хирурга техники,

возможности полноценной ревизии желчных путей, выполнении холецистэктомии «от дна» и ушивании ложа желчного пузыря, что технически сложно при лапароскопическом вмешательстве [1; 90; 116; 179]. Важным преимуществом по сравнению с ЛХЭ является экономическая эффективность мини-лапаротомного доступа. По данным зарубежных авторов, стоимость мини-инвазивной холецистэктомии на 29 % меньше, чем лапароскопической [140].

Тем не менее, после векового применения (с 1882 г.) традиционная технология холецистэктомии уступила пальму первенства лапароскопической холецистэктомии. Согласно литературным данным, первым выполнил эту операцию французский хирург Ф. Дюбуа в 1987 году. Сегодня ЛХЭ является «золотым стандартом» планового хирургического лечения больных ЖКБ во всем мире. Залогом успешного внедрения и распространения ЛХЭ стало решение практически всех недостатков традиционной холецистэктомии [13; 51; 122; 168; 172]. В российских клиниках ЛХЭ является методом выбора в течение последних 20 лет, с того момента, как в 1991 году в РНЦХ РАМН профессорами Ю. И. Гальпериным и А. Д. Тимошиным впервые было выполнено подобное вмешательство [104]. А в последнее десятилетие ЛХЭ стала рутинным методом лечения острого и даже деструктивного холецистита [46; 59]. Абсолютными противопоказаниями считаются: тяжёлая патология сердца, выраженные нарушения свёртывающей системы крови, портальная гипертензия, острый холангит, разлитой перитонит. Относительные противопоказания: ожирение, острый холецистит, перенесённые операции на верхнем этаже брюшной полости, беременность. Метод ЛХЭ позволяет выполнять интраоперационную холангиографию и решать вопрос о холедохотомии. Также современные технологии позволяют выполнить интраоперационную холедохоскопию [50; 51; 160; 167; 192]. В последние годы технический прогресс и стремительно развивающиеся хирургические технологии обусловили появление двух новых эндоскопических методов ХЭ [123].

NOTES (Natural Orifices Transluminal Endoscopic Surgery), или транслюминальный доступ – метод, позволяющий получить непосредственный

доступ в брюшную полость через естественные отверстия организма, не нарушающий целостность передней брюшной стенки и объединяющий навыки эндоскопии и малоинвазивной хирургии [58; 122; 123; 190].

SILS (Single Incision Laparoscopic Surgery) или хирургия единого лапароскопического доступа – это современная малоинвазивная технология, с помощью которой хирургическое вмешательство осуществляется через один троакарный доступ [122; 123; 141; 166; 184; 187; 188].

Альтернативой холецистэктомии при остром калькулёзном холецистите у пациентов с высоким риском операционной смертности и осложнений является чрескожная холецистостомия [174].

Впервые холецистостомию выполнил Petit в 1743 г. Вначале операция получила широкое применение, но после того, как Langenbuch (1884) доказал преимущества ХЭ, была почти полностью оставлена. В конце 20-х годов наступило возрождение холецистостомии, а в настоящее время показания к этой операции вновь ограничены, однако почти все хирурги в определённой ситуации её применяют. По данным различных авторов, холецистостомия составляет от 0,4 до 25 % всех операций, выполняемых на желчном пузыре. В основном холецистостомию производят у больных пожилого и старческого возраста с высоким риском операции, по жизненным показаниям и в особо критических ситуациях. Основной операцией при остром холецистите является холецистэктомия с полноценной коррекцией сопутствующих изменений в ЖВП. И лишь у больных пожилого и старческого возраста с тяжёлыми сопутствующими заболеваниями операцию в первые 3-е суток целесообразно заменить менее травматичным вмешательством – декомпрессией ЖП, которая может быть выполнена под контролем лапароскопии, УЗИ, КТ, а при отсутствии необходимой аппаратуры и инструментария – наложением холецистостомы. Согласно литературным данным, в подавляющем большинстве случаев, холецистостомия является лишь симптоматической мерой, и для излечения больных, как правило, требуется повторная операция – удаление желчного пузыря. Поэтому, в настоящее время, холецистостомия рассматривается лишь как этап лечения

больных с острым калькулёзным холециститом пожилого и старческого возраста, так как этапный подход с включением малоинвазивной декомпрессии желчного пузыря в комплексе лечения больных с острым холециститом с высоким операционным риском позволяет подготовить больных ко второму этапу операции, в оптимальных условиях выполнять малоинвазивные оперативные вмешательства у большинства из них и снизить послеоперационную летальность [76; 96; 112; 124; 181].

По нашему мнению, органосохраняющие операции на желчном пузыре обладают существенным недостатком – непатогенетичностью, что является причиной частых рецидивов ЖКБ. «Золотым стандартом» в лечении желчнокаменной болезни была и остаётся холецистэктомия.

1.3 Микробиологический аспект желчнокаменной болезни

1.3.1 Классические методы микробиологической диагностики

Большой интерес представляют данные, посвящённые роли инфекции в образовании желчных камней. Точки зрения по этому вопросу в разные периоды изучения проблемы существенно отличались друг от друга. Так, Aschoff (1909 г.) считал, что желчнокаменная болезнь в асептических условиях начинается с образования холестериновых камней. Дальнейшему росту их способствует вспышка инфекции. Проведённые позже микроскопические и бактериологические исследования стенки желчного пузыря, камней и желчи в аэробных и анаэробных условиях показали, что аэробные бактерии имеются у 14,3 % больных, а анаэробные – у 2,5 % (Р. А. Иванченкова и соавт., 1985 г.; Х. Х. Мансуров и соавт., 1985 г.; I. Makі и соавт., 1982 г.). Ю. М. Дедерер и соавторы (1983 г.) приводят схему начальных этапов литогенеза, в которой одно из центральных мест среди индуцирующих факторов занимает анаэробная инфекция [112].

В последнее время появился ряд работ, освещающих микробиологический

аспект проблем ЖКБ, доказывающих важную роль микроорганизмов в развитии заболеваний билиарного тракта и образовании конкрементов [38; 67; 71; 97; 118]. Авторы, в том числе и зарубежные, в своих исследованиях показывают возможность персистенции бактерий в желчных путях [145; 146]. А в качестве причины инициации литогенеза стали всё активнее упоминать участие чужеродных белков, в роли которых могут выступать инфекционные агенты [93; 105; 163].

В ЖП у практически здоровых людей микроорганизмы не обнаруживаются, поскольку желчь обладает антибактериальными свойствами. При воспалительных процессах гепато-билиарной системы и панкреато-дуоденальной зоны из желчи высеваются бактерии, относящиеся к семейству *Enterobacteriaceae* (кишечная палочка, сальмонеллы, клебсиеллы, энтеробактер), энтерококки, клостридии, пептококки, анаэробные бактерии – бактероиды и пропионбактерии. По данным L. Stewart и соавт., бактерии, продуцирующие слизь, β -глюкоронидазу и фосфолипазу, определяют формирование пигментных камней (билирубинат кальция), бактерии, продуцирующие только β -глюкоронидазу и фосфолипазу – смешанных, а бактерии, продуцирующие только слизь – холестериновых. Увеличение β -глюкуронидазной активности желчи приводит к расщеплению конъюгатов билирубина, и образовавшийся в результате билирубин служит субстратом для образования камней [93; 131; 136; 155; 183].

На сегодняшний день медицина имеет в арсенале более чем достаточно как прямых, так и косвенных методов выявления микроорганизмов в биологических средах организма. В их число входят такие, как классический бактериологический метод, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) и масс-спектрометрии.

Бактериологический метод (БМ) является самым простым и доступным методом, не требующим дорогостоящего оборудования и специальных навыков. Бактериологический метод известен достаточно давно и, несмотря на всё большее распространение иммуноферментных, серологических и других методов выявления микроорганизмов, остаётся основным. Бактериологический метод

заключается в посеве исследуемого материала на питательные среды. Этот метод позволяет выделить возбудителя в чистом виде и изучить его морфологические признаки, ферментативную активность, идентифицировать его [88].

Главным недостатком БМ можно назвать его длительность – от 48 до 96 часов. Кроме того, результаты микробиологических исследований во многом зависят от правильного выбора, соблюдения всех правил отбора материала и направления его в лабораторию. Материал необходимо взять в ранние сроки заболевания, до начала антимикробной терапии, в достаточном количестве. Следует исключить попадание в материал антибиотиков, антисептиков, дезинфектантов. При заборе, хранении и направлении материала в лабораторию строго соблюдаются правила техники бактериологической безопасности. После взятия материала его в максимально короткие сроки направляют в лабораторию в специальных контейнерах, которые после использования подвергаются дезинфекции. Нарушение правил забора, получение непрезентативных клинических образцов, неправильная и несвоевременная их доставка в лабораторию – всё это снижает достоверность результатов бактериологических исследований и ведёт к неверно полученным результатам. Срок доставки материала в лабораторию не должен превышать 2 ч. Необходимо учитывать, что при длительном хранении материала происходит гибель наиболее требовательных к определённому составу среды и температурному режиму видов микроорганизмов и размножение менее требовательных и медленно растущих видов. Это приводит к нарушению количественного соотношения возбудителя и дезориентирует врача-микробиолога при интерпретации результатов [28].

На первом этапе производится микроскопия с использованием светового микроскопа (если необходимо, с применением иммерсионного масла) и посев на плотные питательные среды, целью которого является получение изолированных колоний.

На втором этапе изучаются культуральные свойства бактерий. Исследуются окрашенные мазки и производится посев на скошенный агар для выделения чистой культуры [65].

Основной метод окраски мазков – по Граму, который позволяет отнести микроорганизм к грамотрицательным или же к грамположительным. Небольшое количество генцианвиолета наносится на препарат, экспозиция 2 минуты. Избытки краски сливаются в лоток, а на препарат при помощи пипетки наносится несколько капель раствора Люголя на 1 минуту. Далее препарат обесцвечивается несколькими каплями этилового спирта, экспозиция не должна превышать 30 секунд. Мазок тщательно промывается водой, а затем наносится раствор фуксина на 2 минуты [88].

Далее идентифицируют чистую культуру по морфо-тинкториальным, биохимическим и другим свойствам. Особые трудности возникают при выделении анаэробных микроорганизмов, так как они очень чувствительны к кислороду, в присутствии которого их рост невозможен, а значит, возможны ложноотрицательные результаты. Хотя аэротолерантные анаэробы достаточно хорошо растут на поверхности агара при низком, но ощутимом уровне кислорода в атмосфере. Для создания анаэробии используют анаэроостат и восстановительные агенты, которые добавляют в большинство сред, предназначенных для культивирования анаэробов, чтобы снизить окислительно-восстановительный потенциал и сбалансировать его на оптимальном уровне [65].

Так, по данным бактериологического исследования микрофлоры, установлено, что высеваемость различных представителей микрофлоры из желчи в среднем составила 22,6 %, из стенки желчного пузыря – 19,8 %, из брюшной полости – 5,2 %, а из операционной раны – 10,7 %. Преобладающей является грамотрицательная аэробная и анаэробная флора, и, наряду с монокультурами, выделяются и ассоциации микроорганизмов. При этом сочетания неклостридиальных анаэробных бактерий с аэробной и факультативно-анаэробной микрофлорой обнаружены у 49,2–89,1 % больных [87].

По результатам некоторых исследований, частота бактериохоллии у больных с ЖКБ составляет 22–60 % при хроническом холецистите, 50–98 % при остром холецистите, 32–58 % при стриктурах общего желчного протока, 58–95 % при холедохолитиазе [67].

По данным других авторов, микробиологическое исследование показывает, что высокий процент положительных результатов посевов наблюдается при флегмонозном (ФКХ) – 85,7 % – гангренозном (ГКХ) калькулёзном холецистите – 84,2 %. Процент высеваемости микроорганизмов при остром катаральном холецистите составляет достаточно скромную цифру 12,9 %, что обусловлено, по-видимому, небольшой продолжительностью воспалительного процесса в желчном пузыре и отсутствием контаминации данного биотопа, основными микроорганизмами, характерными для данной патологии, стали *E. coli*, *E. faecium* и *Actinomyces spp.* При ФКХ в монокультурах выделяются из желчи представители семейства *Enterobacteriaceae*; обнаруживаются ассоциации микроорганизмов, представленные *E. faecium* и *S. epidermidis*, *Candida albicans* и *S. epidermidis*. ГКХ характеризуется выделением из желчи больных *E. coli* в три раза чаще, чем *Enterococcus spp.* Синегнойная палочка чаще всего выделяется при ФКХ (около 20 %). Спектр микроорганизмов у пациентов с флегмонозным калькулёзным холециститом включал также стафилококки (20 %), в равных долях *E. coli* и *E. faecium* (13,3 %); *C. albicans*, *K. pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Moraxella spp.* и *P. constellatus* по 6,6 % соответственно [97].

На наш взгляд, традиционный бактериологический метод оправдывает себя при выявлении легкокультивируемых микроорганизмов и определения их чувствительности к антимикробным препаратам. Для идентификации анаэробных микроорганизмов следует отдать предпочтение другим методам.

1.3.2 ПЦР-диагностика и газожидкостная хромато-масс-спектрометрия в идентификации инфекционного агента при калькулёзном холецистите

Для идентификации труднокультивируемых анаэробных микроорганизмов возможно применение метода полимеразной цепной реакции. Относительная простота исполнения, высокая чувствительность и специфичность позволила методу найти достаточно широкое применение и быстро распространиться по всему миру. ПЦР – это искусственный процесс амплификации (многократного

копирования) ДНК с определённой последовательностью, который проводится при помощи ДНК-полимеразы на основе праймеров *in vitro*. Праймеры представляют собой короткоцепочечные ДНК с известной последовательностью нуклеотидов. Они необходимы для реакции, так как ДНК-полимераза не может начать синтезировать новую цепь «с нуля». Как и в естественных условиях, двигаясь по матрице – одинарной цепи, ДНК-полимераза присоединяет к праймеру нуклеотиды. Специфичность метода ПЦР обусловлена способностью праймеров «узнавать» и присоединяться к определённому участку ДНК согласно принципу комплементарности. В обычной реакции используется два праймера, которые «отграничивают» амплифицируемый участок с обеих сторон, связываясь с противоположными цепями ДНК-матрицы [60].

На практике метод ПЦР очень привлекателен возможностью быстрой идентификации (в течение нескольких часов) прихотливых микроорганизмов, плохо растущих на питательных средах, требующих специальных условий или не культивируемых *in vitro*. Это относится к микобактериям, микоплазмам, пневмококкам, гемофилам, бледной трепонеме, облигатным анаэробам. Наиболее распространён вариант ПЦР *specific PCR*, при котором праймер комплементарен специфической последовательности ДНК для конкретного микроорганизма. Имеется также возможность использования нескольких пар видоспецифичных праймеров в одной реакционной пробирке, что ускоряет анализ [60].

По данным некоторых исследований, метод ПЦР находит применение в исследовании микрофлоры желчного пузыря. Так, при деструктивных формах ОКХ в крови, биоптате стенки желчного пузыря и желчи обнаруживается ДНК анаэробных микроорганизмов. Наибольший процент идентифицированных монокультур анаэробных микроорганизмов получен при исследовании пузырьной желчи (86,2 %) и биоптата стенки желчного пузыря (92,1 %) [97].

По нашему мнению, для выявления анаэробной микрофлоры бактериологическому методу стоит предпочесть ПЦР-диагностику, так как она характеризуется высокой скоростью, производительностью, специфичностью, чувствительностью. Несмотря на все достоинства, ПЦР может выдавать как

ложноположительный, так и ложноотрицательный результат, кроме того, метод требует специального оборудования и является достаточно дорогостоящим.

Ещё один из современных и наиболее перспективных методов определения микроорганизмов в биологических средах – хроматография.

Хроматография включает группу аналитических методов, применяемых для разделения смесей соединений на основании определённых физических свойств отдельных веществ.

Принцип, лежащий в основе процесса – избирательное распределение компонентов смеси между двумя несмешивающимися фазами: подвижной и неподвижной. Неподвижной фазой могут быть твёрдое вещество или жидкость, закреплённая на пористом носителе, а подвижной – жидкость или газ. Разновидность хроматографии, в которой роль неподвижной фазы играет жидкость, а подвижной фазой является газ, называется газожидкостная хроматография (ГЖХ).

На сегодняшний день ГЖХ – это универсальный метод разделения смесей разнообразных веществ, испаряющихся без разложения. При этом компоненты смеси перемещаются по хроматографической колонке в потоке газа (подвижная фаза) и оседают на жидкости, находящейся внутри колонки (неподвижная фаза). Принцип разделения смеси веществ заключается в различном сродстве компонентов смеси с подвижной и неподвижной фазой. Компоненты смеси избирательно удерживаются стационарной фазой, а затем поэтапно выходят из колонки и регистрируются детектором. Сигналы детектора отображаются графически самописцем или выводятся на монитор компьютера [37].

В качестве носителя неподвижной фазы используют адсорбенты с поверхностью $0,5\text{--}3,0\text{ м}^2/\text{г}$ и с размером пор $0,5\text{--}1,5 \times 10^{-3}\text{ мм}$. Наиболее часто используют диатомитовые носители, стеклянные шарики, силикагель и политетрафторэтилен. Неподвижные фазы должны быть химически и термически стабильны, смачивать носитель и наноситься на его поверхность равномерной плёнкой. Известно более тысячи неподвижных жидких фаз, достаточно часто используется около 100. По химическому составу неподвижные фазы делят на

следующие классы: углеводороды (предельные углеводороды, смеси предельных и непредельных углеводородов, ароматические углеводороды); силоксаны с радикалами различной полярности (неполярными, среднеполярными и полярными); эфиры простые и сложные, полиэфиры, полигликоли; фталаты и фосфаты [121].

Масс-спектрометрия – один из наиболее мощных и информативных методов исследования структуры органических соединений и химического анализа сложных веществ и их смесей. Это прямой метод, позволяющий непосредственно определять молекулярную массу, элементный состав молекул и их фрагментов, их связь между собой и взаимное расположение, изучать механизмы фрагментации. Применимость и аналитические качества масс-спектрометрии в значительной мере определяются возможностью её комбинации с другими методами, такими, как газовая хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез и пиролиз. Одно из первых мест в органическом анализе занимает хромато-масс-спектрометрия, которая благодаря непосредственной связи получаемых данных со структурой органических молекул обеспечивает высокую селективность определения, а также возможность идентификации неизвестных соединений в сложных смесях [52, 114].

Результаты хроматографического исследования представляются графически на хроматограмме. На ней каждому компоненту смеси соответствует отдельный пик. Время от начала хроматограммы до времени удерживания называется временем удерживания (t_R), которое является физико-химической характеристикой вещества, как показатель преломления и плотность. Качественный состав смеси определяется при помощи сопоставления времени удерживания исследуемого вещества и эталона – известного вещества. Для этого в пробу может добавляться это самое вещество, при этом количество пиков на хроматограмме остаётся прежним, но один из пиков должен стать интенсивнее.

Определение количественного состава смеси основано на допущении того, что, чем больше вещества в смеси, тем интенсивнее его пик. В качестве меры

интенсивности пиков принимается их площадь S . Чтобы вычислить площадь пика, необходимо умножить его высоту h на ширину ω , измеренную на полувысоте пика. Таким образом, $S = h \times \omega$. В настоящее время анализ данных в хроматографах автоматизирован. Полученные данные обрабатываются компьютером и сопоставляются с базой данных, затем подвергаются статистической обработке [37].

Применяемые на сегодняшний день в клинической практике методы определения микробиологического статуса организма человека, а также диагностики инфекций, имеют определённые ограничения и недостатки. Например, существенным недостатком классического бактериологического исследования помимо дороговизны и длительности (7–10 дней) является невозможность оценить роль некультивируемых микроорганизмов в инфекционно-воспалительном процессе, прежде всего, анаэробов. Используемый в качестве дополнительного к классическому иммуно-серологический метод является непрямым, поскольку выявляет не возбудителя, а иммунный ответ на него, который может иметь индивидуальные вариации. Известные молекулярно-биологические методы при несомненных преимуществах – прямое определение возбудителя, высокая специфичность и чувствительность, универсальность, скорость, возможность диагностики хронических и латентных инфекций – имеют такие серьёзные недостатки, как частые ложноположительные результаты и невозможность адекватной количественной оценки [77; 78].

Из всего вышесказанного становится очевидной востребованность в надёжном количественном экспресс-методе диагностики дисбиозов и определения возбудителей инфекции. Такими свойствами обладает метод масс-спектрометрии микробных маркеров, основанный на количественном определении маркерных веществ микроорганизмов (жирных кислот, альдегидов, спиртов и стероидов) непосредственно в клиническом материале. В этом принципиальное отличие метода, придающее ему качественно новое свойство – возможность разложения суперпозиции всего пула микробных маркеров, что позволяет оценить вклад от каждого из сотен видов микроорганизмов, которые

обитают, например, в кишечнике. В основе метода – высокоточное определение специфических маркерных молекул, входящих в состав клеточных липидов микроорганизмов. Высокочувствительный и селективный метод газовой хромато-масс-спектрометрии позволяет одновременно измерять концентрации более сотни микробных маркеров непосредственно в анализируемом материале: крови, моче, биоптатах и других биологических жидкостях и тканях, а также в небιологических пробах, минуя стадии предварительного посева на питательные среды или использование тестовых биохимических материалов. Разработан автоматический алгоритм анализа с помощью штатных программ газожидкостной хромато-масс-спектрометрии, позволяющих определить численность более 50 клинически значимых видов микроорганизмов в материале в течение трёх часов с момента его поступления в лабораторию [79; 80].

Бактериям свойственно большое разнообразие жирных кислот и жирных альдегидов. В настоящее время их насчитывают более двухсот пятидесяти. В организме человека их всего около двадцати пяти. Это обстоятельство определяет возможность родового или видового анализа инфекций и дисбиозов на преобладающем фоне биологической жидкости непосредственно в клиническом материале [78].

Жирные кислоты в бактериях входят в состав различных классов липидов: фосфолипидов, гликолипидов, гликофосфолипидов, орнитин- и лизинсодержащих липидов, ацилглицеринов, эфиров жирных кислот, липопротеинов и липополисахаридов наружной мембраны грамотрицательных бактерий, некоторых других липидов. Их содержание у большинства бактерий составляет 2–10 %. Длина цепи жирных кислот бактерий в основном составляет 10–20 атомов углерода. У многих таксономических групп преобладают жирные кислоты с прямой цепью. Жирные кислоты с разветвлённой цепью встречаются в изо-форме с локализацией метильной группы у предпоследнего атома углерода и антеизо-форме с локализацией метильной группы у 3-го от конца атома углерода [80].

К настоящему времени состав жирных кислот большинства

микроорганизмов изучен, показана его воспроизводимость, доказана их родо- и видоспецифичность. Метод детектирования микроорганизмов по маркерам жирных кислот сходен с генетическим анализом (ПЦР, определение последовательности нуклеотидов 16sРНК и пр.), поскольку состав жирных кислот детерминирован в ДНК и воспроизводится путём репликации участка генома транспортными РНК и последующего синтеза жирных кислот в митохондриях по матричным РНК. То есть профиль жирных кислот также консервативен, как и строение ДНК. Исследования в области бактериальной палеонтологии подтвердили постоянство состава жирных кислот отдельных микроорганизмов и пула их жирных кислот в целом с глубины времен в 2,5 млрд лет [80].

Диагностика возбудителей инфекционных процессов по данным масс-спектрометрии биологических жидкостей является экспрессным, высокочувствительным (0,01 нг/мл маркера), селективным, универсальным методом индикации, одинаково эффективным как для аэробных, так и для анаэробных микроорганизмов. При этом следует отметить, что инфекции в подавляющем большинстве случаев полимикробны, в них доминируют анаэробы. Метод газовой хромато-масс-спектрометрии обладает широким диагностическим спектром (определение маркеров десятков микроорганизмов одновременно в одном анализе), не зависит от оснащения микробиологической лаборатории, так как позволяет прямо анализировать клинические образцы без высевания и начальной культивации. В то же время метод достаточно экономичен, так как не требует биологических и биохимических тестовых материалов, культуральных сред, ферментов, олигонуклеотидных праймеров [78; 79].

Газожидкостный метод хромато-масс-спектрометрии может быть использован для определения любого микроба, имеющего в составе структурных клеточных компонентов вещество-маркер, отличное от химических веществ фоновой биологической жидкости. Чувствительность метода составляет 10^4 – 10^5 клеток в пробе в зависимости от содержания маркера в клетке. В настоящее время для проведения анализа требуется не более 3 часов на 1 образец, или 7 часов на серию из 5 проб. Экспрессность и универсальность анализа при возможности

точного определения численности микроорганизмов позволили за короткий срок пополнить сведения о микробной этиологии многих заболеваний сердечно-сосудистой системы, органов дыхания и пищеварительной системы, кожи, урогенитального тракта, послеоперационных и травматических инфекций. Полученные для каждого больного данные по составу микроорганизмов, участников инфекционного процесса при оценке общего микробиологического статуса позволяют врачу получить качественно новую обширную информацию для принятия адекватной антимикробной и общей терапии [79].

В пользу микробного происхождения жирных кислот, альдегидов и стероидов, не характерных для клеток организма человека, свидетельствуют следующие соображения и факты. Во-первых, хорошо известно, что в клетках млекопитающих отсутствуют гидрокси-, циклопропановые и ненасыщенные жирные кислоты. Во-вторых, в результате проведённых авторами (Г. А. Осипов, 2010 г.) анализов (несколько тысяч) биологических жидкостей человека и животных было определено, что динамичное изменение состава минорных жирных кислот свидетельствует об их экзогенном происхождении. В-третьих, состав жирных кислот макроорганизма колеблется в пределах 25 % от их среднего значения в разных пробах, а состав микробных маркеров – от 0 до максимума в тяжёлых случаях воспаления. В-четвёртых, при проведении этиотропной антибактериальной терапии значения минорных компонентов в крови возвращались к нормальным показателям. Кроме того, в исследованиях показано, что концентрация микробного маркера коррелирует с активностью воспалительного процесса (3-гидрокси-пальмитиновая кислота в крови как маркер *Brucella spp.* в случае экспериментального бруцеллёза у морских свинок, 72-дневный курс), а концентрация микробных маркеров *Salmonella spp.* в крови пациентов с сальмонеллёзом коррелирует со значениями титров антител. Также концентрация 10-гидроксистеариновой кислоты (маркер *Clostridium perfringens*) пациентов с синдромом длительного сдавливания и диагнозом «газовая гангрена» коррелирует с наличием и количеством *C. perfringens*, подтверждённым культуральным методом. К тому же подтверждающим фактом диагностической значимости метода является то, что клинические наблюдения показывают

нормализацию микроэкологического статуса организма человека и подавление инфекции в результате лечебных мероприятий по данным масс-спектрометрии микробных маркеров [80].

Таким образом, хроматография позволяет идентифицировать любой микроорганизм по продуктам пиролиза и по спектру специфических компонентов их мембран в течение двух–трёх часов в отличие от того же бактериологического метода, который занимает не менее двух суток, что может способствовать более раннему началу этиотропной терапии при тяжёлых инфекциях. При этом выявлено полное совпадение результатов, полученных методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии, с данными классического бактериологического метода [17; 37; 108].

Особой ценностью обладает газожидкостная хроматография в выявлении анаэробной инфекции, тогда как классический БМ в данном случае достаточно трудоёмок, длителен, требует специальных условий для культивирования анаэробов и не всегда достоверен. При помощи ГЖХ вполне реально получить достоверные, точные результаты в течение нескольких часов [37; 84].

Также результаты некоторых исследований показали, что изменение качественного состава короткоцепочечных жирных кислот коррелирует с изменениями родового состава аэробно-анаэробных популяций микроорганизмов, установленных при микробиологическом исследовании, включающим анаэробное культивирование.

Метод точно, достаточно быстро позволяет идентифицировать микроорганизм, причём является неинвазивным. Это позволяет отнести газожидкостную хроматографию к скрининговым методам. Доказано, что назначение антибактериальных препаратов с учётом спектра короткоцепочечных жирных кислот приводит к достоверному повышению эффективности терапии до $(98 \pm 2) \%$ (при эмпирическом подборе антибактериальной терапии не превышает $(65 \pm 2) \%$) [2].

Кроме того, проведение последующего исследования после приёма антибиотиков делает ГЖХ методом клинического контроля [2; 37; 84].

В литературе встречаются данные, полученные в результате исследования методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии биоптатов тощей, подвздошной, ободочной кишки, а также фекалий и крови практически здоровых людей. Выявлены нормы содержания микроорганизмов (таблица 1) [80].

Таблица 1 – Нормальные показатели количества микроорганизмов в разных отделах кишечника здорового человека

Группы и таксоны микроорганизмов	Численность, экв. кл/г × 10 ⁶			
	Тошная	Подвздошная	Ободочная	Фекалии
<i>Кокки, бациллы, коринебактерии</i>				
<i>Streptococcus spp. (Lactococcus spp.)</i>	261	253	1 170	1 691
<i>Bacillus cereus</i>	0	51	157	284
<i>Bacillus megaterium</i>	90	0	0	0
<i>Corineform (Listeria) a17</i>	1 398	439	713	65
<i>Staphylococcus spp.</i>	616	410	490	121
<i>Streptococcus spp. (оральные)</i>	1 642	127	2	641
Сумма	4 006	1 281	2 533	2 803
<i>Анаэробы</i>				
<i>Eubacterium lentum</i>	98	675	670	4 334
<i>Clostridium histolyticum</i>	692	467	849	388
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	487	330	423	37
<i>Clostridium propionicum</i>	1 237	150	0	13 942
<i>Bacteroides hypermegas</i>	0	0	0	163
<i>Clostridium ramosum</i>	3 892	1 942	118	0
<i>Fusobacterium spp.</i>	0	0	0	129
<i>Porphyromonas spp.</i>	0	0	0	39
<i>Lactobacillus spp.</i>	17 355	17 190	16 231	30 510
<i>Eubacterium moniliforme</i>	0	0	0	892
<i>Clostridium difficile</i>	1 769	861	1 055	684
<i>Prevotella spp.</i>	620	583	345	7 557
<i>Eubacterium spp. (основная группа)</i>	6 832	11 497	24 457	12 026
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	63	43	1 340

Продолжение таблицы 1

Группы и таксоны микроорганизмов	Численность, экв. кл/г × 10 ⁶			
	Тошная	Подвздошная	Ободочная	Фекалии
<i>Bifidobacterium spp.</i>	5 249	7 108	31 886	10 723
<i>Clostridium perfringens</i>	224	50	43	44 698
<i>Eubacterium spp.</i>	27	1 548	3 549	93 218
<i>Propionibacterium (P. freudenreichii)</i>	12 777	1 057	13 086	3 648
<i>Propionibacterium acnes</i>	0	0	359	388
<i>Ruminococcus spp.</i>	804	800	1 364	30
<i>Eubacterium lentum 7741</i>	93	56	0	282
<i>Bacteroides ruminicola</i>	0	7	9	2 769
<i>Eubacterium spp.</i>	365	265	5 650	9 725
<i>Propionibacterium spp.</i>	0	0	0	698
Сумма	52 520	44 648	100 138	238 219
<i>Аэробные актиномицеты</i>				
<i>Nocardia spp.</i>	1 595	0	1 136	7
Актиномицеты	797	289	105	0
<i>Pseudonocardia spp.</i>	215	7	85	34
<i>Streptomyces spp.</i>	493	392	329	1 522
<i>Rhodococcus spp.</i>	1 588	792	698	127
<i>Mycobacterium spp. / Candida spp.</i>	3 025	3 184	3 257	0
<i>Actinomadura spp.</i>	151	0	12	0
<i>Nocardia asteroides</i>	1 782	0	609	108
<i>Actinomycetes 10Me14</i>	3 652	3 196	2 328	92
Сумма	13 297	7 859	8 558	1 891
<i>Грам (-) палочки</i>				
<i>Acinetobacter spp.</i>	0	0	0	125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	42
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	0	24
Сумма	0	0	0	191
<i>Энтеробактерии и энтерококки</i>				
<i>Alcaligenes spp.</i>	146	261	190	84
<i>Campylobacter mucosalis</i>	0	0	0	18

Окончание таблицы 1

Группы и таксоны микроорганизмов	Численность, экв. кл/г × 10 ⁶			
	Тошная	Подвздошная	Ободочная	Фекалии
<i>Escherechia coli</i>	20	21	25	0
<i>Helicobacter pylory</i>	529	141	92	2 134
<i>Enterococcus spp.</i>	783	484	1 252	669
<i>Enterococcus faecalis</i>	0	0	530	4 649
Сумма	1 478	907	2 089	7 554
<i>Микроскопические грибы</i>				
Микромицеты (кампестерол)	216	375	112	1 430
Микромицеты (ситостерол)	197	422	56	888
Микромицеты (эргостерол)	0	0	0	286
Сумма	413	797	168	2 604
<i>Вирусы</i>				
Герпес	216	113	203	0
Цитомегаловирус	919	31	26	8
Сумма	1 135	144	230	8
<i>Не идентифицированы</i>				
Маркер i14	0	840	92	15 192
Маркер i17	3 066	1 549	0	2 061
Сумма	3 066	2 389	92	17 253
Общая сумма	75 915	57 772	112 637	270 523

Таким образом, метод ГЖХ открывает новые перспективы в диагностике и лечении заболеваний желчного пузыря, обеспечивая быструю, точную идентификацию микроорганизмов в различных биологических субстратах. Высокая точность (по сравнению с бактериологическим методом) выявления анаэробов делает метод газожидкостной хромато-масс-спектрометрии особенно ценным в этой области.

1.3.3 Роль биоплёнок в этиопатогенезе острого калькулёзного холецистита и их клиническая значимость

В настоящее время общепризнано, что основной формой существования бактерий в естественных условиях являются связанные с поверхностью сообщества, получившие название биоплёнок, а не отдельные планктонные клетки [5; 23]. На сегодняшний день предполагается, что 90 % изученных видов таксономического домена *Bacteria* способны формировать биоплёнки [23; 158].

Биоплёнки – это высокоорганизованные, подвижные, непрерывно изменяющиеся гетерогенные сообщества, состоящие как из активно функционирующих клеток, так и из покоящихся форм, заключённых в экзополимерный матрикс [5; 40; 158; 178]. Они могут состоять из одного вида бактерий или грибов [5; 195] или, что встречается чаще, могут быть полимикробными, например, содержать многочисленные разнообразные виды микроорганизмов [40; 41]. Ранее считалось, что биоплёнки могут образовываться только на изделиях медицинского назначения, таких как катетеры, эндотрахеальные трубки, внутриматочные приспособления, контактные линзы, эндопротезы [15; 66; 148; 151; 180; 182]. Но биоплёнки являются основными источниками заболеваний, характеризующихся хроническим воспалением [5]. Их обнаруживают более чем в 80 % хронических инфекционных и воспалительных заболеваний, что позволило выдвинуть концепцию хронических болезней как болезней биоплёнок [15; 23; 139].

В литературе всё чаще встречаются сообщения о выявлении биоплёнок на поверхности почечных конкрементов и камней предстательной железы. Эти исследования были проведены с применением метода сканирующей электронной микроскопии, при котором возможна визуализация микробных агентов на поверхности изучаемого материала [14; 94; 109].

В зарубежных источниках появляются данные о формировании биоплёнок на эпителии слизистой оболочки мочевого пузыря у больных с циститом [194], а учёные из США при помощи сканирующей электронной микроскопии наглядно

демонстрируют бактериальные биоплёнки на слизистой придаточных пазух носа пациентов с хроническим риносинуситом [200]. Идентичные данные получили в результате исследований и польские учёные [196].

Благодаря существованию в виде биоплёнок популяция бактерий усиливает свою защиту от фагоцитоза, ультрафиолетового излучения, а также от антибиотиков и факторов иммунной защиты [40; 170; 177].

Изучение биоплёнок, как самостоятельное направление в микробиологии, началось благодаря появлению нового поколения микроскопов – сканирующего электронного (СЭМ) и конфокального сканирующего лазерного (КСЛМ). Последний позволяет получать трёхмерное изображение моно- и поливидовых биоплёнок, формируемых различными микроорганизмами, в режиме реального времени [74; 110; 176; 193].

Образование биоплёнок – это сложный комплексный динамический процесс, состоящий из нескольких этапов: адгезии клеток на поверхности и перераспределения клеточной массы; активного деления клеток для создания клеточных кластеров; образования экзополимерного слизистого матрикса. Изначальное прикрепление микробной клетки к поверхности субстрата осуществляется за счёт действия электростатических, гидрофобных сил, сил Ван дер Ваальса, неспецифической адгезии. Адгезия к биологическим поверхностям обуславливается специфическим взаимодействием белков-адгезинов или лектинов фимбрий экзоплазматического компартмента бактериальной клетки с рецепторами или определёнными доменами поверхности мембран хозяйских клеток. Механизм адгезии грамположительных бактерий отличается от механизма адгезии грамотрицательных. Так, например, важнейшим элементом в процессе адгезии стафилококков является Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) – полисахарид, который участвует как в клеточной субстратной адгезии, так и в последующем формировании клеточных кластеров. У грамотрицательных микроорганизмов важную роль в адгезии и клеточной агрегации играют жгутики и фимбрии IV типа. Движение, обусловленное жгутиками, способствует распространению и образованию клеточного монослоя на субстрате, а фимбрии

IV типа участвуют в клеточной агрегации за счёт лектинового взаимодействия [23; 61; 176].

Процесс формирования биоплёнки можно разделить на три этапа:

1) обратимое прикрепление к поверхности. Чаще всего микроорганизмы существуют в виде свободно плавающих масс или единичных (например, планктонных) колоний. Однако в нормальных условиях большинство микроорганизмов стремится прикрепиться к поверхности и, в конечном счёте, образовать биоплёнку;

2) перманентное прилипание к поверхности. По мере размножения бактерий они более прочно прилипают к поверхности, дифференцируются, обмениваются генами, что обеспечивает их выживаемость.

3) формирование слизистого защитного матрикса/биоплёнки. Однажды устойчиво присоединившись, бактерии начинают образовывать экзополисахаридный окружающий матрикс, известный как внеклеточное полимерное вещество (*extracellular polymeric substance*). Это предохранительный матрикс или «слизь» (*EPS-matrix*). Мелкие колонии бактерий затем образуют первоначальную биоплёнку [5; 137; 148; 176]. Состав матричной слизи может варьироваться в зависимости от того, какие именно микроорганизмы в нём присутствуют, но в основном в него входят белки, полисахариды, гликолипиды и бактериальная ДНК [152; 177].

Экспериментальные лабораторные исследования показали, что планктонные бактерии, например, стафилококки, стрептококки, псевдомонады, кишечная палочка обычно присоединяются друг к другу в течение нескольких минут; образуют прочно присоединённые микроколонии в течение 2–4 часов; вырабатывают внеклеточные полисахариды и становятся значительно более толерантными к биоцидам, например, к антибиотикам, антисептикам и дезинфектантам, в течение 6–12 часов; вовлекаются в полноценные колонии биоплёнки, которые очень устойчивы к биоцидам и теряют планктонные бактерии в течение 2–4 дней, в зависимости от видов бактерий и условий роста; быстро восстанавливаются после механического разрушения и вновь формируют

зрелую биоплёнку в течение 24 часов [5].

Применение КСЛМ и СЭМ позволило установить, что биоплёнки имеют сложную трёхмерную структурную организацию. После необратимой адгезии популяция микроорганизма начинает интенсивно пролиферировать образованием многоклеточных слоёв и обильно синтезировать компоненты экзополимерного матрикса – это один из ключевых моментов образования биоплёнок [23; 61; 137; 199; 200]. Матрикс биоплёнок состоит преимущественно из полисахаридов (декстран, гиалуроновая кислота, целлюлоза и другие), по данным разных авторов, эта фракция наиболее выражена и составляет от 40 до 95 % от общей массы биоплёнки, содержание других химических веществ значительно варьирует и зависит от таксономической единицы бактерии, образующей биоплёнку [142; 143].

Доля белков может составлять до 60 %, липидов – до 40 % и нуклеиновых кислот – 1–20 % [23; 138]. Порядка 80–90 % объёма биоплёнок занимает вода, поэтому все её составляющие находятся в гидротированном состоянии. Матрикс биоплёнки разделен каналами, наполненными водой, а также имеет полости и пустоты. Через каналы транспортируются питательные вещества и проходят конвективные потоки кислорода от внешних к внутренним частям биоплёнки, одновременно с этим выводятся метаболиты бактериальных клеток [23; 144].

По данным некоторых авторов, у микроорганизмов, находящихся в биоплёнках, наблюдается значительная антибактериальная резистентность по сравнению с планктонными формами [5; 40; 41; 66; 139; 177]. Это обусловлено способностью бактерий накапливать в матриксе внеклеточные ферменты, разрушающие антибиотики, и агрегационной природой биоплёнок, связанной с уменьшением площади открытой поверхности клеток, что приводит к физической недоступности молекул. Также особую роль играет резистентный фенотип клеток и сниженный метаболизм микроорганизмов в биоплёнке, который достигается за счёт многослойной топографии биоплёнок и приводит к антобиотикотолерантности [23; 178]. Более того, неадекватная антибактериальная терапия, а именно, применение антибактериальных химиопрепаратов в малой, сублетальной для микроорганизмов дозе,

стимулирует образование новых биоплёнок [170]. Доказано, что периферические слои более азрированы по сравнению с глуболежащими, что создает благоприятные условия для развития анаэробных микроорганизмов в толще биоплёнки. Строение биоплёнок идеально способствует процессам обмена генетической информацией за счёт тесного контакта и стабильной пространственной локализацией клеток. Исследования *in vitro* показывают, что уровень конъюгации в биоплёнках гораздо выше по сравнению с планктонными формами бактерий. Более того, процессы конъюгации могут регулироваться на популяционном уровне за счёт бактериальной коммуникации, например, вирулентные энтерококки для передачи генетической информации используют сигнальные системы [23].

Работа в области влияния различных факторов на жизнедеятельность микробного сообщества привела к введению в научный глоссарий термина Quorum Sensing (QS) – чувство кворума. Термин был введен при описании микробной сигнальной системы для самораспознавания, самоорганизации, контроля над функциями посредством специализированных молекул – аутоиндукторов.

К настоящему времени детально изучены несколько молекул, ответственных за QS у бактерий: лактон ацетилгомосерина (AHL), аутоиндуктор 2 (AI2) и пептидные аутоиндукторы. Изучение сигнальных молекул вызывает интерес, прежде всего, практической ценностью, так как возможность влияния на QS и, в конечном счёте, на биоплёнкообразование является важным фактором для улучшения терапии инфекционных заболеваний. Это связано с тем, что микроорганизмы в виде биоплёнки демонстрируют повышенную устойчивость к антимикробным препаратам и защитным механизмам иммунной системы [61].

Особый интерес представляют собой клетки-персистеры – альтруистические интактные клетки, способные выживать даже в высоких дозах антибиотиков, летальных для остальных микробных клеток. По данным некоторых авторов, их количество варьирует от 1 до 5 % от всей популяции. Они метаболически не активны, а их основное назначение, по-видимому –

депонирование и сохранение генетического материала для последующего восстановления популяции. Это возможно благодаря так называемым токсин-антитоксин модулям, которые экспрессируют токсины и антитоксины, находящиеся в цитоплазме клеток. При возникновении неблагоприятных факторов происходит синтез токсина, блокирующего процессы трансляции, при восстановлении комфортных для жизнедеятельности условий происходит выработка антитоксина, связывающего токсин. Следствием этого является связывание токсина в протеиновый комплекс и нормализация метаболических процессов клетки. Бактерии начинают пролиферировать, возобновляется бактериальная коммуникация, восстанавливается материнская популяция, что для макроорганизма характеризуется хронизацией инфекции [23].

В зарубежной литературе имеются данные о воздействии нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) на формирование бактериальных биоплёнок. Считается, что это связано с ингибированием адгезии бактерий. Такие лекарственные препараты, как диклофенак, ибупрофен и салициловая кислота ограничивают адгезию бактерий к абиотическим поверхностям, в том числе к полимерным изделиям медицинского назначения. В эксперименте было показано, что салициловая кислота уменьшает производство внеклеточного полисахарида, тейхоевой кислоты и некоторых белков *S. epidermidis*, в то время как ибупрофен мог изменять гидрофобность некоторых штаммов *E. coli*, а также в субингибиторной концентрации способен ингибировать продукцию жгутиков этих бактерий. Ещё одно возможное объяснение влияния НПВС на образование биоплёнок – это влияние на QS. По мнению иностранных авторов, НПВС могут ингибировать образование биоплёнки *P. aeruginosa* путём сокращения факторов вирулентности, зависящих от QS. Исследования в этой области могут повысить эффективность антимикробных препаратов при их сочетанном применении с нестероидными противовоспалительными средствами [185].

Вместе с этим в настоящее время проводится большое количество исследований для выявления новых альтернативных антимикробных веществ. Результаты исследований позволяют рассматривать некоторые из этих веществ,

например, антимикробные пептиды, как альтернативные антибактериальные препараты. Так, учёные из Республики Корея в своих исследованиях показали, что антимикробный пептид коприсин – 43-мерный дефензин-подобный пептид, выделенный из жука *Copris tripartitus*, обладает синергическим действием с антибиотиками и подавляет рост уже сформированной биоплёнки. Однако применение антимикробных пептидов в клинической практике пока сопряжено с рядом проблем, одна из которых – значительная стоимость препарата [191].

По нашему мнению, на сегодняшний день процессы формирования биоплёнок, в том числе и на желчных конкрементах, и их особенности остаются малоизученными, а их роль в развитии хронической инфекции и антибиотикорезистентности некоторых штаммов несомненна. Кроме того, данные о выявлении бактериальных биоплёнок на слизистой мочевого пузыря и придаточных пазух носа позволяют предполагать возможность формирования микробных биоплёнок не только на желчных конкрементах, но и на поверхности слизистой оболочки желчного пузыря и желчных протоков.

1.3.4 К вопросу об антибиотик-ассоциированном дисбиозе

За последние десятилетия представления о роли кишечной микрофлоры существенно изменились. Её метаболическая роль сегодня не вызывает сомнений. Вместе с тем взаимодействие между макроорганизмом и микробиотой до конца не изучено. Микрофлора желудочно-кишечного тракта – чрезвычайно многочисленное сообщество. Общая масса микрофлоры кишечника взрослого человека составляет около 2,5–3,0 кг. Только популяция *Escherichia coli* насчитывает около 6×10^9 клеток. Результаты культуральных методов исследования свидетельствуют о том, что микробное сообщество кишечника человека состоит из 10^{12} – 10^{14} клеток, относящихся к 17 семействам, 45 родам, 500 видам из 12 таксономических групп. Соотношение анаэробов к аэробам – 1 000 : 1. Внедрение новых методов исследования микрофлоры позволило получить принципиально новые данные о её численности, видовом составе и

функциональном значении. Так, благодаря методу секвенирования гена 16S рибосомальной РНК установлено, что нормальная кишечная микрофлора включает 395 филогенетических групп, 244 (62 %) из которых ранее не были известны. Более того, 195 групп представлены некультивируемыми на данный момент микроорганизмами [6; 9; 70].

По данным В. М. Бондаренко, дисбиоз кроме всего прочего характеризуется транслокацией нормальной микрофлоры в несвойственные ей биотопы [8; 12]. Так, в литературе встречаются данные о том, что условно патогенные энтеробактерии колонизируют желчевыводящие пути вследствие транслокации из толстого кишечника на фоне дисбиотических нарушений [71; 154; 162].

Некоторые авторы выделяют аэробный и анаэробный дисбиоз с нарушением аэробного или анаэробного компонентов соответственно. При дисбалансе обоих компонентов говорят о сочетанном дисбиозе [35; 36].

Широкое применение антибиотиков, эпоха которых началась в середине XX века, принесло не только спасение жизней миллионов людей, исцеление от ранее, казалось бы, некурабельных заболеваний, но также побочные эффекты, которых не избежало ни одно лекарственное средство. Одним из таких нежелательных эффектов применения антибиотиков является развитие диареи различной степени выраженности. Это явление обусловлено широким спектром причин, однако, во многих случаях, опосредовано через изменение состояния кишечного микробиоценоза [10; 19; 56].

Для обозначения комплекса изменений в кишечнике и соответствующих клинических проявлений, связанных с дисбиозом на фоне применения антибиотиков, в зарубежной литературе часто используется термин антибиотик-ассоциированная диарея (*antibiotic associated diarrhea*), эквивалентом которого по существу является термин «антибиотик-ассоциированный дисбиоз кишечника». Частота этого состояния, по данным различных авторов, колеблется от 5 до 39 % [86]. По данным других авторов, частота антибиотико-ассоциированной диареи встречается у 6–80 % пациентов, получавших терапию антибиотиками [19; 133]. Так, было показано, что ампициллин существенно подавляет рост как аэробной,

так и анаэробной флоры. Амоксициллин в меньшей степени подавляет нормальную микрофлору, хотя и приводит к некоторому увеличению популяции представителей семейства *Enterobacteriaceae*, при этом не способствует размножению грибов и *Clostridium difficile*. Сходным образом на микробиоценоз кишечника влияет комбинированный препарат амоксициллина и клавулановой кислоты. Большинство цефалоспоринов способствует росту численности энтерококков и *Clostridium difficile*. Фторхинолоны в значительной степени угнетают рост микробов семейства *Enterobacteriaceae* и, в меньшей степени, энтерококков и анаэробных микроорганизмов, не способствуя при этом росту грибов и *Clostridium difficile* [86; 150; 153; 161]. По данным J. A. Vanderhoof и соавт., чаще всего развитие антибиотик-ассоциированной диареи связано с приёмом амоксициллина/клавуланата, эритромицина и других макролидов, цефалоспоринов и пенициллинов [165].

Одними из наиболее тяжёлых и угрожающих жизни состояний являются так называемые *Clostridium difficile*-ассоциированный колит и его крайнее проявление – псевдомембранозный колит. Эти процессы связаны с избыточным размножением в кишечнике *Clostridium difficile*. При бактериологическом исследовании *Clostridium difficile* выявляют лишь у 1–3 % здоровых лиц, но более чем у 20 % пациентов, получающих антибактериальную терапию. В отдельных случаях на фоне угнетения нормальной флоры происходит лавинообразный рост популяции *Clostridium difficile* с изменением его токсигенных свойств, что проявляется повышением синтеза энтеротоксина А и цитотоксина В и приводит к тяжёлому поражению слизистой оболочки толстой кишки. Чаще всего *Clostridium difficile*-ассоциированный колит развивается при применении клиндамицина или линкомицина, полусинтетических пенициллинов, реже – цефалоспоринов с широким спектром антибактериального действия. Наиболее тяжёлой формой *Clostridium difficile*-ассоциированного колита является псевдомембранозный колит, летальность при развитии которого достигает 30 % [86; 173; 189].

В настоящее время для коррекции дисбиоза наиболее широко применяются препараты, содержащие живые микроорганизмы, положительно

влияющие на состав кишечного микробиоценоза, так называемые пробиотики. Согласно классическому определению, пробиотики – это препараты, содержащие живые микроорганизмы, являющиеся представителями нормальной микрофлоры толстой кишки, прежде всего, бифидо- и лактобактерии, энтерококки. Пробиотики широко используются в составе пищевых добавок, йогуртов и других молочных продуктов. Микроорганизмы, входящие в состав пробиотиков, должны быть непатогенными, нетоксигенными и сохранять жизнеспособность при длительном хранении [8; 70].

Также широко применяются пребиотики. К пребиотикам относятся неперевариваемые ингредиенты пищи, которые служат субстратом для роста собственных облигатных микроорганизмов, обитающих в толстой кишке – бифидо- и лактобактерий. Чтобы компонент пищи был классифицирован как пребиотик, он не должен подвергаться гидролизу пищеварительными ферментами человека, не должен абсорбироваться в верхних отделах пищеварительного тракта, однако должен являться селективным субстратом для роста и/или метаболической активации одного вида или определённой группы микроорганизмов, заселяющих толстый кишечник, приводя к нормализации их соотношения [49; 70; 156].

В последнее время большой интерес вызывают синбиотики, представляющие собой рациональную комбинацию пробиотиков, микробных метаболитов и пребиотиков, которая оказывает положительный эффект на здоровье организма-хозяина, способствуя выживаемости и приживляемости в кишечнике живых бактериальных добавок и избирательно стимулируя рост и активацию метаболизма лакто- и бифидобактерий [8; 70].

Таким образом, лечение дисбиоза представляет собой сложный комплексный процесс, требующий индивидуального подхода к каждому конкретному пациенту. А поскольку дисбиоз всегда вторичен, то есть является следствием, необходимо устранять причину, которая привела к этому состоянию. Для антибиотик-ассоциированного дисбиоза это, прежде всего – рациональное, контролируемое использование антибактериальных препаратов с

учётом природной и индивидуальной антибиотико-чувствительности патогенных микроорганизмов, против которых направлена терапия. Причем крайне желательно, чтобы антибиотико-чувствительность микроорганизмов была определена в самые короткие сроки.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на кафедре общей хирургии им. проф. М. И. Гульмана ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России на базе КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 4», КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 7», МБУЗ «Городская больница № 1» города Красноярска.

Набор клинического материала проводился в период с 2010 по 2014 годы.

2.1 Характеристика клинических наблюдений

Всего обследовано 145 пациентов обоего пола с желчнокаменной болезнью (ЖКБ), хроническим и острым калькулёзным холециститом и 30 здоровых человек в возрасте от 20 до 75 лет.

Средний возраст составил $(49,7 \pm 2)$ лет.

В исследование вошли 121 (69,1 %) женщина и 54 (30,9 %) мужчины.

Все больные были разделены на 6 групп, сопоставимых по полу, возрасту и характеру сопутствующей патологии.

1-я группа ($n = 30$) – группа сравнения (здоровые люди).

У людей этой группы выполнялось исследование крови методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии для детектирования микробных маркеров. Люди были сопоставимы по полу, возрасту и характеру сопутствующей патологии с основными группами. Из них 21 (70 %) женщина и 9 (30 %) мужчин. Все люди группы контроля были обследованы лабораторно (выполнены клинический анализ крови и мочи, биохимический анализ крови) и инструментально (ультрасонография брюшной полости, фиброэзофагогастродуоденоскопия). Патологии выявлено не было. Кроме того, условно здоровые лица, составившие 1-ю группу сравнения, были обследованы на дисбиоз.

2-я группа (n = 23) – больные ЖКБ, хроническим калькулёзным холециститом, которым была выполнена холецистэктомия (традиционным способом, лапароскопическая или из мини-доступа). Перед операцией больным проводилась антибиотикопрофилактика.

3-я группа (n = 21) – больные ЖКБ, острым катаральным калькулёзным холециститом, которым была выполнена холецистэктомия (традиционным способом, лапароскопическая или из мини-доступа). Перед операцией больным проводилась антибиотикопрофилактика. После операции проводилась эмпирическая антибактериальная химиотерапия.

4-я группа (n = 23) – больные ЖКБ, острым катаральным калькулёзным холециститом, которым была выполнена холецистэктомия (традиционным способом, лапароскопическая или из мини-доступа). Перед операцией больным проводилась антибиотикопрофилактика. После операции проводилась целевая антибактериальная химиотерапия.

5-я группа (n = 38) – больные ЖКБ, острым деструктивным калькулёзным холециститом, которым была выполнена холецистэктомия (традиционным способом, лапароскопическая или из мини-доступа). Перед и после операции больным проводилась эмпирическая антибактериальная химиотерапия.

6-я группа (n = 40) – больные ЖКБ, острым деструктивным калькулёзным холециститом, которым была выполнена холецистэктомия (традиционным способом, лапароскопическая или из мини-доступа). Перед и после операции больным проводилась целевая антибактериальная химиотерапия.

У всех пациентов 3–6-й групп по показаниям назначались про-, пре- и синбиотики.

В 1-ю группу – группу сравнения – вошли люди, у которых никогда не было жалоб на боли, дискомфорт в эпигастрии. При ультрасонографии брюшной полости у этих людей патологии печени, желчного пузыря, желчевыводящих протоков выявлено не было. Клинические и биохимические анализы соответствовали норме. Пациенты были признаны условно здоровыми.

Во 2-ю группу исследования вошли пациенты с клинической картиной ЖКБ,

хронического калькулёзного холецистита, подтверждённой ультрасонографически (были обнаружены конкременты желчного пузыря без признаков билиарной гипертензии и патологии внутри- и внепечёночных желчных протоков), обратившиеся в хирургическое отделение в плановом порядке с различной давностью анамнеза желчнокаменной болезни. Перед операцией больным проводилась антибиотикопрофилактика цефалоспоридами I поколения (цефазолин 2,0 г внутривенно болюсно на 20 мл 0,9 %-ного раствора натрия хлорида во время вводного наркоза) или при индивидуальной непереносимости препаратов группы β -лактамов – фторхинолоны (ципрофлоксацин 0,2 г внутривенно капельно за 30 минут до операции). В плановом порядке больным была выполнена холецистэктомия (традиционным способом, лапароскопическая или из мини-доступа). Распределение больных по видам оперативного доступа представлено на рисунке 1.

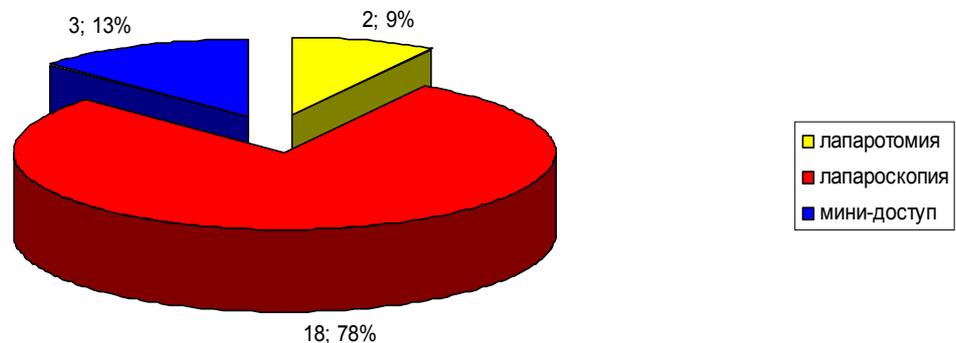


Рисунок 1 – Количество пациентов 2-й группы, оперированных в плановом порядке с применением трёх вариантов оперативного доступа

После операции пациенты 2-й группы получали стандартное консервативное лечение, включающее инфузионную, спазмолитическую, симптоматическую терапию, профилактику тромбоэмболических осложнений. Внутривенные инфузии спазмолитических препаратов (дротаверина гидрохлорид

2 % 2 мл на 400 мл 0,9 %-ного раствора натрия хлорида внутривенно капельно 2 раза в сутки в течение 2-х суток), внутривенные инфузии солевых растворов (плазмалит, стерофундин изотонический 500–1 000 мл 1–2 раза в сутки), анальгетические препараты (кетопрофен 2 мл внутримышечно 2 раза в сутки), димедрол 1 % 1 мл внутримышечно на ночь, антикоагулянты (гепарин по 5 000 ЕД 2 раза в сутки подкожно, фраксипарин 0,3–0,6 1 раз в сутки подкожно).

В исследование вошли пациенты с различной длительностью анамнеза желчнокаменной болезни. Количество пациентов и длительность камненосительства во 2-й группе представлены на рисунке 2.

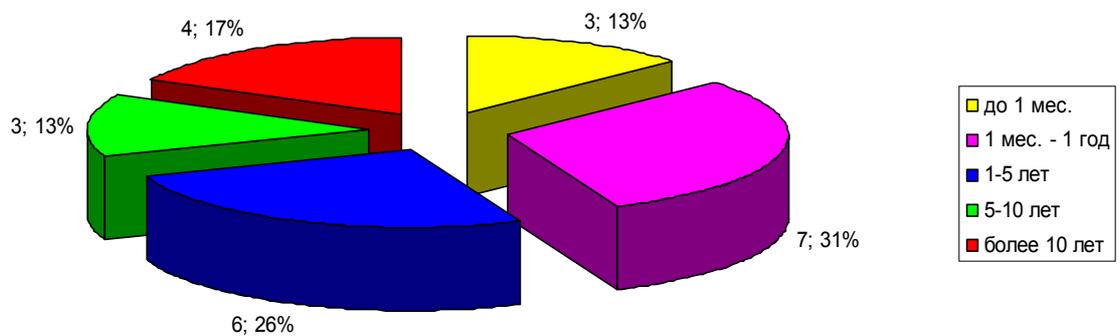


Рисунок 2 – Количество пациентов и длительность камненосительства во 2-й группе

В 3-ю группу вошли больные с клинической картиной ЖКБ, острого калькулёзного холецистита (недеструктивного), подтверждённой ультразвукографически (были обнаружены конкременты, утолщение стенки, увеличение размеров желчного пузыря без признаков деструкции стенки, билиарной гипертензии и патологии внутри- и внепечёночных желчных протоков), поступившие в хирургическое отделение в экстренном порядке с различными сроками от момента начала заболевания. Перед операцией больным проводилась антибиотикопрофилактика цефалоспоридами I поколения (цефазолин 2,0 г внутривенно болюсно на 20 мл 0,9 %-ного раствора натрия

хлорида во время вводного наркоза) или, при индивидуальной непереносимости препаратов группы β -лактамовых антибиотиков, фторхинолонами (ципрофлоксацин 0,2 г внутривенно капельно за 30 минут до операции). Больным была выполнена холецистэктомия (традиционным способом, лапароскопическая или из мини-доступа). После операции проводилась эмпирическая антибактериальная химиотерапия.

4-ю группу составили пациенты с клинической картиной ЖКБ, острого калькулёзного холецистита (недеструктивного), подтверждённой ультрасонографически (были обнаружены конкременты, утолщение стенки, увеличение размеров желчного пузыря без признаков деструкции стенки, билиарной гипертензии и патологии внутри- и внепечёночных желчных протоков), поступившие в хирургическое отделение в экстренном порядке с различными сроками от момента начала заболевания. Перед операцией больным проводилась антибиотикопрофилактика цефалоспорином I поколения (цефазолин 2,0 г внутривенно болюсно на 20 мл 0,9 %-ного раствора натрия хлорида во время вводного наркоза) или, при индивидуальной непереносимости препаратов группы β -лактамовых антибиотиков, фторхинолонами (ципрофлоксацин 0,2 г внутривенно капельно за 30 минут до операции). Больным была выполнена холецистэктомия (традиционным способом, лапароскопическая или из мини-доступа). После операции проводилась целевая антибактериальная химиотерапия.

В 5-ю группу вошли больные с клинической картиной ЖКБ, острого деструктивного калькулёзного холецистита, подтверждённой ультрасонографически (были обнаружены конкременты, утолщение стенки, увеличение размеров желчного пузыря с признаками деструкции стенки, без признаков билиарной гипертензии и патологии внутри- и внепечёночных желчных протоков), поступившие в хирургическое отделение в экстренном порядке с различными сроками от момента начала заболевания. Перед и после операции больным проводилась эмпирическая антибактериальная химиотерапия. Была выполнена холецистэктомия (традиционным способом, лапароскопическая

или из мини-доступа).

6-ю группу составили больные с клинической картиной ЖКБ, острого деструктивного калькулёзного холецистита, подтверждённой ультрасонографически (были обнаружены конкременты, утолщение стенки, увеличение размеров желчного пузыря с признаками деструкции стенки, без признаков билиарной гипертензии и патологии внутри- и внепечёночных желчных протоков), поступившие в хирургическое отделение в экстренном порядке с различными сроками от момента начала заболевания. Перед и после операции больным проводилась целевая антибактериальная химиотерапия. Была выполнена холецистэктомия (традиционным способом, лапароскопическая или из мини-доступа).

Давность начала заболевания у пациентов 3–6-й групп варьировала в пределах от нескольких часов до 2-х суток и более. Распределение больных представлено на рисунке 3.

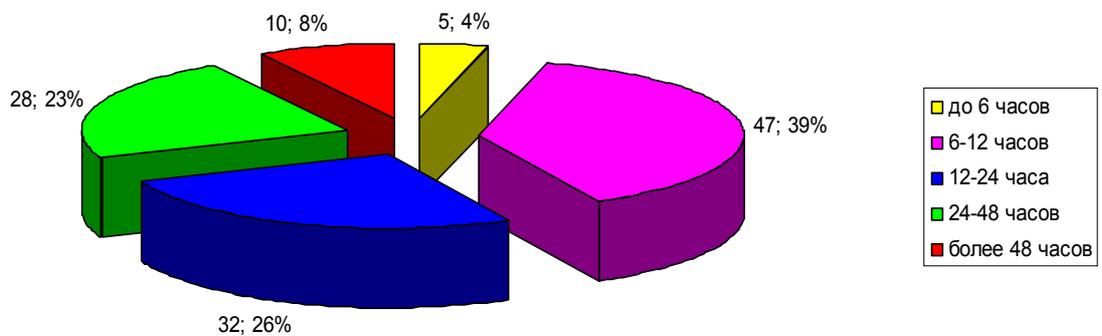


Рисунок 3 – Количество пациентов и давность начала заболевания в 3–6-й группах

Все больные 3–6-й групп были оперированы в экстренном или отсроченном порядке (рисунок 4).

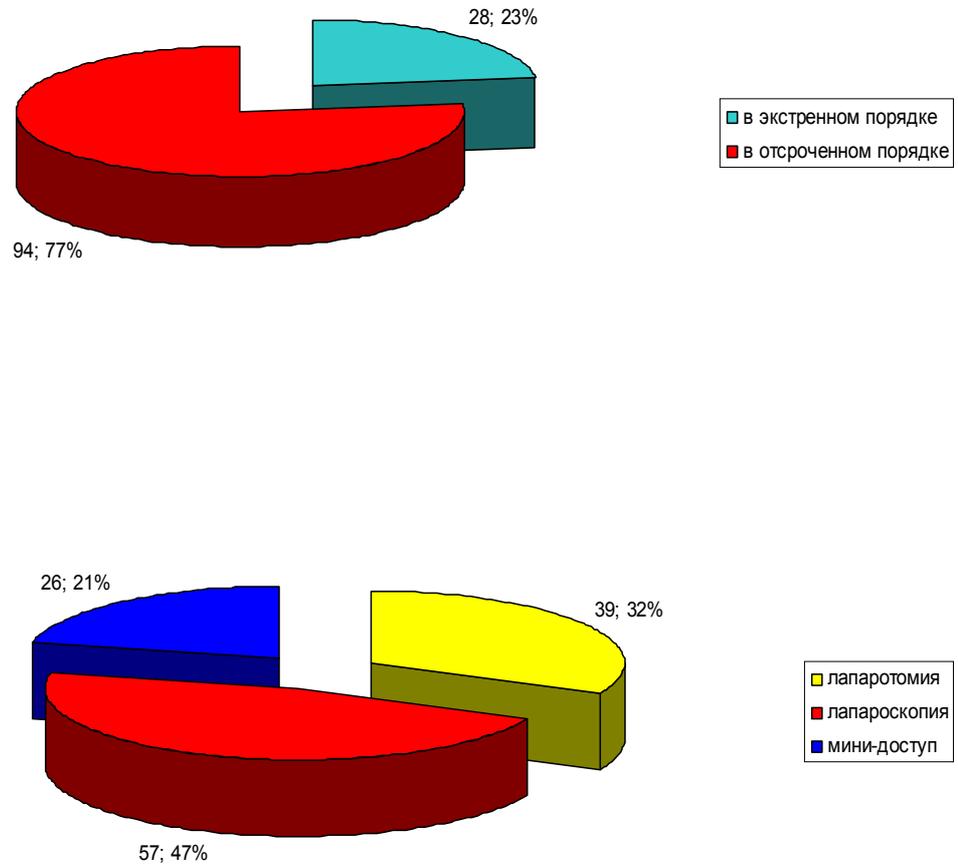


Рисунок 4 – Количество пациентов 3–6-й групп, оперированных в экстренном и отсроченном порядке с применением трёх вариантов оперативного доступа

В исследование вошли пациенты с острым калькулёзным холециститом с различной длительностью анамнеза желчнокаменной болезни. Количество пациентов и длительность камненосительства в 3–6-й группах представлены на рисунке 5.

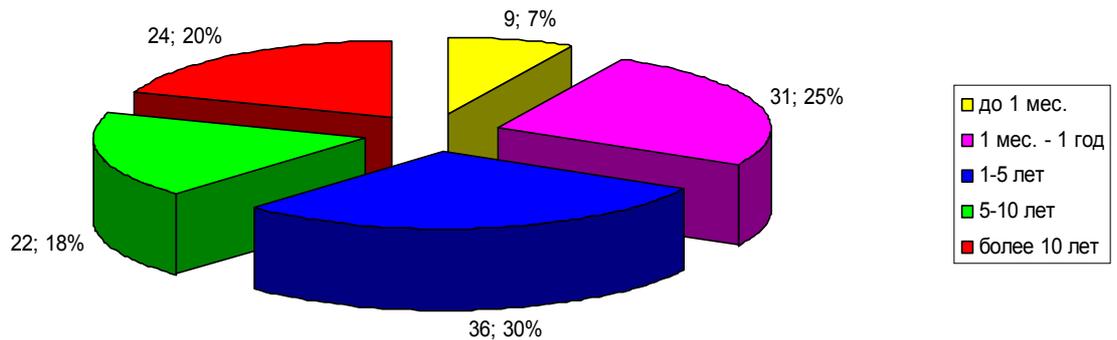


Рисунок 5 – Количество пациентов и длительность камненосительства в 3–6-й группах

После операции пациенты 3–6-й групп получали стандартное консервативное лечение, включающее инфузионную, спазмолитическую, антибактериальную, симптоматическую терапию, профилактику тромбозомболических осложнений. Внутривенные инфузии спазмолитических препаратов (дротаверина гидрохлорид 2 % 2 мл на 400 мл 0,9 %-ного раствора натрия хлорида внутривенно капельно 2 раза в сутки в течение 2-х суток), внутривенные инфузии солевых растворов (плазмалит, стерофундин изотонический 500–1 000 мл 1–2 раза в сутки), анальгетические препараты (кетопрофен 2 мл внутримышечно 2 раза в сутки), димедрол 1 % 1 мл внутримышечно на ночь, антикоагулянты (гепарин по 5 000 ЕД 2 раза в сутки подкожно, фраксипарин 0,3–0,6 1 раз в сутки подкожно).

Антибиотикопрофилактика у больных 2–6 групп заключалась в назначении одного из следующих антибактериальных химиопрепаратов: цефалоспорины I пок. (цефазолин 2,0 г в/в болюсно на 20 мл 0,9 % NaCl во время вводного наркоза) / защищённые пенициллины (амоксциллин клавулонат 1,2 г в/в болюсно на 20 мл 0,9 % NaCl во время вводного наркоза) / фторхинолоны (ципрофлоксацин 0,2 г в/в кап. за 30 мин. до операции).

Схемы эмпирического назначения антибактериальных химиопрепаратов у

пациентов 3-й и 4-й групп, а также целевой антибиотикотерапии у пациентов 5-й и 6-й групп (на основании результатов газожидкостной хромато-масс-спектрометрии и бактериологического метода) представлены в таблице 2 и 3.

Таблица 2 – Схемы назначения эмпирической антибактериальной химиотерапии у пациентов 3-й и 5-й групп

3-я группа	5-я группа
Цефалоспорины III–IV пок. (цефотаксим 1,0 г 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl или цефепим 1,0 г 2 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl)	
Защищённые пенициллины (амоксциллин клавулонат 1,2 г 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl)	Цефалоспорины III–IV пок. + противопрозоидные препараты с антибактериальной активностью (метронидазол 0,5 % 100 мл 3 р. в сут. в/в кап.)
Фторхинолоны (ципрофлоксацин 0,2 г 2 р. в сут. в/в кап.)	Защищённые пенициллины (амоксциллин клавулонат 1,2 г 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl)
	Фторхинолоны (ципрофлоксацин 0,2-0,4 г 2 р. в сут. в/в кап. или пефлоксацин 0,4 г 2 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 5 % глюкозы)
	Фторхинолоны (ципрофлоксацин 0,2 г 2 р. в сут. в/в кап. или пефлоксацин 0,4 г 2 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 5 % глюкозы) + противопрозоидные препараты с антибактериальной активностью (метронидазол 0,5% 100 мл 3 р. в сут. в/в кап.)

Таблица 3 – Схемы назначения целевой антибактериальной химиотерапии у пациентов 4-й и 6-й групп

4-я группа	6-я группа
Цефалоспорины III–IV пок. (цефотаксим 1,0 г 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl или цефепим 1,0 г 2 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl)	
Цефалоспорины III–IV пок. + противопрозоидные препараты с антибактериальной активностью (метронидазол 0,5 % 100 мл 3 р. в сут. в/в кап.)	

Продолжение таблицы 3

4-я группа	6-я группа
Защищённые пенициллины (амоксициллин клавулонат 1,2 г 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl)	
Фторхинолоны (ципрофлоксацин 0,2–0,4 г 2 р. в сут. в/в кап. или пефлоксацин 0,4 г 2 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 5% глюкозы или левофлоксацин 0,5 г 1 р. в сут. в/в кап.)	Защищённые пенициллины (ампициллин сульбактам 1,5 г 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) + аминогликозиды (амикацин 1,0 г 1 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl)
Фторхинолоны + противопротозойные препараты с антибактериальной активностью (метронидазол 0,5 % 100 мл 3 р. в сут. в/в кап.)	Защищённые цефалоспорины III пок. (цефоперазон сульбактам 2,0 г 2 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl)
Цефалоспорины III–IV пок. + Аминогликозиды (гентамицин 2,4 г 1 р. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl)	Защищённые цефалоспорины III пок. (цефоперазон сульбактам 2,0 г. 2 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) + аминогликозиды (амикацин 1,0 г 1 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl)
Фторхинолоны + аминогликозиды (гентамицин 2,4 г 1 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl)	Фторхинолоны (ципрофлоксацин 0,2 г 2 р. в сут. в/в кап. или пефлоксацин 0,4 г 2 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 5 % глюкозы или левофлоксацин 0,5 г 1 р. в сут. в/в кап.)
Макролиды (эритромицин 0,2 г 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) + цефалоспорины III–IV пок. (цефотаксим 1,0 г 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) или аминогликозиды (гентамицин 2,4 г 1 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) или противопротозойные препараты с антибактериальной активностью (метронидазол 0,5 % 100 мл 3 р. в сут. в/в кап.)	Макролиды (эритромицин 0,2 г 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) + цефалоспорины III–IV пок. (цефотаксим 1,0 г 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) или аминогликозиды (гентамицин 2,4 г 1 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) или противопротозойные препараты с антибактериальной активностью (метронидазол 0,5 % 100 мл 3 р. в сут. в/в кап.)

Продолжение таблицы 3

4-я группа	6-я группа
Линкозамиды (Клиндамицин 15% 2 мл 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) + аминогликозиды (гентамицин 2,4 г 1 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) или фторхинолоны (ципрофлоксацин 0,2–0,4 г 2 р. в сут. в/в кап.) или цефалоспорины III-IV пок. (цефотаксим 1,0 г 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl)	Линкозамиды (Линкомицин 30 % 2 мл 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) или клиндамицин 15 % 2 мл 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) + аминогликозиды (гентамицин 2,4 г 1 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) или фторхинолоны (ципрофлоксацин 0,2–0,4 г 2 р. в сут. в/в кап.) или цефалоспорины III-IV пок. (цефотаксим 1,0 г 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl)
Тетрациклины (доксциклин 0,1 г 2 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) + аминогликозиды (гентамицин 2,4 г 1 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) или фторхинолоны (ципрофлоксацин 0,2-0,4 г 2 р. в сут. в/в кап.) или противопротозойные препараты с антибактериальной активностью (метронидазол 0,5 % 100 мл 3 р. в сут. в/в кап.)	Гликопептиды (Ванкомицин 1,0 г 2 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) + фторхинолоны (ципрофлоксацин 0,2-0,4 г 2 р. в сут. в/в кап.) или цефалоспорины III-IV пок. (цефотаксим 1,0 г 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) или противопротозойные препараты с антибактериальной активностью (метронидазол 0,5 % 100 мл 3 р. в сут. в/в кап.)
	Фторхинолоны + аминогликозиды (гентамицин 2,4 г 1 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl)
	Карбапенемы (Меронем 1,0 г 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl)
	Фторхинолоны + противопротозойные препараты с антибактериальной активностью (метронидазол 0,5 % 100 мл 3 р. в сут. в/в кап.)
	Цефалоспорины III-IV пок. + аминогликозиды (гентамицин 2,4 г 1 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl)

Окончание таблицы 3

4-я группа	6-я группа
	Оксазолидиноны (Линезолид 0,4–0,6 г 2 р. в сут. в/в кап.) + фторхинолоны (ципрофлоксацин 0,2–0,4 г 2 р. в сут. в/в кап.) или цефалоспорины III–IV пок. (цефотаксим 1,0 г 3 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) или противопротозойные препараты с антибактериальной активностью (метронидазол 0,5 % 100 мл 3 р. в сут. в/в кап.)
	Тетрациклины (доксциклин 0,1 г 2 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) + аминогликозиды (гентамицин 2,4 г 1 р. в сут. в/в кап. на 250 мл 0,9 % NaCl) или фторхинолоны (ципрофлоксацин 0,2–0,4 г 2 р. в сут. в/в кап.) или противопротозойные препараты с антибактериальной активностью (метронидазол 0,5 % 100 мл 3 р. в сут. в/в кап.)

При необходимости у больных 2–6-й группы интраоперационно после удаления желчного пузыря с целью гемостаза в ложе устанавливалась гемостатическая губка SURGICEL® NU-KNIT™ 7,5 × 10 см.

Кроме того, у больных 6-й группы дополнительно гемостатическая губка SURGICEL® NU-KNIT™ 7,5 × 10 см обрабатывалась раствором диклофенака натрия 3 мл (75 мг) и устанавливалась в ложе желчного пузыря и область инфильтрата.

Из 122 больных 3–6-й групп 104 (85,2 %) были доставлены в приёмный покой в состоянии средней степени тяжести, 18 (14,8 %) – в тяжёлом состоянии, обусловленном интоксикацией при деструктивных формах острого калькулёзного холецистита и развившимися осложнениями в виде перивезикального инфильтрата, абсцесса, местного, диффузного или разлитого перитонита.

Все больные 2-й группы обратились в стационар в удовлетворительном

состоянии.

У всех пациентов изучались клинико-анамнестические данные, анализировалось наличие сопутствующей патологии, проводилось физикальное обследование, клинический и биохимический анализы крови и мочи, выполнялись инструментальные методы исследования (ультрасонография брюшной полости и забрюшинного пространства, фиброэзофагогастродуоденоскопия (ФЭГДС) с осмотром устья большого дуоденального соска, рентгенография грудной клетки, электрокардиография). При необходимости выполнялись другие специальные методы исследования и назначались консультации профильных специалистов.

Спектр дополнительных методов исследования у пациентов 1–6-й групп и сроки их выполнения представлены в таблице 3. Для идентификации микрофлоры осуществлялось исследование спектра жирных кислот, альдегидов и стероидов при помощи газожидкостной хромато-масс-спектрометрии в плазме крови, пузырной желчи, биоптате стенки желчного пузыря и желчных конкрементах; бактериологическое исследование пузырной желчи, биоптата стенки желчного пузыря и желчных конкрементов.

Таблица 4 – Дополнительные методы исследования у пациентов 1–6-й групп

Методы исследования	Группа исследования	Биологический материал	Сроки забора
Газожидкостная хромато-масс-спектрометрия (определение спектра жирных кислот, альдегидов и стероидов)	1-я группа	Кровь	Однократно
	2–6-я группы		При поступлении до начала лечения; на 7-е сутки послеоперационного периода
	2–6-я группы	Пузырная желчь; биоптат стенки желчного пузыря;	Интраоперационно

Продолжение таблицы 4

Методы исследования	Группа исследования	Биологический материал	Сроки забора
Бактериологический метод	2–6-я группы	Пузырная желчь; биоптат стенки желчного пузыря;	Интраоперационно
Сканирующая электронно-ионная микроскопия для визуализации биоплёнок микроорганизмов	2–6-я группы	Биоптат стенки желчного пузыря; желчные конкременты	Интраоперационно

Клинические диагнозы во всех случаях были подтверждены результатами гистологического исследования.

Продолжительность пребывания в стационаре пациентов 2-й группы составила ($7,43 \pm 0,84$) койко-дня, 3-й группы – $8,9 \pm 3,2$, 4-й группы – $7,0 \pm 1,5$, 5-й группы – $13,0 \pm 7,3$, 6-й группы – $10,6 \pm 4,7$.

2.2 Инструментальные методы исследования

Ультразвуковое исследование органов брюшной полости и забрюшинного пространства выполнено всем пациентам 1–6-й групп с помощью аппарата SonoScape SSI-8000 (Китай) конвексным датчиком с частотой 3,5 МГц.

У всех пациентов оценивалась структура и размеры печени, желчного пузыря, наличие в нём конкрементов, их количество и размеры, диаметр общего желчного протока, наличие в его просвете конкрементов и объёмных образований в терминальном отделе, воротах печени, размеры и структура поджелудочной железы, наличие очаговых образований поджелудочной железы, диаметр вирсунгова протока.

Фиброэзофагогастродуоденоскопия выполнена всем пациентам 2–6-й групп в первые сутки пребывания в стационаре. При проведении ФЭГДС

обращали внимание на воспалительные, эрозивные и язвенные поражения пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки (ДПК), разрывы слизистой на границе пищевода и кардиального отдела желудка, наличие и характер желчи в ДПК.

2.3 Лабораторные методы исследования

Клинические и биохимические анализы крови и мочи выполнены в лаборатории КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 4», КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница № 7», МБУЗ «Городская больница № 1» города Красноярска. Из биохимических показателей определяли уровень билирубина, амилазы, мочевины, креатинина, общего белка, аланинаминотрансферазы (АлТ) и аспартатаминотрансферазы (АсТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), глюкозы крови.

Забор крови у пациентов 2–6-й групп осуществлялся при поступлении в отделение, на 3-и и 7-е сутки; в случае пребывания в отделении реанимации и интенсивной терапии – ежедневно; при продолжительности лечения до 16 суток – также на 14-е сутки наблюдения, при продолжительности лечения до 35 дней – также на 20-е и 30-е сутки наблюдения.

Исследование крови, пузырной желчи, биоптата стенки желчного пузыря и желчных конкрементов методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии для идентификации микрофлоры (масс-спектрометрия микробных маркеров) проводилось в ЦНИЛ КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого (заведующий лабораторией доктор медицинских наук, профессор Ю. В. Котловский, ректор доктор медицинских наук, профессор И. П. Артюхов). Забор крови у пациентов 1-й группы для определения спектра жирных кислот, альдегидов, стероидов и выявления микроорганизмов производился однократно; у пациентов 2–6-й групп – при поступлении до начала антибактериальной терапии, а также на 7-е сутки послеоперационного периода.

Кровь забиралась в количестве 9 мл и помещалась в полипропиленовую

пробирку Vacutainer, содержащую этилендиаминтетрауксусную кислоту (1 мг /1 мл крови) и аprotинин (500 ЕД /1 мл крови), центрифугировалась при 1 600 оборотах в течение 15 минут. Плазма переносилась в новую полипропиленовую пробирку. Для достижения максимальной стабильности она хранилась при температуре $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Исследование биологических материалов для определения спектра жирных кислот, альдегидов и стероидов проводилось на хроматографе с масс-спектрометрическим детектором Agilent Technologies 6890N, Agilent Technologies 5975C (США, 2007 г.). Результат был представлен на хроматограмме.

Желчные конкременты, биоптат стенки желчного пузыря и пузырную желчь для исследования на хроматографе забирали интраоперационно в стерильных условиях в стерильные пластиковые пробирки емкостью 15 мл с плотно закручивающейся крышкой.

Была использована следующая технология пробоподготовки для масс-спектрометрии микробных маркеров:

1) высушивание жидких проб (крышка открыта). Цельная кровь, желчь 40 мкл + 40 мкл CH_3OH (метанола) (равное по объёму количество). Аспираты, биоптаты, желчный камень 6–8 мг + 40 мкл CH_3OH ;

2) метанолиз в 1 М HCl (соляная кислота) в течение 1 часа в термостате при $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (крышка закрыта). Метанолиз проводят в 0,4 мл 1 М HCl в CH_3OH (соляная кислота в метаноле). Раствор для метанолиза: соотношение 1,2 : 10. Пример: 1,2 мл (конц. HCl) : 10 мл (CH_3OH). М (конц. HCl) = 10–12 М => концентрация становится 1–1,2 М. На этой стадии происходит освобождение жирных кислот и альдегидов из сложных липидов микроорганизмов и других клеток жидкости в виде метиловых эфиров (МЭЖК) и диметилацеталей (ДМА). HCl (2-е действие): разрушает сложные эфирные связи ЖК + глицерин в фосфолипидах и катализирует метилирование;

3) экстракция гексаном. 400 мкл гексана + 5 мкл стандарта (дейтерометиловый эфир тридекановой кислоты). Стандарт нужен только для тех проб, чей объём (массу) мы можем измерить;

- 4) смешивание на шейкере в течение 5 минут;
- 5) отстаивание в течение 5 минут;
- 6) отбор гексанового слоя в новую виалу;
- 7) высушивание гексанового экстракта при открытой крышке в течение 5–7 минут;
- 8) триметилсилирование. Сухой остаток обрабатывали 20 мкл N,O-бис(триметил-силил)-трифторацетамида в течение 10 минут при 80 °С (для получения триметилсилильных эфиров окси-кислот и стеролов). Триметилсилирование увеличивает летучесть вещества, что используется в газовой хроматографии при анализе нелетучих веществ;
- 9) к реакционной смеси эфиров добавляли гексан. К реакционной смеси эфиров добавляли 80 мкл гексана и переносили раствор из виалы во вставку;
- 10) Хранение. Образцы биологической жидкости или ткани обрабатывали сразу или замораживали и хранили при температуре – 5–18 °С в случае, когда немедленный анализ невозможен. Допускается транспортировка проб при нормальной температуре в течение пяти часов. Допускается длительное хранение в высушенном виде при необходимости дальнейшей транспортировки или пересылки пробы по почте (высушивание при температуре 70–85 °С).

Условия хроматографического разделения: начальная температура 130 °С, выдержка при начальной температуре 0,5 мин, нагрев температуры со скоростью 7 °С/мин до 320 °С, выдержка при конечной температуре 6 минут. Газ-носитель гелий, поток 1,2 мл/мин в режиме без деления потока.

Для количественного определения химических маркеров микроорганизмов в пробе использовали режим регистрации селективных ионов (SIM), так как при исследовании в сканирующем режиме по полному ионному току (SCAN) определяется большое количество мешающих анализу примесей. Хроматограммы записывали в режиме регистрации выделенных ионов (SIM) при периодическом сканировании до тридцати ионов в пяти интервалах времени. Интервалы и ионы выбирали таким образом, чтобы селективно детектировать маркеры определяемых видов микроорганизмов. В том числе использовали характерный

ион $m/z = 87$ в спектрах жирных кислот для детектирования малых количеств микробных кислот C12–C15, C17, C19. Ион 175 включали в каждый интервал, кроме пятого, для детектирования β -оксикислот, для которых он специфичен и интенсивен в спектре. Также использование режима регистрации выделенных ионов позволяет значительно снизить «шум».

При хромато-масс-спектрометрическом исследовании фракций метиловых эфиров жирных кислот, альдегидов, стеринов в пробах найдено, что основными компонентами (на уровне содержания более 1 % от максимального пика в хроматограмме) являются кислоты с чётным количеством атомов углерода: C16 : 0, C18 : 0, C20 : 0 (в порядке уменьшения содержания в профиле жирных кислот), а также полиненасыщенные жирные кислоты: C20 : n, C22 : n, холестерин, ситестерол, насыщенные прямоцепочечные альдегиды и 2-гидрокси-кислоты. Кислоты с нечётным количеством C15 : 0 и C17 : 0 составляют около 1 % каждая.

Перечисленные выше вещества являются липидными компонентами клеток организма человека и составляют естественный фон, на котором в исследованных пробах выявлены компоненты, специфичные для микробных клеток.

Исследование пузырной желчи и биоптата стенки желчного пузыря, желчных конкрементов, взятых интраоперационно (2–6-я группы), выполнялось на кафедре микробиологии им. доц. Б. М. Зельмановича КрасГМУ им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого (заведующая кафедрой кандидат биологических наук, доцент О. В. Перьянова, ректор доктор медицинских наук, профессор И. П. Артюхов).

Все исследуемые материалы забирали и делали посевы согласно требованиям приказа Министерства здравоохранения СССР от 22.04.1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений» и рекомендациям Всемирной организации здравоохранения.

Желчь для исследования получали интраоперационно, путём пункции

желчного пузыря и заседали на среду для контроля стерильности (СКС) в соотношении 1 : 10 и для количественного учёта методом секторных посевов по Gould на 5 %-ный кровяной агар (КА), среду Эндо. Для определения анаэробных микроорганизмов посев производили по Gould на среду Шадлера (ША) с добавлением 5 % крови; чашки с посевами помещали в индивидуальные газогенераторные пакеты Genbag anaer (BioMerieux, Франция) при 37 °С на 48–96 часов. Выросшие колонии отседали на чашки Петри с ША и культивировали в аэробных и анаэробных условиях. Рост культуры только при анаэробнозе свидетельствует о строго анаэробном типе дыхания, в противном случае – о принадлежности к факультативным анаэробам.

Биоптаты стенки желчного пузыря помещали в стерильные пробирки. Для определения степени обсеменённости патологического материала биоптат весом 200–500 мг растирали в стерильной ступке с кварцевым песком и добавляли физиологический раствор для получения разведения 1 : 10. Полученную суспензию сеяли на питательные среды (КА, Эндо, кровяной ША) по методу Gould, а также СКС; посевы культивировали в обычных условиях и условиях анаэробноза при температуре 37 °С.

Конкременты перед посевом отмывались в стерильном физиологическом растворе в цельном виде, а также в виде сколов. Затем методом отпечатков заседали на плотные питательные среды: Эндо, КА, кровяной ША. Параллельно камни помещали в среду СКС и через 24–48 часов инкубации делали высев на вышеназванные питательные среды с последующим культивированием при тех же условиях.

Забор испражнений осуществлялся сразу после естественной дефекации стерильными ректальными петлями в одноразовые стерильные контейнеры. Для посева готовили десятикратные разведения с 10^{-1} до 10^{-10} в стерильном физиологическом растворе. Из полученных разведений производили посев на комплекс питательных сред согласно приказу Минздрава России от 09.06.2003 г. № 231 «Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (вместе с ОСТ 91500.11.0004-2003).

Посевы испражнений производили на плотные питательные среды Плоскирева, Левина, Сабуро, желточно-солевой агар по 0,1 мл из разведения 10^{-1} и 1 мл в жидкую накопительную магниевую среду, из которой через одни сутки осуществляли высев на висмут-сульфит агар. Из разведений 10^{-3} – на среды Сабуро и желточно-солевой агар, из разведений 10^{-5} – 10^{-6} – на среды Эндо и 5 %-ный кровяной агар; из разведения 10^{-6} – 10^{-8} – на лактобакагар. Из разведений 10^{-5} – 10^{-10} по 1 мл засеивали в регенерированную среду для выделения *Bifidobacterium spp.*, из разведения 10^{-3} , 10^{-6} , 10^{-8} – в регенерированную железосульфитную среду, после предварительного прогрева засеиваемого материала на водяной бане (20 мин при 80 °С).

Количество микроорганизмов (N) определяли по числу выросших на соответствующих питательных средах колоний с последующим пересчётом на 1 г испражнений по формуле:

$$N = K \times 10^n \times 10,$$

где K – количество выросших колоний;

n – степень разведения.

Количество *Bifidobacterium spp.* устанавливали по предельному разведению, в котором наблюдается их рост. Идентификацию данных микроорганизмов осуществляли по характерному росту и выявлению грамположительных палочек, расположенных в виде китайских иероглифов, с булавовидными утолщениями на концах.

Количество *Clostridium spp.* определяли по предельному разведению, давшему рост характерных чечевицеобразных колоний чёрного цвета или дискообразных «ватных комочков» в глубине столбика среды и специфическим морфо-тинкториальным признакам.

При оценке результатов бактериологического исследования испражнений исходили из показателей нормы для двух возрастных групп (до 60 и старше 60 лет) (таблица 5) согласно приказу Минздрава России от 09.06.2003 г. № 231 «Об утверждении отраслевого стандарта «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (вместе с ОСТ 91500.11.0004-2003).

Таблица 5 – Количественный и качественный состав нормофлоры кишечника

Наименование микроорганизма	Среднее значение КОЕ/1г испражнений	
	до 60 лет	старше 60 лет
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^9-10^{10}	10^8-10^9
<i>Lactobacterium spp.</i>	10^7-10^8	10^6-10^7
<i>Bacteroides spp.</i>	10^9-10^{10}	$10^{10}-10^{11}$
<i>Enterococcus spp.</i>	10^5-10^8	10^6-10^7
<i>Fusobacterium spp.</i>	10^8-10^9	10^8-10^9
<i>Eubacterium spp.</i>	10^9-10^{10}	10^9-10^{10}
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	10^9-10^{10}	10^{10}
<i>Clostridium spp.</i>	$\leq 10^5$	$\leq 10^6$
<i>E. coli</i> типичные	10^7-10^8	10^7-10^8
<i>E. coli</i> лактозонегативные	$< 10^5$	$< 10^5$
<i>E. coli</i> гемолитические	0	0
<i>Staphylococcus spp.</i> (коагулазонегативные –	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0
Дрожжеподобные грибы <i>Candida spp.</i>	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$
Другие условнопатогенные энтеробактерии*	$< 10^4$	$< 10^4$
Неферментирующие бактерии**	$\leq 10^4$	$\leq 10^4$

* *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Hafnia spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella spp.*, *Providencia spp.*, *Citrobacter spp.* и др.

** *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* и др.

Степени дисбиоза кишечника		
Степень	до 60 лет	старше 60 лет
I степень	Снижение содержания <i>Bifidobacterium spp.</i> до 10^7-10^6 КОЕ/г, <i>Lactobacterium spp.</i> до 10^6-10^5 КОЕ/г, типичных <i>E. coli</i> до 10^6-10^5 КОЕ/г, возможно повышение содержания типичных <i>E. coli</i> до 10^9-10^{10} КОЕ/г	Снижение содержания <i>Bifidobacterium spp.</i> до 10^7-10^8 КОЕ/г, <i>Lactobacterium spp.</i> до 10^5-10^4 КОЕ/г, типичных <i>E. coli</i> до 10^6-10^5 КОЕ/г, возможно повышение содержания типичных <i>E. coli</i> до 10^9-10^{10} КОЕ/г

Продолжение таблицы 5

Наименование микроорганизма		Среднее значение КОЕ/1г испражнений	
		до 60 лет	старше 60 лет
II степень	Снижение содержания <i>Bifidobacterium spp.</i> до 10^7 и ниже КОЕ/г, <i>Lactobacterium spp.</i> до 10^5 и ниже КОЕ/г, повышение содержания гемолитических <i>E. coli</i> или других условнопатогенных бактерий до концентрации 10^5 – 10^7 КОЕ/г или обнаружение ассоциаций условнопатогенных микроорганизмов в концентрации 10^4 – 10^5 КОЕ/г	Снижение содержания <i>Bifidobacterium spp.</i> до 10^6 и ниже КОЕ/г, <i>Lactobacterium spp.</i> до 10^4 и ниже КОЕ/г, повышение содержания гемолитических <i>E. coli</i> или других условнопатогенных бактерий до концентрации 10^5 – 10^7 КОЕ/г или обнаружение ассоциаций условнопатогенных микроорганизмов в концентрации 10^4 – 10^5 КОЕ/г	
III степень	Снижение содержания <i>Bifidobacterium spp.</i> до 10^7 и ниже КОЕ/г, <i>Lactobacterium spp.</i> до 10^5 и ниже КОЕ/г, обнаружение ассоциаций условнопатогенных микроорганизмов в концентрации 10^6 – 10^7 и выше КОЕ/г	Снижение содержания <i>Bifidobacterium spp.</i> до 10^6 и ниже КОЕ/г, <i>Lactobacterium spp.</i> до 10^4 и ниже КОЕ/г, обнаружение ассоциаций условнопатогенных микроорганизмов в концентрации 10^6 – 10^7 и выше КОЕ/г	

Таксономическую принадлежность выделенных культур определяли с учётом их морфо-тинкториальных, культуральных, биохимических и антигенных свойств.

Идентификацию микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* осуществляли согласно руководствам для идентификации энтеробактерий.

Грамположительные кокки идентифицировали согласно методическим рекомендациям по выявлению и идентификации бактерий рода *Staphylococcus* и

приказам Министерства здравоохранения СССР от 1985 г. № 535 и от 1978 г. № 720.

Неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОБ) идентифицировали в соответствии с «Методическими рекомендациями по определению грамотрицательных потенциально патогенных бактерий – возбудителей внутрибольничных инфекций».

Идентификацию дрожжеподобных грибов до рода осуществляли по характерному росту колоний на среде Сабуро с учётом морфологии клеток, способности к образованию ростовых трубок, а также с использованием дифференциально-диагностической среды «Candiselect» (Bio-Rad, США) (для идентификации до вида).

Идентификацию анаэробных микроорганизмов проводили с использованием тест-системы API 20A (BioMerieux, Франция).

Стрип API 20A состоит из микролунок, содержащих дегидрированные субстраты. Регидратация субстратов происходит при внесении в лунки суспензии исследуемой культуры. В результате накопления продуктов метаболизма происходит изменение цвета среды, спонтанное или проявляющееся при добавлении реактивов. Стрипы помещаются в индивидуальные газогенераторные пакеты этой же фирмы. Идентификация осуществлялась при помощи специального программного обеспечения API Lab.

Определение чувствительности выделенных культур к антибактериальным препаратам проводилось диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтона в соответствии со стандартами Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) – Института клинических и лабораторных стандартов. Интерпретация результатов осуществлялась на основании сопоставления размеров диаметра зоны задержки роста с пограничными значениями этих параметров, дифференцирующих чувствительные штаммы от промежуточных и промежуточные от устойчивых (таблица 6).

Таблица 6 – Критерии интерпретации результатов определения чувствительности микроорганизмов: пограничные значения диаметров зон подавления роста и минимальные подавляющие концентрации (согласно МУК 4.2.1890-04)

Антибактериальные препараты	Содержание в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм			Минимальная подавляющая концентрация, мг/л		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
<i>Сем. Enterobacteriaceae</i> (<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Serratia marcescens</i>)							
Амикацин	30	≤ 14	15–16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16
Амоксициллин	20/10	≤ 13	14–17	≥ 18	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4
Ампициллин сульбактам	10/10	≤ 11	12–14	≥ 15	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4
Гентамицин	10	≤ 12	13–14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
Доксициклин	30	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 16	8	≤ 4
Левифлоксацин	5	≤ 13	14–16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2
Меропенем	10	≤ 13	14–15	≥ 16	≥ 16	8	≤ 4
Пефлоксацин	5	≤ 15	16–21	≥ 22	≥ 8	4	≤ 1
Цефазолин	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефепим	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефоперазон сульбактам	75/30	≤ 15	16–20	≥ 21	≥ 64	16–64	≤ 16
Цефотаксим	30	≤ 14	15–22	≥ 23	≥ 64	16–32	≤ 8
Ципрофлоксацин	5	≤ 15	16–20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1
<i>Неферментирующие грамотрицательные бактерии</i> (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Moraxella spp.</i> , <i>Acinetobacter spp.</i> , <i>Flavobacterium spp.</i>)							
Амикацин	30	≤ 14	15–16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16
Ампициллин сульбактам	10/10	≤ 11	12–14	≥ 15	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4
Гентамицин	10	≤ 12	13–14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
Доксициклин	30	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 16	8	≤ 4
Левифлоксацин	5	≤ 13	14–16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2
Меропенем	10	≤ 13	14–15	≥ 16	≥ 16	8	≤ 4
Пефлоксацин	5	≤ 12	13–16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2
Цефепим	30	≤ 14	15–17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8
Цефоперазон сульбактам	75/30	≤ 15	16–20	≥ 21	≥ 64	16–64	≤ 16
Цефотаксим	30	≤ 14	15–22	≥ 23	≥ 64	16–32	≤ 8
Ципрофлоксацин	5	≤ 15	16–20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1

Продолжение таблицы 6

Антибактериальные препараты	Содержание в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм			Минимальная подавляющая концентрация, мг/л		
		Р	П	Ч	Р	П	Ч
<i>Staphylococcus epidermidis, Staphylococcus saprophyticus</i>							
Амикацин	30	≤ 14	15–16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16
Ванкомицин	30	—	—	≥ 15	≥ 32	8–16	≤ 4
Гентамицин	10	≤ 12	13–14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4
Доксициклин	30	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 16	8	≤ 4
Клиндамицин	2	≤ 14	15–20	≥ 21	≥ 4	1–2	≤ 0,5
Левифлоксацин	5	≤ 13	14–16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2
Линезолид	30	—	—	≥ 21	—	—	≤ 4
Линкомицин	15	≤ 17	17–20	≥ 21	≥ 8	4–8	≤ 2
Пефлоксацин	5	≤ 15	16–21	≥ 22	≥ 8	4	≤ 1
Ципрофлоксацин	5	≤ 15	16–20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1
Эритромицин	15	≤ 13	14–22	≥ 23	≥ 8	1–4	≤ 0,5
<i>Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis</i>							
Ванкомицин	30	≤ 14	15–16	≥ 17	≥ 32	8–16	≤ 4
Гентамицин (высокий)	120	6	7–9	≥ 10	≥ 500	—	<500
Доксициклин	30	≤ 12	13–15	≥ 16	≥ 16	8	≤ 4
Левифлоксацин	5	≤ 13	14–16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2
Линезолид	30	≤ 20	21–22	23	8	4	≤ 2
Ципрофлоксацин	5	≤ 15	16–20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1
Эритромицин	15 мг	≤ 13	14–22	≥ 23	≥ 8	1–4	≤ 0,5
<i>Streptococcus faecalis</i>							
Ванкомицин	30	—	—	≥ 17	—	—	≤ 1
Клиндамицин	2	≤ 15	16–18	≥ 19	≥ 1	0,5	≤ 0,25
Левифлоксацин	5	≤ 13	14–16	≥ 17	≥ 8	4	≤ 2
Линезолид	30	—	—	≥ 21	—	—	≤ 2
Цефотаксим	30	≤ 25	26–27	≥ 28	≥ 2	1	≤ 0,5
Эритромицин	15	≤ 15	16–20	≥ 21	≥ 1	0,5	≤ 0,25

Параллельно с тестированием клинических изолятов проводили контроль качества исследования с использованием референс-штаммов, принадлежащих к

American Type Culture Collection (ATCC) – Американской коллекции типовых культур микроорганизмов *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 в соответствии с видовой принадлежностью выделенных культур (таблица 7).

Таблица 7 – Допустимые диапазоны значений диаметров зон подавления роста и минимальных подавляющих концентраций для контрольных штаммов микроорганизмов с обычными питательными потребностями МУК 4.2.1890-04

Антибактериальные препараты	Содержание в диске, мкг	Диаметр зон подавления роста, мм			Минимальная подавляющая концентрация, мг/л
		Р	П	Ч	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212					
Амикацин	—	—	—	—	64–256
Амоксициллин клавуланат	—	—	—	—	0,25/0,12–1,0/0,5
Ванкомицин	—	—	—	—	1–4
Гентамицин	—	—	—	—	4–16
Клиндамицин	—	—	—	—	4–16
Левофлоксацин	—	—	—	—	0,25–2
Линезолид	—	—	—	—	1–4
Меропенем	—	—	—	—	2–8
Ципрофлоксацин	—	—	—	—	0,25–2
Эритромицин	—	—	—	—	1–4
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922					
Амикацин	30	19–26			0,5–4
Амоксициллин клавуланат	20/10	18–24			2/1–8/4
Ампициллин сульбактам	10/10	19–24			2/1–8/4
Гентамицин	10	19–26			0,25–1
Доксициклин	30	18–24			0,5–2
Левофлоксацин	5	29–37			0,008–0,06
Меропенем	10	28–34			0,008–0,06
Цефазолин	30	21–27			1–4
Цефепим	30	31–37			0,016–0,12
Цефотаксим	30	29–35			0,03–0,12

Продолжение таблицы 7

Ципрофлоксацин	5	30–40	0,004–0,016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853			
Амикацин	30	18–26	1–4
Гентамицин	10	16–21	0,5–2
Левифлоксацин	5	19–26	0,5–4
Меропенем	10	27–33	0,25–1
Цефепим	30	24–30	1–8
Цефотаксим	30	18–22	8–32
Ципрофлоксацин	5	25–33	0,25–1

Референс-штаммы характеризуются генетической стабильностью по основным показателям, в том числе и по уровню чувствительности к антимикробным препаратам. Если при исследовании чувствительности референтных штаммов полученные данные о диаметре зон задержки роста соответствуют паспортным характеристикам этих штаммов, то это свидетельствует о стандартности условий постановки эксперимента. Выбор антимикробных препаратов для тестирования клинических штаммов осуществлялся на основании рекомендуемых перечнем антимикробных препаратов согласно Методическим указаниям 4.2.1890-04 от 04.03.2004 г. «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (МУК 4.2.1890-04) с учётом рекомендаций клинического фармаколога и данных о природной чувствительности отдельных видов микроорганизмов или их групп. Для определения чувствительности к антимикробным препаратам аэробных и факультативно-анаэробных культур микроорганизмов использованы диски со следующими антимикробными препаратами: группы пенициллина (ампициллин сульбактам, амоксициллин клавулонат), цефалоспорины I (цефазолин), III (цефотаксим, цефоперазон сульбактам), IV поколений (цефепим), аминогликозиды (амикацин, гентамицин), фторхинолоны (ципрофлоксацин, пефлоксацин, левофлоксацин), гликопептиды (ванкомицин), линкозамиды (линкомицин, клиндамицин), оксазолидиноны (линезолид), карбапенемы (меропенем), тетрациклины (доксциклин), макролиды

(эритромицин), противопротозойные препараты с антибактериальной активностью (метронидазол).

Для определения чувствительности к антимикробным химиопрепаратам анаэробных микроорганизмов использовалась тест-система АТВ АНА (BioMerieux, Франция), включающая пенициллин G (PEN), амоксициллин / клавулановая кислота (АМС), пиперациллин (PIC), пиперациллин / тазобактам (TZP), тикарциллин / клавулановая кислота (ТСС), цефоксетин (СХТ), цефотетан (СТТ), имипенем (ИМ), клиндамицин (СЛИ), хлорамфеникол (СМР), метронидазол (МТР), амоксициллин (АМО), амоксициллин (АМО 16), амоксициллин/клавулановая кислота (АМС 16), тикарциллин (ТИС 64), метронидазол (МТР 4) (таблица 8).

Таблица 8 – Допустимые концентрации антибактериального препарата тест-системы АТВ АНА (BioMerieux, Франция) для анаэробных микроорганизмов

Название антибактериального препарата (аббревиатура)	Название антибактериального препарата	Концентрация антибактериального препарата, мг/л	Результат (QC5)*
PEN	Пенициллин G	0,5–2,0	R
АМС	Амоксициллин / клавулановая кислота	4/2–8/4	S
PIC	Пиперациллин	32–64	S
TZP	Пиперациллин / тазобактам	32/4–64/4	S
ТСС	Тикарциллин / клавулановая кислота	32/2–64/2	S
СХТ	Цефоксетин	16–32	S
СТТ	Цефотетан	16–32	S
ИМ	Имипенем	4–8	S

Продолжение таблицы 8

Название антибактериального препарата (аббревиатура)	Название антибактериального препарата	Концентрация антибактериального препарата, мг/л	Результат (QC5)*
CLI	Клиндамицин	2–4	S
СМР	Хлорамфеникол	8–16	S
MTR	Метронидазол	8–16	S
АМО	Амоксициллин	2–4	R
АМО 16	Амоксициллин	16	S/R
АМС 16	Амоксициллин / клавулановая кислота	16/2	S
ТИС 64	Тикарциллин	64	S
MTR 4	Метронидазол	4	S

* Контрольный штамм 5 (QC5): *Bacteroides fragilis* ATCC®25285.

Примечание: концентрация антимикробных препаратов в верхней части стрипа АТВ АНА соответствует рекомендациям CLSI 2007 (2), кроме концентрации пенициллина G, которая соответствует рекомендациям NCCLS (CLSI) 2000 (1) (National Committee for Clinical Laboratory Standards – Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам США).

Для изучения чувствительности микроорганизмов к антимикробным средствам были использованы выделенные из исследованных патологических материалов *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus fecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus fecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis*, *Moraxella spp.*, *Actinomyces spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Flavobacterium spp.*

Исследование образцов биоптатов стенки желчного пузыря, желчных конкрементов, забранных интраоперационно, а также фрагментов общего

желчного протока, забранных на аутопсии, больных желчнокаменной болезнью проводилось на сканирующем электронно-ионном микроскопе в лаборатории анатомии микроорганизмов Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи, г. Москва (заведующая лабораторией доктор медицинских наук Л. В. Диденко, директор центра академик РАН, профессор А. Л. Гинцбург).

Образцы забирались в стерильных условиях, фиксировались нейтральным раствором формалина. Для исследования методом сканирующей электронной микроскопии были приготовлены образцы камней, у которых была изучена поверхность, обращённая в полость желчного пузыря, и внутренняя поверхность искусственного скола камня, а также эпителиальная выстилка желчного пузыря и общего желчного протока. Фиксированные образцы были только напылены золотом 999-й пробы толщиной до 8 мкм в напылительной установке SPI-Module Sputter/Carbon Coater System (SPI Inc., USA) (рисунок 6) для лучшей визуализации при микроскопии и не подвергались дегидратации и дополнительной фиксации. Образцы были проанализированы в сканирующем электронно-ионном микроскопе Quanta 200 3D (FEI Company USA) (рисунок 7) в режиме высокого вакуума и изучены с помощью рентгеновского микроанализа.

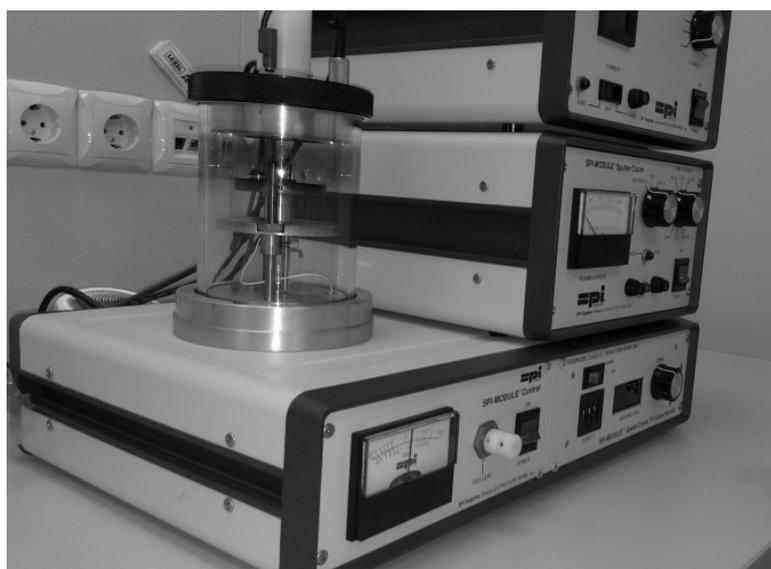


Рисунок 6 – Напылительная установка SPI-Module Sputter/Carbon Coater System (SPI Inc., USA)



Рисунок 7 – Сканирующий электронно-ионный микроскоп Quanta 200 3D
(FEI Company USA)

После микроскопии нативного материала под увеличением до 16000 раз образец подвергался воздействию 96 %-ного этанола для дегидратации, целью которой являлось экстрагирование экзополиматрикс биоплёнки, и микроскопировался повторно.

2.4 Принципы расширенной экспресс-идентификации микроорганизмов и возможности раннего назначения рациональной антимикробной химиотерапии

На сегодняшний день остаётся дискуссионным вопрос о поиске возможностей раннего назначения рациональной антимикробной химиотерапии, основными задачами которой является прицельное бактерицидное или бактериостатическое действие на агента-возбудителя как в монокультуре, так и при микст-инфекциях, с замедлением развития резистентности микроорганизмов к применяемым препаратам, и минимизация воздействия на нормофлору различных биотопов макроорганизма.

Классический метод бактериологической диагностики, как известно, наряду с неоспоримыми преимуществами, такими, как точность идентификации

микроорганизмов, возможность выявления индивидуальной чувствительности культур к антимикробным химиопрепаратам, имеет ряд существенных недостатков, таких, как длительность исследования (4–5 и более суток), сложность культивации и идентификации определённых видов микроорганизмов, в том числе строгих анаэробов, микроаэрофилов, актиномицентов.

Одним из вариантов ранней расширенной экспресс-диагностики спектра микроорганизмов-возбудителей инфекционно-воспалительного процесса является применение газожидкостной хромато-масс-спектрометрии с последующей возможностью назначения антимикробных химиопрепаратов на основании природной чувствительности и рекомендаций клинического фармаколога. А затем при получении результатов бактериологического метода продолжить назначенную терапию или внести коррективы. Кроме того, газожидкостная хромато-масс-спектрометрия может быть использована в качестве метода динамического контроля клинической эффективности антимикробной терапии.

Особое значение этот метод имеет в условиях ургентной абдоминальной хирургии, в том числе у пациентов с желчнокаменной болезнью, острым калькулёзным холециститом с перивезикальными осложнениями, как на дооперационном этапе, так и в послеоперационном периоде, с учётом важности адекватного назначения антибактериальной терапии.

2.5 Статистическая обработка материала

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы SPSS Statistics 17.0 с соблюдением принципов статистического анализа, принятых для исследований в биологии и медицине.

Результаты приведены в среднем значении со средней квадратичной ошибкой ($M \pm m$).

В малых выборках (количество единиц наблюдения менее 30) значимость различий оценивалась с помощью непараметрического критерия Вилкоксона (T) для связанных выборок и критерия Вилкоксона-Манна-Уитни (U) для

несвязанных выборок.

Для сопоставления выборок по частоте встречаемости явления использован угловой критерий Фишера (ϕ).

Для исследования взаимосвязей между изучаемыми параметрами проводили парный корреляционный анализ по Пирсону.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Обследовано 145 пациентов с желчнокаменной болезнью, хроническим и острым калькулёзным холециститом, составивших 2–6-ю исследуемые группы. 23 пациента с хроническим калькулёзным холециститом составили 2-ю группу. 122 человека составили 3–6-ю группы с диагнозом острый калькулёзный холецистит (рисунок 8).

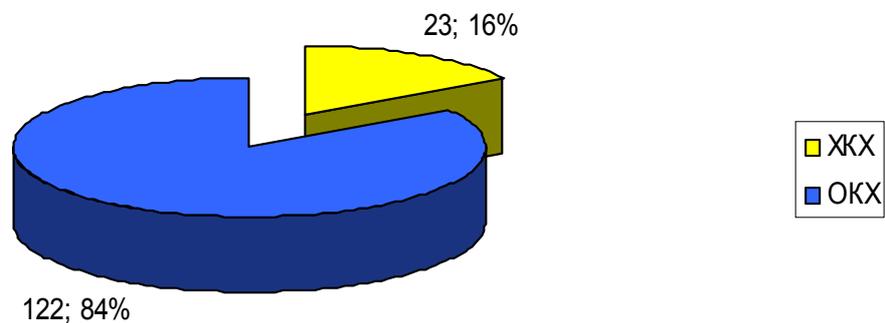


Рисунок 8 – Распределение пациентов 2–6-й групп в зависимости от предоперационного диагноза

Морфологически верифицированы следующие формы калькулёзного холецистита: хронический калькулёзный холецистит (ХКХ) – 23 (15,9 %), острый катаральный калькулёзный холецистит (ОККХ) – 44 (30,3 %) случая, флегмонозный калькулёзный холецистит (ФКХ) – 46 (31,7 %) и гангренозный калькулёзный холецистит (ГКХ) – 32 (22,1 %) случаев (рисунок 9).

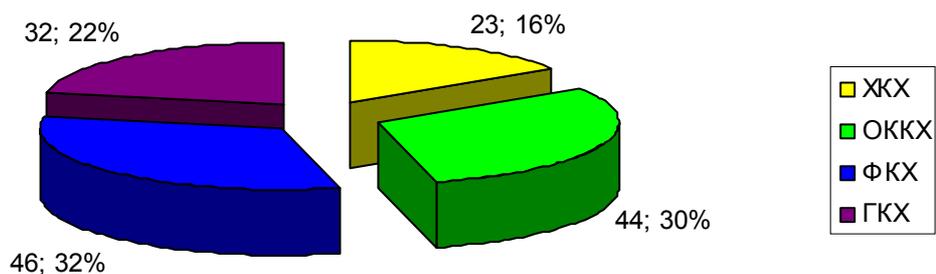
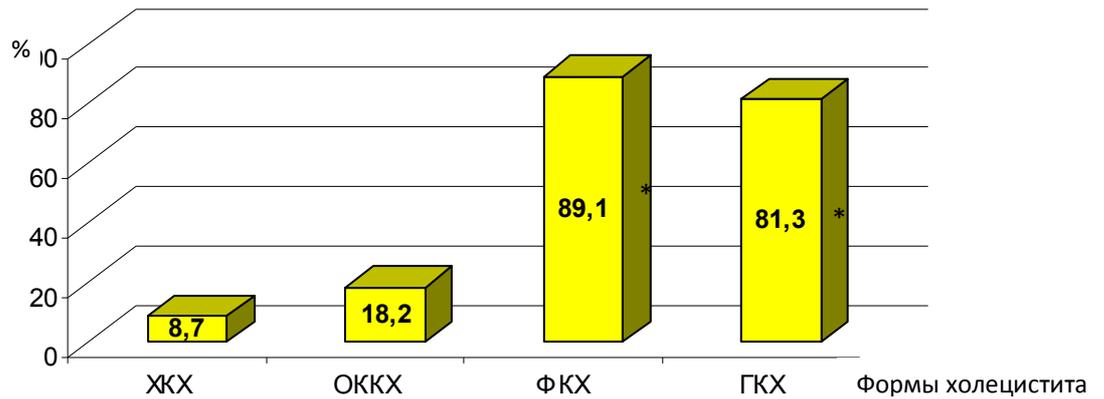


Рисунок 9 – Частота встречаемости различных гистологических форм калькулёзного холецистита

3.1 Результаты идентификации микрофлоры у больных желчнокаменной болезнью бактериологическим методом

Микробиологическое исследование пузырной желчи, биоптата стенки желчного пузыря и желчных конкрементов показало высокий процент положительных результатов посевов при ФКХ – 89,1 % и ГКХ – 81,3 %. При ОККХ высеваемость микроорганизмов составила всего 18,2 %, что, вероятно, свидетельствует о небольшой давности обтурации шейки желчного пузыря конкрементом и небольшой продолжительности воспалительного процесса в желчном пузыре, на первом этапе, носящего неинфекционный характер. При ХКХ высеваемость микроорганизмов составила всего 8,7 % (рисунок 10).

Всего в 72 случаях (49,7 %) на питательных средах отмечали рост микрофлоры (хотя бы в одном из трёх биоматериалов).



* $\varphi < 0,01$ (при критерии Фишера $> 2,31$) – при сравнении ФКХ с ХКХ и ГКХ с ХКХ.

Рисунок 10 – Высеваемость микроорганизмов при различных гистологических формах острого калькулёзного холецистита

При исследовании пузырной желчи выделены следующие монокультуры и их ассоциации.

При ОККХ в 2-х пробах были выделены *Escherichia coli* (рисунок 11), *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* (рисунок 12), а также *Staphylococcus epidermidis* (рисунок 13 и 14).



Рисунок 11 – Рост *Escherichia coli* на питательной среде при ОККХ при исследовании пузырной желчи

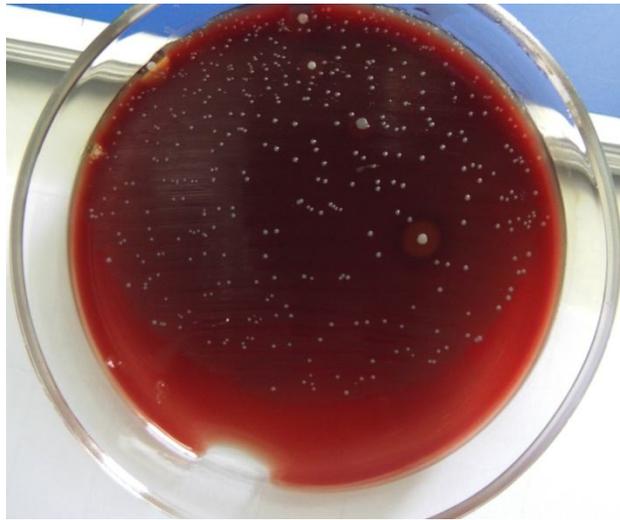


Рисунок 12 – Рост *Enterococcus faecalis* на питательной среде при ООКХ при исследовании пузырной желчи

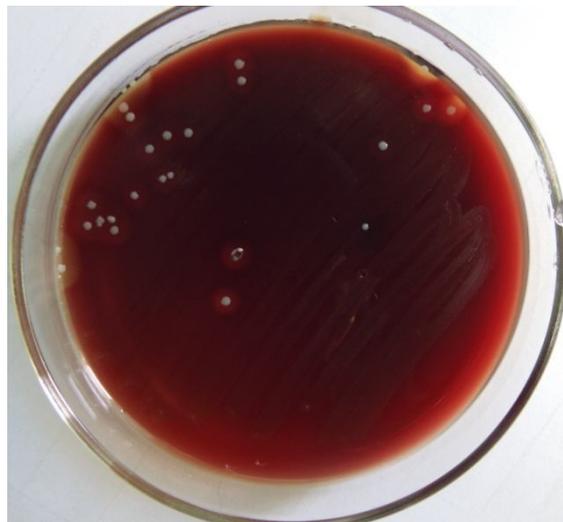


Рисунок 13 – Рост колоний *Staphylococcus epidermidis* у пациента с ООКХ при исследовании пузырной желчи



Рисунок 14 – Рост колоний *Staphylococcus epidermidis* у пациента с ООКХ на среде Ольницкого при исследовании пузырной желчи

При ФКХ в 37 пробах были выделены из желчи *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* (рисунок 15), *Serratia marcescens*, *Staphylococcus saprophyticus* (рисунок 16), *Pseudomonas aeruginosa*.



Рисунок 15 – Рост *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* на питательных средах при различных гистологических формах ФКХ при исследовании пузырной желчи

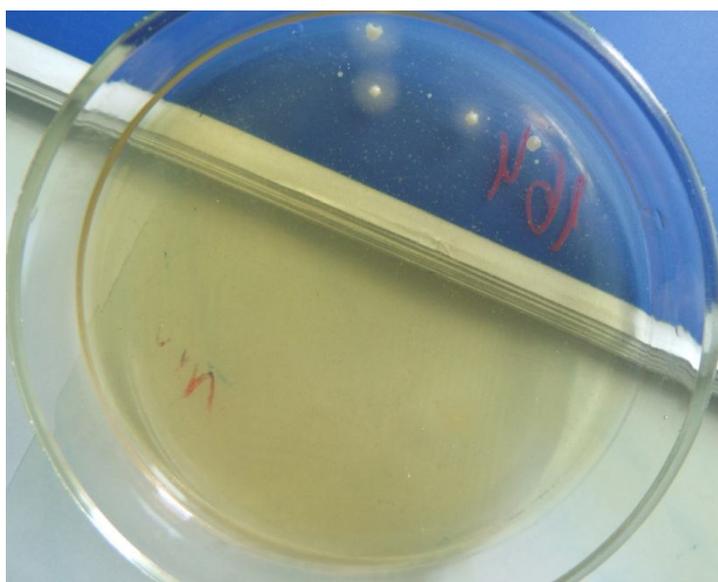


Рисунок 16 – Рост колоний *Staphylococcus saprophyticus* при ФКХ при исследовании пузырной желчи

Кроме того, у 1 пациента с диагнозом флегмонозный калькулёзный холецистит, перивезикальный абсцесс при посеве получена культура анаэробных грамотрицательных неспорообразующих палочковидных бактерий – *Bacteroides fragilis*.

При ГКХ в 24 пробах были выделены из желчи *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida spp.*, *Moraxella spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Acinetobacter calcoaceticus* (рисунок 17).



Рисунок 17 – Рост колоний *Acinetobacter calcoaceticus* у пациента с ГКХ при исследовании пузырной желчи

При ХКХ бактериохолия обнаружена не была.

При исследовании биоптата стенки желчного пузыря выделены следующие монокультуры и их ассоциации.

При ХКХ в 2 случаях были обнаружены *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*.

При ОККХ в 5 случаях были идентифицированы *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis*.

При ФКХ в 24 пробах были выделены из биоптата стенки желчного пузыря *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia*

coli (рисунок 18), *Streptococcus faecalis*.

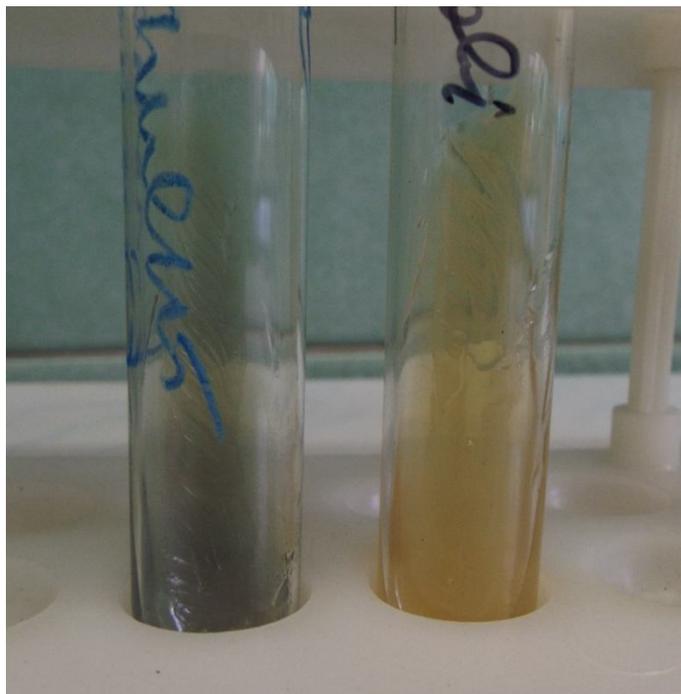


Рисунок 18 – Рост культур *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* при ФКХ при исследовании биоптата стенки желчного пузыря

При ГКХ в 14 образцах были выделены культуры *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida spp.*, *Moraxella spp.*

При исследовании посевов-отпечатков желчных конкрементов:

При ХКХ в 2 случаях были обнаружены *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*.

При ОКХХ в 7 случаях были идентифицированы *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*.

При ФКХ в 31 пробе были выделены *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*.

При ГКХ в 18 образцах были обнаружены *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*

Микробный пейзаж биоптатов и желчных конкрементов по качественному и количественному составу почти не отличался от микрофлоры желчи.

Таким образом, в желчи основную долю среди выделенных

микроорганизмов составили факультативно анаэробные грамположительные неспорообразующие кокки (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus faecalis*) – 34,5 % и факультативно анаэробные грамотрицательные неспорообразующие палочковидные энтеробактерии (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*) – 43,4 %; аэробные неспорообразующие грамотрицательные бактерии (представители семейства *Moraxellaceae*: *Moraxella spp.* (палочковидные, коккобациллы, *Moraxella catarrhalis* – диплококки) и *Acinetobacter spp.* (кокки), *Pseudomonas aeruginosa* (палочковидные бактерии)) – 17,5 %, удельный вес дрожжеподобных грибов рода *Candida* составил 3,2 %, анаэробные неспорообразующие грамотрицательные палочковидные бактерии (*Bacteroides fragilis*) – 1,4 %. При этом доля *Pseudomonas aeruginosa* составила 9,5 % (рисунок 19).

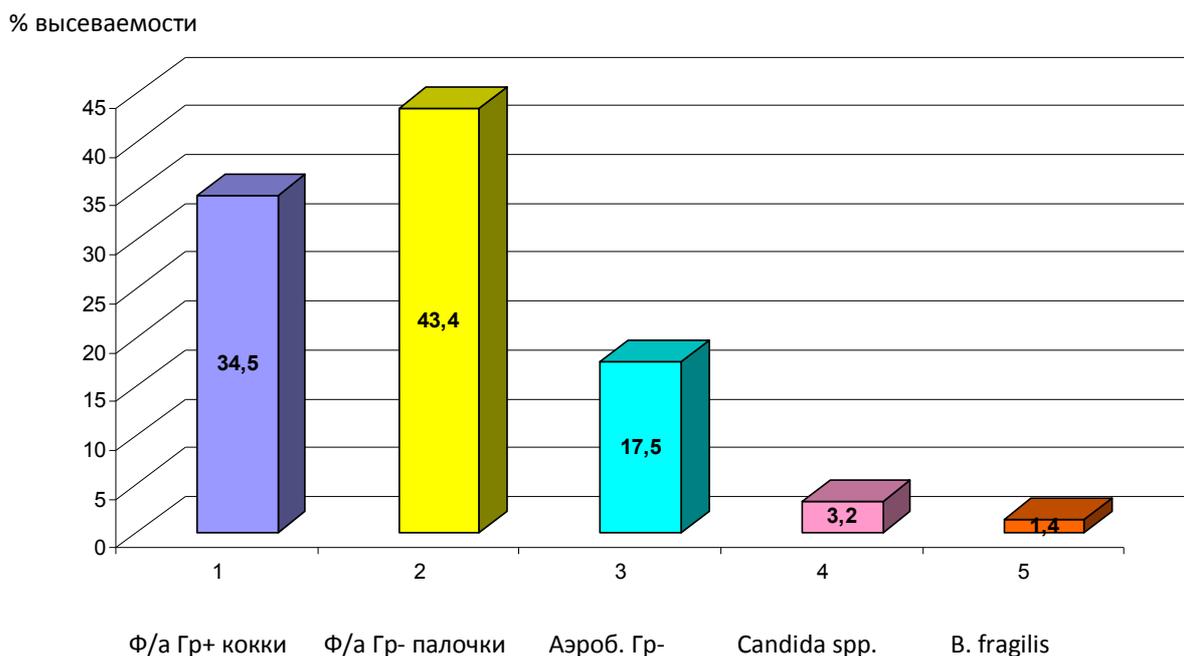


Рисунок 19 – Спектр микроорганизмов, выделенных из желчи, биоптата стенки желчного пузыря и желчных конкрементов у больных калькулёзным холециститом

При ХКХ чаще высевались представители семейства *Enterobacteriaceae* из биоптата стенки желчного пузыря, с поверхности и сколов желчных

конкрементов.

При ОККХ получены представители семейства *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, а также *Staphylococcus spp.* из всех трёх биологических материалов.

При ФКХ были выделены из трёх биологических материалов микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Staphylococcus spp.* и *Pseudomonas aeruginosa*, а также *Streptococcus faecalis* – из биоптата стенки желчного пузыря, с поверхности и сколов желчных конкрементов. *Bacteroides fragilis* выделен у 1 пациента.

При ГКХ были выделены микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida spp.*, *Moraxella spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Acinetobacter calcoaceticus* практически в равных долях из трёх биоматериалов.

Синегнойная палочка чаще всего выделялась при флегмонозном и гангренозном калькулёзном холецистите.

При идентификации микроорганизмов в желчи основную долю составили микроорганизмы в монокультуре – 52,4 %, при исследовании биоптата стенки желчного пузыря, поверхности и сколов желчных конкрементов идентифицированные монокультуры составили 27,4 и 32,5 % соответственно.

При ХКХ и ОККХ выделенные микроорганизмы в монокультуре составили 41,7 %, при ФКХ и ГКХ – 18,4 %.

При идентификации микроорганизмов в желчи доля микробных ассоциаций составила 47,6 %, при исследовании биоптата стенки желчного пузыря, поверхности и сколов желчных конкрементов идентифицированные монокультуры составили 72,6 и 67,5 % соответственно.

При ХКХ и ОККХ выделенные микроорганизмы в монокультуре составили 58,3 %, при деструктивных формах калькулёзного холецистита – 81,6 %.

При этом ассоциации микроорганизмов были представлены *Escherichia coli* + *Enterococcus faecium* + *Klebsiella pneumoniae*; *Enterococcus faecalis* + *Staphylococcus epidermidis* + *Serratia marcescens*; *Escherichia coli* + *Staphylococcus*

saprophyticus + *Streptococcus faecalis*; *Pseudomonas aeruginosa* + *Moraxella spp.* + *Enterococcus faecium*; *Bacteroides fragilis* + *Escherichia coli*; *Candida spp.* + *Staphylococcus saprophyticus* + *Streptococcus faecalis*; *Acinetobacter calcoaceticus* + *Enterococcus faecalis*.

Изучение биологических материалов показало высокую степень общей бактериальной обсеменённости (10^7 – 10^8 КОЕ/г) всех образцов при разных гистологических формах острого катарального и деструктивного калькулёзного холецистита, но чаще при флегмонозном и гангренозном, что свидетельствует об этиологической значимости идентифицированных микроорганизмов в патогенезе воспалительного процесса в желчном пузыре.

На основании полученных результатов может быть сделан вывод о том, что обсеменение желчного пузыря происходит в основном энтерогенным восходящим путём, при этом также не исключаются гематогенный и лимфогенный путь проникновения инфекционного агента. На основании данных литературы, учитывая отрицательные результаты посевов пузырной желчи в норме, полученной при дуоденальном зондировании, может быть сделан вывод о том, что контаминация желчного пузыря происходит при патологии, в частности, при нарушении барьерной функции области большого дуоденального соска, повышении литогенности желчи и формировании желчных конкрементов. Но вопрос о первичности появления микроорганизмов в желчном пузыре или вторичном присоединении инфекции, появлении микролитов, а затем и конкрементов остаётся дискуссионным и требует дальнейшего изучения, особенно учитывая тот факт, что положительные результаты посевов были получены не только с поверхности желчных конкрементов, но и со сколов.

На сегодняшний день остаётся проблемным вопрос об идентификации анаэробных микроорганизмов бактериологическим методом с учётом трудностей выделения этой категории микроорганизмов. При яркой клинической симптоматике острого деструктивного калькулёзного холецистита с перивезикальными осложнениями, с развитием синдрома системной воспалительной реакции, а в ряде случаев с развитием холангита, анаэробные

микроорганизмы не были идентифицированы практически в 100 % случаев при остром калькулёзном холецистите.

3.2 Исследование крови методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии для детектирования микробных маркеров у здоровых лиц

Для исследования крови методом газожидкостной хроматографии масс-спектрометрии для детектирования микробных маркеров в качестве группы контроля включены 30 здоровых лиц, сопоставимых по полу, возрасту и характеру сопутствующей патологии с основными группами. Из них 21 (70 %) женщин и 9 (30 %) мужчин. Все люди группы контроля были обследованы лабораторно (выполнены клинический анализ крови и мочи, биохимический анализ крови) и инструментально (ультрасонография брюшной полости, фиброэзофагогастродуоденоскопия). Патологии выявлено не было.

Кроме того, условно здоровые лица, составившие 1-ю группу сравнения, были обследованы на дисбиоз.

Несмотря на то, что лица группы контроля по результатам клинико-лабораторного и инструментальных методов обследования были признаны условно здоровыми и не имели в анамнезе жалоб, характерных для патологии пищеварительного тракта, у 25 (83,3 %) был выявлен дисбиоз (таблица 9). У 5 (16,7 %) человек группы контроля дисбиоза выявлено не было.

Таблица 9 – Количественный и качественный состав микрофлоры кишечника людей группы сравнения

Наименование микроорганизма	Среднее значение КОЕ / 1 г испражнений			
	Норма		Полученные результаты	
	до 60 лет	старше 60 лет	до 60 лет	старше 60 лет
<i>Bifidobacterium spp.</i>	10^9-10^{10}	10^8-10^9	$3,0 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$	$4,2 \times 10^6 \pm 0,6 \times 10^6$
<i>Lactobacterium spp.</i>	10^7-10^8	10^6-10^7	$3,7 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$	$3,4 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^5$

Продолжение таблицы 9

Наименование микроорганизма	Среднее значение КОЕ / 1 г испражнений			
	Норма		Полученные результаты	
	до 60 лет	старше 60 лет	до 60 лет	старше 60 лет
<i>E. coli</i> типичные	10^7-10^8	10^7-10^8	$1,8 \times 10^7 \pm 0,4 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7 \pm 0,2 \times 10^7$
<i>E. coli</i> гемолитические	0	0	$6,0 \times 10^7 \pm 0,8 \times 10^7$	$4,4 \times 10^5 \pm 0,6 \times 10^5$

Таким образом, всего из 25 обследуемых у 3 установлена вторая степень дисбиоза кишечника (12 %), у 22 (88 %) – первая степень.

На основании вышеизложенного может быть сделан вывод о том, что при анализе результатов газожидкостной хромато-масс-спектрометрии количество экв. клеток в крови необходимо сравнивать с нормой крови с учётом результатов исследования испражнений на дисбиоз, поскольку эквивалентное количество метаболитов микробных тел, обнаруживаемое в крови, в первую очередь является отражением микробного фона кишечника.

Исходя из этого, необходимым является исследование испражнений методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии для верификации результатов идентификации микроорганизмов и их количества.

Результаты обнаружения в крови жирных кислот, альдегидов и стероидов и эквивалентного количества микроорганизмов представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты газожидкостной хромато-масс-спектрометрии крови и испражнений у здоровых лиц

Название микроорганизма	Кровь		Испражнения	
	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток /	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$
<i>Streptococcus spp.</i>	478	756	2 332	4 185
<i>Lactobacillus spp.</i>	6 613	7 022	30 510	39 075
<i>Staphylococcus spp.</i>	120	251	121	566

Продолжение таблицы 10

Название микроорганизма	Кровь		Испражнения	
	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток /	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$
<i>Enterococcus spp.</i>	290	234	5 318	7 965
<i>Rhodococcus spp.</i>	423	385	127	113
<i>Propionibacterium spp.</i>	4 480	285	4 734	2 707
<i>Bacillus spp.</i>	23	1 032	284	1 968
<i>Actinomyces spp.</i>	1 576	299	92	278
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	74	42	118
<i>Campylobacter spp.</i>	99	64	18	49
<i>Enterobacteriaceae</i>	71	193	182	1 924
<i>Helicobacter pylori</i>	14	32	2 134	2 038
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	0	1 698	37	186
<i>Bifidobacterium spp.</i>	5 067	41	10 723	1 109
<i>Clostridium spp.</i>	2 780	7 089	59 712	86 890
<i>Ruminococcus spp.</i>	640	896	30	570
<i>Eubacterium spp.</i>	7 039	9 126	120 477	142 124
<i>Porphyromonas spp.</i>	0	1 427	39	176
<i>Prevotella spp.</i>	38	39	7 557	10 986
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	1 557	4 109	9 345
<i>Candida spp.</i>	549	799	3 257	3 930
Итого	30 300	33 299	251 835	316 302
* Клинически значимое количество экв. клеток в крови по сравнению с нормой (превышение нормальных показателей в 2 и более раза).				
** Клинически значимое количество экв. клеток в желчном конкременте по сравнению с показателями крови (превышение показателей в 2 и более раза).				

По результатам газожидкостной хромато-масс-спектрометрии крови и испражнений был установлен коэффициент, позволяющий верифицировать источник метаболитов микрофлоры, которые появляются в крови – кишечник или другой очаг инфекции, например, желчный пузырь.

Коэффициент был получен посредством вычисления отношения нормального количества экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$ в крови к нормальному количеству

экв. клеток / г $\times 10^5$ в испражнениях = 0,12. Показатели менее 0,12 должны расцениваться таким образом, что в качестве источника метаболитов микрофлоры является кишечник, что, в свою очередь, расценивается как дисбиоз. Показатели соотношения, превышающие 0,12, должны расцениваться таким образом, что в качестве источника метаболитов микрофлоры является другой патологической очаг инфекционно-воспалительного характера, например, желчный пузырь.

В 1-й группе среди здоровых лиц общее количество экв. клеток в крови составило 33 299/г $\times 10^5$, а общее количество экв. клеток в испражнениях 316 302/г $\times 10^5$. Таким образом, при соотношении числа экв. клеток / г $\times 10^5$ в крови к числу экв. клеток / г $\times 10^5$ в испражнениях составило 0,1. Из чего может быть сделан вывод о том, что источником жирных кислот, альдегидов и стероидов в крови является кишечник, что расценено как проявление дисбиоза.

3.3 Исследование микрофлоры желчного пузыря методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии у больных калькулёзным холециститом

Методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии были изучены кровь, пузырная желчь, биоптат стенки желчного пузыря и желчные конкременты у пациентов с желчнокаменной болезнью, хроническим калькулёзным холециститом, острым катаральным калькулёзным холециститом, острым флегмонозным калькулёзным холециститом и острым гангренозным калькулёзным холециститом.

По результатам исследования были идентифицированы представители грамположительных аэробных и факультативно анаэробных неспорообразующих микроорганизмов (*Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*); грамположительных аэробных и факультативно анаэробных спорообразующих микроорганизмов (*Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*); грамотрицательных аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных неспорообразующих микроорганизмов

(*Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.*, *Campylobacter spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*); грамположительных анаэробных неспорообразующих микроорганизмов (*Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*); грамположительных анаэробных спорообразующих микроорганизмов (*Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*); грамотрицательных анаэробных неспорообразующих микроорганизмов (*Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides fragilis*); а также грибов *Candida spp.*

Полученные результаты по спектру микроорганизмов при разных формах калькулёзного холецистита представлены в таблицах 11, 12, 13 и 14.

Таблица 11 – Результаты газожидкостной хромато-масс-спектрометрии у пациентов с хроническим калькулёзным холециститом

Название микроорганизма	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$
	Кровь		Пузырная желчь		Биоптат стенки желчного пузыря		Желчный конкремент	
<i>Streptococcus spp.</i>	478	1 766*	0	1 766	0	1 766	0	5 533**
<i>Lactobacillus spp.</i>	6 613	8 998	0	8 998	0	8 998	0	11 985
<i>Staphylococcus spp.</i>	120	300*	0	300	0	300	0	193
<i>Enterococcus spp.</i>	290	41	0	41	0	41	0	0
<i>Rhodococcus spp.</i>	423	367	0	367	0	367	0	233
<i>Propionibacterium spp.</i>	4 480	2 800	0	2 800	0	2 800	0	311
<i>Bacillus spp.</i>	23	23	0	23	0	23	0	1
<i>Actinomyces spp.</i>	1 576	1 631	0	1 632	0	1 632	0	1 340
<i>Moraxella spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Flavobacterium spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Campylobacter spp.</i>	99	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	71	172*	0	389**	0	421**	0	551**
<i>Helicobacter pylori</i>	14	29*	0	29	0	29	0	20
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	0	102*	0	102	0	0	0	0

Продолжение таблицы 11

Название микроорганизма	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$
	Кровь		Пузырная желчь		Биоптат стенки желчного пузыря		Желчный конкремент	
<i>Bifidobacterium spp.</i>	5 067	3 967	0	3 967	0	3 967	0	460
<i>Clostridium spp.</i>	2 780	7 130*	0	7 130	0	7 130	0	6 280
<i>Ruminococcus spp.</i>	640	1 101	0	1 101	0	1 101	0	2 735**
<i>Eubacterium spp.</i>	7 039	15 524*	0	15 524	0	15 524	0	774
<i>Porphyromonas spp.</i>	0	59*	0	59	0	0	0	0
<i>Prevotella spp.</i>	38	19	0	19	0	19	0	11
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida spp.</i>	549	1 086*	0	1 086	0	1 086	0	958
Итого	30 300	45 115	0	45 333	0	45 204	0	31 385
<p>* Клинически значимое количество экв. клеток в крови по сравнению с нормой (превышение нормальных показателей в 2 и более раза).</p> <p>** Клинически значимое количество экв. клеток в желчном конкременте по сравнению с показателями крови (превышение показателей в 2 и более раза).</p>								

Таблица 12 – Результаты газожидкостной хромато-масс-спектрометрии у пациентов с острым катаральным калькулёзным холециститом

Название микроорганизма	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$
	Кровь		Пузырная желчь		Биоптат стенки желчного пузыря		Желчный конкремент	
<i>Streptococcus spp.</i>	478	1 593*	0	1 457	0	15 806***	0	4 612****
<i>Lactobacillus spp.</i>	6 613	9 891	0	67 792**	0	79 678***	0	10 966
<i>Staphylococcus spp.</i>	120	311*	0	255	0	6 140***	0	108
<i>Enterococcus spp.</i>	290	0	0	5**	0	4***	0	0
<i>Rhodococcus spp.</i>	423	359	0	581	0	1 236***	0	286
<i>Propionibacterium spp.</i>	4 480	2 233	0	458	0	22 572***	0	55
<i>Bacillus spp.</i>	23	0	0	0	0	11***	0	8****
<i>Actinomyces spp.</i>	1 576	1 605	0	1 795	0	43 656***	0	684
<i>Moraxella spp.</i>	0	27*	0	18	0	55***	0	24
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	16*	0	20	0	34***	0	15
<i>Flavobacterium spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Campylobacter spp.</i>	99	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	71	522*	0	1 218**	0	1 237***	0	1 724****
<i>Helicobacter pylori</i>	14	21	0	9	0	71***	0	7
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	0	5*	0	10**	0	12***	0	10****

Продолжение таблицы 12

Название микроорганизма	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. леток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$
	Кровь		Пузырная желчь		Биоптат стенки желчного пузыря		Желчный конкремент	
<i>Bifidobacterium spp.</i>	5 067	2 455	0	450	0	4 234	0	288
<i>Clostridium spp.</i>	2 780	4 647	0	16 942**	0	100 432***	0	4791
<i>Ruminococcus spp.</i>	640	845	0	12 066**	0	16 200***	0	2 511****
<i>Eubacterium spp.</i>	7 039	11 744	0	573	0	96 179***	0	280
<i>Porphyromonas spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prevotella spp.</i>	38	11	0	22**	0	43***	0	15
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida spp.</i>	549	984	0	3 249**	0	23 678***	0	618
Итого	30 300	37 269	0	106 920**	0	411 278***	0	27 002

* Клинически значимое количество экв. клеток в крови по сравнению с нормой (превышение нормальных показателей в 2 и более раза).

** Клинически значимое количество экв. клеток в пузырной желчи по сравнению с показателями крови (превышение показателей в 2 и более раза).

*** Клинически значимое количество экв. клеток в биоптате стенки желчного пузыря по сравнению с показателями крови (превышение показателей в 2 и более раза).

**** Клинически значимое количество экв. клеток в желчном конкременте по сравнению с показателями крови (превышение показателей в 2 и более раза).

Таблица 13 – Результаты газожидкостной хромато-масс-спектрометрии у пациентов с острым флегмонозным калькулёзным холециститом

Название микроорганизма	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$
	Кровь		Пузырная желчь		Биоптат стенки желчного пузыря		Желчный конкремент	
<i>Streptococcus spp.</i>	478	1 560*	0	1 546	0	26 553***	0	4 324*****
<i>Lactobacillus spp.</i>	6 613	9 242	0	65 897**	0	78 251***	0	8 996
<i>Staphylococcus spp.</i>	120	236*	0	337	0	9 343***	0	112
<i>Enterococcus spp.</i>	290	745*	0	895	0	1 201	0	1 502*****
<i>Rhodococcus spp.</i>	423	338	0	881**	0	1 038***	0	178
<i>Propionibacterium spp.</i>	4 480	2 160	0	448	0	21 339***	0	45
<i>Bacillus spp.</i>	23	27	0	1	0	9 334***	0	1
<i>Actinomyces spp.</i>	1 576	1 607	0	1 653	0	125 162***	0	3 778*****
<i>Moraxella spp.</i>	0	47*	0	109**	0	108***	0	97*****
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	1 274*	0	2 656**	0	2 679***	0	3 832*****
<i>Flavobacterium spp.</i>	0	108*	0	224**	0	305***	0	58
<i>Campylobacter spp.</i>	99	225*	0	0	0	251 761***	0	386
<i>Enterobacteriaceae</i>	71	211*	0	1 387**	0	536***	0	437*****
<i>Helicobacter pylori</i>	14	34*	0	24	0	117***	0	85*****
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	0	780*	0	642	0	2 023***	0	532

Продолжение таблицы 13

Название микроорганизма	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$
	Кровь		Пузырная желчь		Биоптат стенки желчного пузыря		Желчный конкремент	
<i>Bifidobacterium spp.</i>	5 067	2 776	0	583	0	7 297***	0	248
<i>Clostridium spp.</i>	2 780	6 325*	0	78 330**	0	192 055***	0	3 869
<i>Ruminococcus spp.</i>	640	919	0	10 793**	0	2 851***	0	2 452****
<i>Eubacterium spp.</i>	7 039	14 788*	0	457	0	99 314***	0	243
<i>Porphyromonas spp.</i>	0	29*	0	0	0	67***	0	0
<i>Prevotella spp.</i>	38	24	0	79**	0	28	0	13
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	85*	0	709**	0	556***	0	77
<i>Candida spp.</i>	549	1 133*	0	5 208**	0	38 703***	0	709
Итого	30 300	44 673	0	172 859**	0	870 621***	0	31 974

* Клинически значимое количество экв. клеток в крови по сравнению с нормой (превышение нормальных показателей в 2 и более раза).

** Клинически значимое количество экв. клеток в пузырной желчи по сравнению с показателями крови (превышение показателей в 2 и более раза).

*** Клинически значимое количество экв. клеток в биоптате стенки желчного пузыря по сравнению с показателями крови (превышение показателей в 2 и более раза).

**** Клинически значимое количество экв. клеток в желчном конкременте по сравнению с показателями крови (превышение показателей в 2 и более раза).

Таблица 14 – Результаты газожидкостной хромато-масс-спектрометрии у пациентов с острым гангренозным калькулёзным холециститом

Название микроорганизма	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$
	Кровь		Пузырная желчь		Биоптат стенки желчного пузыря		Желчный конкремент	
<i>Streptococcus spp.</i>	478	1 206*	0	17 769**	0	13 702***	0	5 033****
<i>Lactobacillus spp.</i>	6 613	10 814	0	40 751**	0	70 027***	0	41 319****
<i>Staphylococcus spp.</i>	120	259*	0	860**	0	3 826***	0	717****
<i>Enterococcus spp.</i>	290	25	0	8	0	1 102***	0	456****
<i>Rhodococcus spp.</i>	423	364	0	743**	0	1 072***	0	446
<i>Propionibacterium spp.</i>	4 480	1 827	0	728	0	21 262***	0	597
<i>Bacillus spp.</i>	23	2	0	4**	0	8***	0	0
<i>Actinomyces spp.</i>	1 576	1 439	0	4 409**	0	38 385***	0	18 680****
<i>Moraxella spp.</i>	0	175*	0	365**	0	435***	0	126
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	423*	0	892**	0	2 690***	0	177
<i>Flavobacterium spp.</i>	0	75*	0	42	0	162***	0	23
<i>Campylobacter spp.</i>	99	0	0	0	0	189***	0	121****
<i>Enterobacteriaceae</i>	71	311*	0	721**	0	842***	0	1 318****
<i>Helicobacter pylori</i>	14	10	0	138**	0	98***	0	110****
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	0	2*	0	42**	0	24***	0	20****

Продолжение таблицы 14

Название микроорганизма	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Норма экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$	Среднее количество экв. клеток / $\Gamma \times 10^5$
	Кровь		Пузырная желчь		Биоптат стенки желчного пузыря		Желчный конкремент	
<i>Bifidobacterium spp.</i>	5 067	2 126	0	624	0	3 052	0	4 130
<i>Clostridium spp.</i>	2 780	5 028	0	13 391**	0	71 384***	0	9 866
<i>Ruminococcus spp.</i>	640	740	0	2 797**	0	7 363***	0	610
<i>Eubacterium spp.</i>	7 039	14 568*	0	7 383	0	73 663***	0	7 951
<i>Porphyromonas spp.</i>	0	0	0	0	0	28***	0	21****
<i>Prevotella spp.</i>	38	9	0	93**	0	36***	0	11
<i>Bacteroides fragilis</i>	0	129*	0	258**	0	275***	0	274****
<i>Candida spp.</i>	549	850	0	1 706**	0	13 867***	0	1 648
Итого	30 300	40 382	0	93 724**	0	323 492***	0	93 654****

* Клинически значимое количество экв. клеток в крови по сравнению с нормой (превышение нормальных показателей в 2 и более раза). ** Клинически значимое количество экв. клеток в пузырной желчи по сравнению с показателями крови (превышение показателей в 2 и более раза). *** Клинически значимое количество экв. клеток в биоптате стенки желчного пузыря по сравнению с показателями крови (превышение показателей в 2 и более раза). **** Клинически значимое количество экв. клеток в желчном конкременте по сравнению с показателями крови (превышение показателей в 2 и более раза).

Необходимо отметить высокую эквивалентную степень общей бактериальной обсеменённости исследуемых биологических материалов по результатам детектирования жирных кислот, альдегидов и стеринов.

При исследовании крови методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии при всех формах калькулёзного холецистита (хроническом, остром катаральном и деструктивных формах) клинически значимых различий по среднему количеству экв. клеток/г $\times 10^5$ выявлено не было. Но при анализе полученных результатов, конкретно по группам микроорганизмов, получены клинически значимые различия по представителям *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Candida spp.* при хроническом калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Peptostreptococcus spp.* при остром катаральном калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.*, *Campylobacter spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Candida spp.* при остром флегмонозном калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Peptostreptococcus spp.*, *Eubacterium spp.*, *Bacteroides fragilis* при остром гангренозном калькулёзном холецистите.

При исследовании пузырной желчи методом газожидкостной хроматографии при хроническом калькулёзном холецистите клинически значимых различий по среднему количеству экв. клеток / г $\times 10^5$ выявлено не было, а при остром катаральном, флегмонозном и гангренозном холецистите получены клинически значимые различия. При исследовании пузырной желчи по группам микроорганизмов клинически значимые различия получены по представителям семейства *Enterobacteriaceae* при хроническом калькулёзном холецистите; по представителям *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*,

Enterobacteriaceae, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*, *Prevotella spp.*, *Candida spp.* при остром катаральном калькулёзном холецистите; по представителям *Lactobacillus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Candida spp.* при остром флегмонозном калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Candida spp.* при остром гангренозном калькулёзном холецистите.

При исследовании биоптата стенки желчного пузыря при хроническом калькулёзном холецистите клинически значимых различий по среднему количеству экв. клеток / г $\times 10^5$ выявлено не было, а при остром катаральном, флегмонозном и гангренозном холецистите получены клинически значимые различия. При исследовании биоптата стенки желчного пузыря по группам микроорганизмов клинически значимые различия получены по представителям семейства *Enterobacteriaceae* при хроническом калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*, *Eubacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Candida spp.* при остром катаральном калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.*, *Campylobacter spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Candida spp.* при остром флегмонозном калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus*

spp., *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.*, *Campylobacter spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Candida spp.* при остром гангренозном калькулёзном холецистите.

При исследовании желчных конкрементов при хроническом, остром катаральном и флегмонозном калькулёзном холецистите клинически значимых различий по среднему количеству экв. клеток / г $\times 10^5$ выявлено не было, а при остром гангренозном холецистите получены клинически значимые различия. При исследовании желчных конкрементов по группам микроорганизмов клинически значимые различия получены по представителям *Streptococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Ruminicoccus spp.* при хроническом калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Peptostreptococcus spp.*, *Ruminicoccus spp.* при остром катаральном калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Ruminicoccus spp.* при остром флегмонозном калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Campylobacter spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Bacteroides fragilis* при остром гангренозном калькулёзном холецистите.

При исследовании крови, пузырной желчи, биоптата стенки желчного пузыря и желчных конкрементов при хроническим калькулёзном холецистите среднее количество экв. клеток / г $\times 10^5$ микроорганизмов *Streptococcus spp.* и *Ruminicoccus spp.* детектировано на одном и том же клинически значимом уровне (превышение показателей в 2 и более раза) в крови, пузырной желчи и биоптате стенки желчного пузыря, при этом максимальное количество экв. клеток зарегистрировано в желчном конкременте 5 533 и 2 735 / г $\times 10^5$ соответственно.

Среднее количество экв. клеток / г $\times 10^5$ микроорганизмов *Propionibacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Eubacterium spp.* детектировано на одном и том же клинически значимом уровне (превышение показателей в 2 и более раза) в крови, пузырной желчи и биоптате стенки желчного пузыря, но при этом минимальное количество экв. клеток зарегистрировано в желчном конкременте. Представители *Peptostreptococcus spp.* ($102/\text{г} \times 10^5$) и *Porphyromonas spp.* ($59/\text{г} \times 10^5$) зарегистрированы на одном и том же клинически значимом уровне (превышение показателей в 2 и более раза) в крови, пузырной желчи, но при этом не выявлены в биоптате и желчном конкременте. Среднее количество экв. клеток / г $\times 10^5$ микроорганизмов *Enterococcus spp.* ($41/\text{г} \times 10^5$) детектировано на одном и том же клинически значимом уровне (превышение показателей в 2 и более раза) в крови, пузырной желчи и биоптате стенки желчного пузыря, но при этом не выявлены в желчном конкременте. Представители семейства *Enterobacteriaceae* детектированы во всех четырёх биологических материалах с клинически значимым (превышение показателей в 2 и более раза) стабильным повышением в направлении от крови к желчному конкременту ($172/\text{г} \times 10^5$, $389/\text{г} \times 10^5$, $421/\text{г} \times 10^5$, $551/\text{г} \times 10^5$).

Учитывая тот факт, что в норме биотоп желчный пузырь является стерильным, выявляемые в крови эквивалентные микроорганизмам жирные кислоты, альдегиды и стерины отражают не только микрофлору желчного пузыря, но и микрофлору кишечника. Поэтому последующие результаты по изучению пузырной желчи, биоптата стенки желчного пузыря и желчных конкрементов должны быть сравниваемы с показателями крови, отражающей, в том числе, флору кишечника.

При патологии – развитии холецистолитиаза в желчном пузыре (в пузырной желчи, биоптате стенки, желчном конкременте) – выявляются аэробные и анаэробные микроорганизмы.

При хроническом калькулёзном холецистите большее количество бактерий выявляются в крови ($45\ 115/\text{г} \times 10^5$), пузырной желчи ($45\ 333/\text{г} \times 10^5$) и биоптате стенки желчного пузыря ($45\ 204/\text{г} \times 10^5$), в несколько меньшем количестве – в

желчных конкрементах ($31\ 385/\text{г} \times 10^5$). При этом значимых различий в показателях не выявляется. В этом случае показатели крови объясняются флорой кишечника, а также продуктами жизнедеятельности микроорганизмов желчного пузыря. Примерно на таком же уровне детектируется микрофлора пузырной желчи и биоптата стенки желчного пузыря, что также объясняется персистенцией микроорганизмов в желчи, обусловленной хорошими нутритивными свойствами этой среды, и высокой адгезивной способностью микрофлоры к слизистой оболочке и в меньшей степени к желчному конкременту с использованием своеобразных факторов защиты от механического тока желчи и антибактериальных препаратов. С этим связан также тот факт, что на конкрементах бактерии в основной массе пребывают в виде биоплёнок, которые метаболически мало или не активны и в меньшей степени вырабатывают жирные кислоты, альдегиды и стерины. Кроме того, микроорганизмы проникают в желчный пузырь преимущественно энтерогенным путём. Факт незначительного различия общего количества экв. клеток в трёх биологических материалах по сравнению с кровью, но при этом достоверного выявления микрофлоры именно в желчном пузыре, а не в качестве фона из кишечника, подтверждается детектированием продуктов метаболизма микрофлоры как минимум в двух изучаемых средах.

При исследовании пузырной желчи, биоптата стенки желчного пузыря и желчных конкрементов при остром катаральном калькулёзном холецистите среднее количество экв. клеток / $\text{г} \times 10^5$ микроорганизмов *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Prevotella spp.*, *Candida spp.* детектировано с тенденцией к увеличению при клинически значимом уровне (превышение показателей в 2 и более раза) в пузырной желчи и биоптате стенки желчного пузыря, при этом количество экв. клеток в желчном конкременте ориентировочно соответствует уровню экв. клеток в крови.

Среднее количество экв. клеток / $\text{г} \times 10^5$ микроорганизмов *Propionibacterium spp.*, *Helicobacter pylori*, *Bifidobacterium spp.*, *Eubacterium spp.* детектировано на минимальном уровне в пузырной желчи и конкременте, с клинически значимым

увеличением (превышение показателей в 2 и более раза) в биоптате стенки желчного пузыря.

Представители семейства *Enterobacteriaceae* ($1\,218/\text{г} \times 10^5$, $1\,237/\text{г} \times 10^5$, $1\,724/\text{г} \times 10^5$), *Peptostreptococcus spp.* ($10/\text{г} \times 10^5$, $12/\text{г} \times 10^5$, $10/\text{г} \times 10^5$), *Ruminococcus spp.* ($12\,066/\text{г} \times 10^5$, $16\,200/\text{г} \times 10^5$, $2\,511/\text{г} \times 10^5$) зарегистрированы с повышением количества в пузырной желчи, биоптате и желчном конкременте.

Среднее количество экв. клеток / $\text{г} \times 10^5$ *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.* детектировано в примерно равном количестве в крови и пузырной желчи, с клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в биоптате стенки желчного пузыря и желчном конкременте.

Микроорганизмы *Rhodococcus spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* обнаружены на примерно равном уровне с кровью в пузырной желчи в конкременте с клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в биоптате стенки желчного пузыря.

Микроорганизмы *Staphylococcus spp.* ($311/\text{г} \times 10^5$, $255/\text{г} \times 10^5$), *Actinomyces spp.* ($1\,605/\text{г} \times 10^5$, $1\,795/\text{г} \times 10^5$) выявлены на примерно равном уровне в крови и пузырной желчи с клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в биоптате стенки желчного пузыря и уменьшением количества в конкременте.

При остром катаральном калькулёзном холецистите большее количество бактерий выявляются в пузырной желчи ($106\,920/\text{г} \times 10^5$) и биоптате стенки желчного пузыря ($411\,278/\text{г} \times 10^5$). При этом стоит отметить значительно большее количество микроорганизмов в биоптате. Количество выявляемых микроорганизмов в желчном конкременте приближается к показателям крови. При этом выявлены статистически значимые различия в показателях пузырной желчи и биоптата по сравнению с кровью. Это, вероятно, объясняется острым катаральным воспалением с относительно небольшой давностью начала заболевания, проявляющимся переходом биоплёнок в активные вегетирующие планктонные формы.

При исследовании пузырной желчи, биоптата стенки желчного пузыря и

желчных конкрементов при остром флегмонозном калькулёзном холецистите среднее количество экв. клеток / г $\times 10^5$ микроорганизмов *Propionibacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.* детектировано с тенденцией к снижению в пузырной желчи, клинически значимому повышению (превышение показателей в 2 и более раза) в биоптате стенки желчного пузыря, при этом минимальное количество экв. клеток зарегистрировано в желчном конкременте.

Среднее количество экв. клеток / г $\times 10^5$ микроорганизмов *Lactobacillus spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Candida spp.* детектировано с клинически значимым увеличением (превышение показателей в 2 и более раза) в пузырной желчи и биоптате стенки желчного пузыря и с относительно равными показателями по желчному конкременту и крови.

Представители *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Ruminococcus spp.* зарегистрированы с клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в пузырной желчи, биоптате стенки желчного пузыря и желчном конкременте.

Среднее количество экв. клеток / г $\times 10^5$ микроорганизмов *Enterococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Helicobacter pylori* детектировано на относительно равном уровне в крови и пузырной желчи, с клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в биоптате стенки желчного пузыря и желчном конкременте.

Микроорганизмы *Rhodococcus spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Clostridium spp.* определялись с клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в пузырной желчи и биоптате стенки желчного пузыря и со снижением уровня в желчном конкременте.

Микроорганизмы *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.* определялись на относительно равном уровне в крови и пузырной желчи, с клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в биоптате стенки желчного пузыря и со снижением уровня в желчном конкременте.

Микроорганизмы *Campylobacter spp.* определялись со снижением уровня в

пузырной желчи с клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в биоптате стенки желчного пузыря ($251\,761/\text{г} \times 10^5$) и с относительно равными показателями по желчному конкременту ($386/\text{г} \times 10^5$) и крови ($225/\text{г} \times 10^5$).

Микроорганизмы *Peptostreptococcus spp.* определялись на относительно равном уровне в крови ($780/\text{г} \times 10^5$), пузырной желчи ($642/\text{г} \times 10^5$) и желчном конкременте ($532/\text{г} \times 10^5$) с клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в биоптате стенки желчного пузыря ($2\,023/\text{г} \times 10^5$).

Микроорганизмы *Prevotella spp.* определялись на относительно равном уровне в крови ($24/\text{г} \times 10^5$) и биоптате стенки желчного пузыря ($28/\text{г} \times 10^5$) с клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в пузырной желчи ($79/\text{г} \times 10^5$) и понижением количества в желчном конкременте ($13/\text{г} \times 10^5$).

При остром флегмонозном калькулёзном холецистите большее количество бактерий выявляются в пузырной желчи ($172\,859/\text{г} \times 10^5$) и биоптате стенки желчного пузыря ($870\,621/\text{г} \times 10^5$). При этом стоит отметить значительно большее количество микроорганизмов в биоптате. Количество выявляемых микроорганизмов в желчном конкременте ($31\,974/\text{г} \times 10^5$) приближается к показателям крови ($44\,673/\text{г} \times 10^5$). При этом выявлены значимые различия в показателях пузырной желчи и биоптата по сравнению с кровью. Это, вероятно, также объясняется развитием острого гнойного воспаления уже с большей давностью начала заболевания, по сравнению с острым катаральным холециститом, проявляющимся переходом биоплёнок в активные вегетирующие планктонные формы и с увеличением общего количества экв. клеток в пузырной желчи и биоптате при сравнении флегмонозной и катаральной форм холецистита. Отчётливо прослеживается повышение количества микроорганизмов в биоптате, по-видимому, связанное с вовлечением в гнойный воспалительный процесс всей толщи стенки желчного пузыря. Желчный конкремент является резервуаром микроорганизмов, персистирующих в нём в

виде биоплёнок, что подтверждается относительно стабильными показателями обсеменённости при сравнении флегмонозной и катаральной форм острого холецистита.

При исследовании пузырной желчи, биоптата стенки желчного пузыря и желчных конкрементов при остром гангренозном калькулёзном холецистите среднее количество экв. клеток / г $\times 10^5$ микроорганизмов *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Candida spp.* детектировано клинически значимое повышение (превышение показателей в 2 и более раза) в пузырной желчи, биоптате стенки желчного пузыря и желчном конкременте.

Среднее количество экв. клеток / г $\times 10^5$ микроорганизмов *Rhodococcus spp.*, *Moraxella spp.*, *Ruminicoccus spp.*, *Prevotella spp.* детектировано с клинически значимым увеличением (превышение показателей в 2 и более раза) в пузырной желчи и биоптате стенки желчного пузыря и с относительно равными показателями по желчному конкременту и крови.

Представители *Propionibacterium spp.*, *Flavobacterium spp.* зарегистрированы с понижением в пузырной желчи, клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в биоптате стенки желчного пузыря и уменьшением количества в желчном конкременте.

Среднее количество экв. клеток / г $\times 10^5$ микроорганизмов *Bacillus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* детектировано с клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в пузырной желчи и биоптате стенки желчного пузыря, снижением количества в желчном конкременте.

Микроорганизмы *Campylobacter spp.*, *Porphyromonas spp.* определялись на относительно стабильном уровне в пузырной желчи по сравнению с показателями крови и с клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в биоптате стенки желчного пузыря и желчном конкременте.

Микроорганизмы *Enterococcus spp.* определялись со снижением уровня в

пузырной желчи ($8/\text{г} \times 10^5$) и с клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в биоптате стенки желчного пузыря ($1\ 102/\text{г} \times 10^5$) и желчном конкременте ($456/\text{г} \times 10^5$).

Микроорганизмы *Bifidobacterium spp.* определялись со снижением уровня в пузырной желчи ($624/\text{г} \times 10^5$), стабильными показателями в биоптате ($3\ 052/\text{г} \times 10^5$) по сравнению с кровью ($2\ 126/\text{г} \times 10^5$) и с клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в желчном конкременте ($4\ 130/\text{г} \times 10^5$).

Микроорганизмы *Eubacterium spp.* определялись со снижением уровня в пузырной желчи ($7\ 383/\text{г} \times 10^5$) с клинически значимым повышением уровня (превышение показателей в 2 и более раза) в биоптате ($73\ 663/\text{г} \times 10^5$) и с относительно равными показателями в желчном конкременте ($7\ 951/\text{г} \times 10^5$) по сравнению с кровью ($14\ 568/\text{г} \times 10^5$).

При остром гангренозном калькулёзном холецистите большее количество бактерий выявляются в биоптате стенки желчного пузыря ($323\ 492/\text{г} \times 10^5$). При этом стоит отметить относительно равное количество микроорганизмов в пузырной желчи и желчном конкременте ($93\ 724/\text{г} \times 10^5$, $93\ 654/\text{г} \times 10^5$ соответственно), что более чем в два раза превышает показатели крови ($40\ 382/\text{г} \times 10^5$) и более чем в три раза превышает показатели нормы крови ($30\ 300/\text{г} \times 10^5$). На основании этого может быть сделан вывод о топичности инфекционно-воспалительного процесса именно в желчном пузыре и отсутствии фоновых помех из кишечника. По сравнению с флегмонозным воспалением при гангренозном холецистите уровень микробных тел в биоптате и в пузырной желчи снизился практически в два и три раза соответственно и в три раза увеличился в конкременте, что объясняется некрозом стенки желчного пузыря и транслокацией микрофлоры из стенки желчного пузыря посредством желчи в конкремент. Особое значение имеет тот факт, что при этой форме воспаления в биоптате преимущественно определяются анаэробные микроорганизмы.

При сопоставлении полученных результатов газожидкостной хромато-масс-спектрометрии с результатами исследования микрофлоры желчного пузыря

методом ПЦР, проведенных ранее [97] в соавторстве коллективом кафедры общей хирургии, установлено, что при деструктивных формах острого калькулёзного холецистита в крови, биоптате стенки желчного пузыря и в пузырной желчи в большинстве случаев определяются представители одних и тех же таксонов анаэробных микроорганизмов (обнаруживается ДНК *Bacteroides spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Prevotella spp.*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*).

Таким образом, из таблицы 15 видно, что наибольший процент идентифицированных монокультур анаэробных микроорганизмов получен при исследовании биологических материалов у больных хроническим калькулёзным холециститом (63,6 %). С развитием инфекционно-воспалительного процесса в желчном пузыре от острой катаральной формы (32,4 %), острого флегмонозного калькулёзного холецистита (26,8 %) и к острому гангренозному холециститу (21,4 %) прослеживается явная тенденция к снижению количества идентифицированных монокультур.

Таблица 15 – Идентифицированные монокультуры анаэробных микроорганизмов в различных биологических материалах (анализ по идентифицированным монокультурам у конкретного человека)

Культуры анаэробных микроорганизмов	Исследуемые материалы			
	Кровь	Пузырная желчь	Биоптат стенки желчного пузыря	Желчный конкремент
Хронический калькулёзный холецистит (n = 23 человека)				
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	1 (9,1 %)		0	
<i>Bifidobacterium spp.</i>			1 (9,1 %)	
<i>Clostridium spp.</i>			1 (9,1 %)	
<i>Ruminococcus spp.</i>			1 (9,1 %)	
<i>Eubacterium spp.</i>		1 (9,1 %)		0
<i>Porphyromonas spp.</i>	1 (9,1 %)		0	
<i>Prevotella spp.</i>		1 (9,1 %)		0

Продолжение таблицы 15

Культуры анаэробных микробов	Исследуемые материалы			
	Кровь	Пузырная желчь	Биоптат стенки желчного пузыря	Желчный конкремент
<i>Bacteroides fragilis</i>	0			
Итого	7 (63,6 %)			
Острый катаральный калькулёзный холецистит (n = 44 человека)				
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	1 (2,7 %)			
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2 (5,4 %)			
<i>Clostridium spp.</i>	2 (5,4 %)			0
<i>Ruminococcus spp.</i>	1 (2,7 %)			
<i>Eubacterium spp.</i>	3 (8,1 %)			0
<i>Porphyromonas spp.</i>	0			
<i>Prevotella spp.</i>	3 (8,1 %)			
<i>Bacteroides fragilis</i>	0			
Итого	12 (32,4 %)			
Острый флегмонозный калькулёзный холецистит (n = 46 человека)				
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	1 (2,4 %)			
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2 (4,8 %)			
<i>Clostridium spp.</i>	2 (4,8 %)			0
<i>Ruminococcus spp.</i>	1 (2,4 %)			
<i>Eubacterium spp.</i>	1 (2,4 %)			0
<i>Porphyromonas spp.</i>	1 (2,4 %)	0	1 ¹	0
<i>Prevotella spp.</i>	1 (2,4 %)			
<i>Bacteroides fragilis</i>	2 (4,8 %)			
Итого	11 (26,8 %)			
Острый гангренозный калькулёзный холецистит (n = 32 человека)				
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	1 (3,6 %)			
<i>Bifidobacterium spp.</i>	1 (3,6 %)			
<i>Clostridium spp.</i>	0			
<i>Ruminococcus spp.</i>	1 (3,6 %)			0
<i>Eubacterium spp.</i>	1 (3,6 %)			
<i>Porphyromonas spp.</i>	0		1 (3,6 %)	
<i>Prevotella spp.</i>	1 (3,6 %)			0

Окончание таблицы 15

Культуры анаэробных микроорганизмов	Исследуемые материалы			
	Кровь	Пузырная желчь	Биоптат стенки желчного пузыря	Желчный конкремент
<i>Bacteroides fragilis</i>	0			
Итого	6 (21,4 %)			
Всего (по всем формам КХ)	36 (30,8 %)			
¹ Одна и та же культура <i>Porphyromonas spp.</i> в крови и биоптате стенки желчного пузыря.				

Таблица 16 – Идентифицированные монокультуры анаэробных микроорганизмов в различных биологических материалах (анализ по идентифицированным монокультурам в различных средах)

Культуры анаэробных микроорганизмов	Исследуемые материалы			
	Кровь	Пузырная желчь	Биоптат стенки желчного пузыря	Желчный конкремент
Хронический калькулёзный холецистит (n = 92 образца)				
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	1 (2,3 %)		0	
<i>Bifidobacterium spp.</i>	1 (2,3 %)			
<i>Clostridium spp.</i>	1 (2,3 %)			
<i>Ruminococcus spp.</i>	1 (2,3 %)			
<i>Eubacterium spp.</i>	1 (2,3 %)			0
<i>Porphyromonas spp.</i>	1 (2,3 %)		0	
<i>Prevotella spp.</i>	1 (2,3 %)			0
<i>Bacteroides fragilis</i>	0			
Итого	7 (15,9 %)	7 (15,9 %)	5 (11,4 %)	3 (6,8 %)
Острый катаральный калькулёзный холецистит (n = 176 образцов)				
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	1 (0,7 %)			
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2 (1,4 %)			
<i>Clostridium spp.</i>	2 (1,4 %)			0
<i>Ruminococcus spp.</i>	1 (0,7 %)			
<i>Eubacterium spp.</i>	3 (2 %)			0
<i>Porphyromonas spp.</i>	0			

Продолжение таблицы 16

Культуры анаэробных микроорганизмов	Исследуемые материалы			
	Кровь	Пузырная желчь	Биоптат стенки желчного пузыря	Желчный конкремент
<i>Prevotella spp.</i>	3 (2 %)			
<i>Bacteroides fragilis</i>	0			
Итого	12 (8,1 %)	12 (8,1 %)	12 (8,1 %)	7 (4,7 %)
Острый флегмонозный калькулёзный холецистит (n = 184 образцов)				
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	1 (0,6 %)			
<i>Bifidobacterium spp.</i>	2 (1,2 %)			
<i>Clostridium spp.</i>	2 (1,2 %)			0
<i>Ruminococcus spp.</i>	1 (0,6 %)			
<i>Eubacterium spp.</i>	1 (0,6 %)			0
<i>Porphyromonas spp.</i>	1 (0,6 %)	0	1 ¹	0
<i>Prevotella spp.</i>	1 (0,6 %)			0
<i>Bacteroides fragilis</i>	2 (1,2 %)			
Итого	11 (6,7 %)	10 (6,1 %)	11 (6,7 %)	6 (3,7 %)
Острый гангренозный калькулёзный холецистит (n = 128 образцов)				
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	1 (0,9 %)			
<i>Bifidobacterium spp.</i>	1 (0,9 %)			
<i>Clostridium spp.</i>	0			
<i>Ruminococcus spp.</i>	1 (0,9 %)			0
<i>Eubacterium spp.</i>	1 (0,9 %)			
<i>Porphyromonas spp.</i>	0		1 (0,9 %)	
<i>Prevotella spp.</i>	1 (0,9 %)			0
<i>Bacteroides fragilis</i>	0			
Итого	5 (4,5 %)	5 (4,5 %)	6 (5,4 %)	4 (3,6 %)
Всего (по всем формам КХ)	35 (7,5 %)	34 (7,3 %)	34 (7,3 %)	20 (4,3 %)
	123 (26,3 %)			
¹ Одна и та же культура <i>Porphyromonas spp.</i> в крови и биоптате стенки желчного пузыря.				

В монокультуре анаэробы идентифицированы всего у 36 (30,8 %) пациентов, что соответствует их идентификации в 123 (26,3 %) образцах.

При этом у 28 (19,3 %) пациентов анаэробные микроорганизмы идентифицированы не были. В группе больных хроническим калькулёзным

холециститом в 12 (52,2 %) случаях анаэробные микроорганизмы идентифицированы не были, в группе больных острым катаральным калькулёзным холециститом – у 7 (15,9 %), у пациентов с острым флегмонозным калькулёзным холециститом – в 10,9 % случаев (5 пациентов) и у 4 (12,5 %) больных острым гангренозным калькулёзным холециститом получены отрицательные результаты детекции анаэробов методом ГЖХ.

Микробные ассоциации были представлены в 81 (55,9 %) случае в 4 комбинациях при хроническом калькулёзном холецистите, в 6 комбинациях – при остром катаральном калькулёзном холецистите, в 8 – при остром флегмонозном калькулёзном холецистите и в 6 сочетаниях – при остром гангренозном калькулёзном холецистите (таблица 17).

Таблица 17 – Идентифицированные микробные ассоциации анаэробов в различных биологических материалах при калькулёзном холецистите

Форма КХ	Исследуемые материалы				Количество случаев идентификации
	Кровь	Пузырная желчь	Биоптат стенки желчного пузыря	Желчный конкремент	
Хронический калькулёзный холецистит (n = 23)	<i>Peptostreptococcus spp.</i>				1 (9,1 %)
	<i>Bifidobacterium spp.</i>				
	<i>Porphyromonas spp.</i>				
	<i>Clostridium spp.</i>				1 (9,1 %)
	<i>Peptostreptococcus spp.</i>				
	<i>Bifidobacterium spp.</i>				
	<i>Eubacterium spp.</i>				1 (9,1 %)
	<i>Ruminicoccus spp.</i>				
	<i>Prevotella spp.</i>				
	<i>Clostridium spp.</i>				1 (9,1 %)
<i>Porphyromonas spp.</i>					

Продолжение таблицы 17

Форма КХ	Исследуемые материалы				Количество случаев идентификации
	Кровь	Пузырная желчь	Биоптат стенки желчного пузыря	Желчный конкремент	
Острый катаральный калькулёзный холецистит (n = 44)	<i>Peptostreptococcus spp.</i>				4 (10,8 %)
	<i>Bifidobacterium spp.</i>				
	<i>Clostridium spp.</i>				
	<i>Ruminicoccus spp.</i>				6 (16,2 %)
	<i>Eubacterium spp.</i>				
	<i>Prevotella spp.</i>				
	<i>Bifidobacterium spp.</i>				5 (13,5 %)
	<i>Ruminicoccus spp.</i>				
	<i>Prevotella spp.</i>				
	<i>Clostridium spp.</i>				4 (10,8 %)
	<i>Eubacterium spp.</i>				
	<i>Peptostreptococcus spp.</i>				
	<i>Peptostreptococcus spp.</i>				2 (5,4 %)
	<i>Clostridium spp.</i>				
	<i>Eubacterium spp.</i>				4 (10,8 %)
<i>Bifidobacterium spp.</i>					
Острый флегмонозный калькулёзный холецистит (n = 46)	<i>Peptostreptococcus spp.</i>				2 (4,9 %)
	<i>Bifidobacterium spp.</i>				
	<i>Clostridium spp.</i>				
	<i>Ruminicoccus spp.</i>				4 (9,8 %)
	<i>Eubacterium spp.</i>				
	<i>Porphyromonas spp.</i>		<i>Porphyromonas spp.</i>		
	<i>Prevotella spp.</i>				
	<i>Bacteroides fragilis</i>				7 (17,1 %)

Продолжение таблицы 17

Форма КХ	Исследуемые материалы				Количество случаев идентификации
	Кровь	Пузырная желчь	Биоптат стенки желчного пузыря	Желчный конкремент	
	<i>Peptostreptococcus spp.</i>				
	<i>Bifidobacterium spp.</i>				
	<i>Porphyromonas spp.</i>		<i>Porphyromonas spp.</i>		3 (7,3 %)
	<i>Eubacterium spp.</i>				
	<i>Clostridium spp.</i>				5 (12,2 %)
	<i>Eubacterium spp.</i>				
	<i>Ruminococcus spp.</i>				
	<i>Peptostreptococcus spp.</i>				4 (9,8 %)
	<i>Porphyromonas spp.</i>		<i>Porphyromonas spp.</i>		
	<i>Bifidobacterium spp.</i>				
	<i>Bacteroides fragilis</i>				
	<i>Clostridium spp.</i>				2 (4,9 %)
	<i>Bacteroides fragilis</i>				
	<i>Eubacterium spp.</i>				
	<i>Prevotella spp.</i>				3 (7,3 %)
<i>Bacteroides fragilis</i>					
Острый гангренозный калькулёзный холецистит (n = 32)	<i>Peptostreptococcus spp.</i>				4 (14,3 %)
	<i>Bifidobacterium spp.</i>				
	<i>Eubacterium spp.</i>				
	<i>Prevotella spp.</i>				2 (7,1 %)
			<i>Porphyromonas spp.</i>		
	<i>Bacteroides fragilis</i>				
	<i>Clostridium spp.</i>				
<i>Peptostreptococcus spp.</i>				5 (17,9 %)	

Окончание таблицы 17

Форма КХ	Исследуемые материалы				Количество случаев идентификации
	Кровь	Пузырная желчь	Биоптат стенки желчного пузыря	Желчный конкремент	
	<i>Eubacterium spp.</i>				4 (14,3 %)
				<i>Porphyromonas spp.</i>	
	<i>Clostridium spp.</i>				
	<i>Bifidobacterium spp.</i>				
	<i>Eubacterium spp.</i>				5 (17,9 %)
	<i>Prevotella spp.</i>				
	<i>Clostridium spp.</i>				
	<i>Bacteroides fragilis</i>				2 (7,1 %)
	<i>Ruminococcus spp.</i>				
	<i>Eubacterium spp.</i>				

Наиболее разнообразный микробный пейзаж в виде ассоциаций был выявлен при остром флегмонозном (59,9 %) и гангренозном (65,3 %) калькулёзном холецистите.

С развитием инфекционно-воспалительного процесса в желчном пузыре от острой катаральной формы (54,3 %), острого флегмонозного калькулёзного холецистита (59,9 %) и к острому гангренозному холециститу (65,3 %) прослеживается явная тенденция к увеличению количества ассоциаций микробных культур. Это позволяет сделать предположение о том, что с нарастанием выраженности воспалительного процесса в желчном пузыре от катаральной до гангренозной форм микробная флора детектируется в ассоциациях, что позволяет сделать вывод о возрастающей роли микст-инфекций в развитии острого калькулёзного холецистита (таблица 18).

Таблица 18 – Обратная пропорциональная взаимосвязь между формами калькулёзного холецистита и количеством идентифицированных монокультур и микробных ассоциаций

Форма КХ	Количество монокультур	Количество микробных ассоциаций	Критерий статистической значимости
ХКХ	7 (63,6 %)	4 (23,1 %)	—
ОККХ ¹	12 (32,4 %)	25 (54,3 %)	$\varphi < 0,05$ (при критерии Фишера $> 1,64$)
ФКХ ²	11 (26,8 %)	30 (59,9 %)	$\varphi < 0,05$ (при критерии Фишера $> 1,64$)
ГКХ ³	6 (21,4 %)	22 (65,3 %)	$\varphi < 0,01$ (при критерии Фишера $> 2,31$)
¹ Значимость полученных результатов при сравнении ОККХ с ХКХ. ² Значимость полученных результатов при сравнении ФКХ с ХКХ. ³ Значимость полученных результатов при сравнении ГКХ с ХКХ.			

Статистически значимых различий в частоте идентификации микроорганизмов в разных биологических средах выявлено не было, поскольку количество экв. клеток в крови является отражением количества экв. клеток в кишечнике и желчном пузыре.

Детекция экв. клеток микроорганизмов, хотя бы в двух из четырёх биологических материалов, является доказательством патогномичности полученных результатов и свидетельствует об отсутствии ложноположительных результатов идентификации этих микроорганизмов при возможном наличии сопутствующих воспалительных процессов в других органах и системах.

При анализе полученных данных выявлена взаимосвязь между детектированными анаэробными микроорганизмами и развитием острого деструктивного (флегмонозного и гангренозного) калькулёзного холецистита и его осложнений: местного перитонита, распространённого перитонита, перивезикального инфильтрата и перивезикального абсцесса.

Из 78 больных ФКХ и ГКХ у 69 (88,5 %) были выявлены анаэробные микроорганизмы. Однако следует отметить, что вышеперечисленные осложнения характеризовались также выделением аэробных, факультативно-анаэробных и микроаэрофильных бактерий. Спектр флоры, идентифицированный бактериологическим методом и методом ГЖХ, а также сопряжённые осложнения ЖКБ представлены в таблицах 19 и 20.

Таблица 19 – Спектр ассоциаций аэробных и анаэробных микроорганизмов, идентифицированных при осложнениях острого флегмонозного калькулёзного холецистита

Культуры аэробов / анаэробов	Ан Гр«-» (<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Eubacterium spp.</i> , <i>Porphyromonas spp.</i> , <i>Prevotella spp.</i>) ^A	Ан Гр«+» спора «-» (<i>Peptostreptococcus spp.</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i>) ^B	Ан Гр«+» спора «+» (<i>Clostridium spp.</i> , <i>Ruminococcus spp.</i>) ^C
Ф/а Гр«+» спора «-» (<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>Str. faecalis</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Rhodococcus spp.</i> , <i>Propionibacterium spp.</i>) ¹	Перивезикальный абсцесс – 2 (4,8 %) + ³	Распространённый перитонит – 1 (2,4 %) + ^A	Распространённый перитонит – 1 (2,4 %) + ³
Ф/а Гр«+» спора «+» (<i>Bacillus spp.</i> , <i>Actinomyces spp.</i>) ²	Перивезикальный инфильтрат – 4 (9,8 %)	Перивезикальный инфильтрат – 3 (7,3 %)	Перивезикальный абсцесс – 1 (2,4 %)
Ф/а Гр«-» энтеробактерии (<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. marcescens</i>) ³	Перивезикальный абсцесс – 1 (2,4 %) + ¹	Распространённый перитонит – 1 (2,4 %) + ^{1+C}	Местный перитонит – 2 (4,8 %) + ²
Аэр. Гр«-» <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ⁴	Перивезикальный инфильтрат – 3 (7,3 %)	Перивезикальный инфильтрат – 3 (7,3 %)	Перивезикальный абсцесс – 2 (4,8 %) + ¹

Продолжение таблицы 19

Культуры аэробов / анаэробов	Ан Гр«←» (<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Eubacterium spp.</i> , <i>Porphyromonas spp.</i> , <i>Prevotella spp.</i>) ^A	Ан Гр«+» спора «←» (<i>Peptostreptococcus spp.</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i>) ^B	Ан Гр«+» спора «+» (<i>Clostridium spp.</i> , <i>Ruminococcus spp.</i>) ^C
Аэр. Гр«←» (<i>Moraxella spp.</i> , <i>Flavobacterium spp.</i>)	Местный перитонит – 2 (4,8 %)	Перивезикальный инфильтрат – 2 (4,8 %) + ²	Перивезикальный абсцесс – 1 (2,4 %)
Микроаэрофилы Гр«←» (<i>Campylobacter spp.</i> , <i>Helicobacter pylori</i>)	Перивезикальный инфильтрат – 2 (4,8 %) + ^B	Перивезикальный инфильтрат – 2 (4,8 %)	Местный перитонит – 4 (9,8 %)
Дрожжеподобные грибы <i>Candida spp.</i>	Перивезикальный абсцесс – 1 (2,4 %) + ⁴	Местный перитонит – 2 (4,8 %)	Перивезикальный абсцесс – 1 (2,4 %) + ³
Перивезикальный инфильтрат – 19 (46,3 %)			
Перивезикальный абсцесс – 9 (22 %)			
Местный перитонит – 10 (24,4 %)			
Распространённый перитонит – 3 (7,3 %)			

У пациентов с острым флегмонозным калькулёзным холециститом наибольшее количество осложнений отмечалось в виде перивезикального инфильтрата (46,3 %), на втором месте по частоте встречаемости – местный перитонит (24,4 %), затем перивезикальный абсцесс (22 %) и распространённый перитонит (7,3 %). В термин распространённый перитонит включены понятия диффузного и разлитого перитонита с серозным и серозно-фибринозным характером выпота. При этом необходимо отметить, что в подавляющем большинстве случаев (87,7 %) при местном и распространённом перитоните обнаруживался перивезикальный инфильтрат разной степени выраженности.

При анализе спектра ассоциаций аэробных и анаэробных микроорганизмов, идентифицированных при осложнениях острого флегмонозного калькулёзного холецистита, у 41 (89,1 %) пациента с положительными результатами детекции (у 5 больных были получены отрицательные результаты идентификации) выявлены

следующие закономерности.

При развитии перивезикального инфильтрата наиболее часто идентифицированы представители факультативно-анаэробных грамположительных спорообразующих микроорганизмов (*Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*) в ассоциации с анаэробными грамотрицательными бактериями (*Bacteroides fragilis*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*) и анаэробными грамположительными неспорообразующими микроорганизмами (*Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*), *Pseudomonas aeruginosa* в ассоциации с анаэробными грамотрицательными бактериями (*Bacteroides fragilis*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*) и анаэробными грамположительными неспорообразующими бактериями (*Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*), которые, в свою очередь, также сочетались с представителями аэробной грамотрицательной флоры (*Moraxella spp.*, *Flavobacterium spp.*) в ассоциации с факультативно анаэробными грамположительными спорообразующими микроорганизмами, микроаэрофильные грамотрицательные бактерии (*Campylobacter spp.*, *Helicobacter pylori*) сочетались с анаэробными грамотрицательными и анаэробными грамположительными споронеобразующими бактериями. При этом следует отметить, что наиболее частыми возбудителями при формировании перивезикального инфильтрата были *Bacillus spp.* и *Actinomyces spp.* ($p \leq 0,01$ при $U \leq U_{кр.}$).

При развитии перивезикального абсцесса наиболее часто идентифицированы представители факультативно анаэробных грамположительных неспорообразующих микроорганизмов (*E. faecium*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Str. faecalis*, *Lactobacillus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*) в ассоциации с анаэробными грамотрицательными бактериями (*Bacteroides fragilis*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*) и энтеробактериями, факультативно анаэробных грамотрицательных микроорганизмов (*Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*) в ассоциации с анаэробными грамположительными спорообразующими микроорганизмами (*Clostridium spp.*,

Ruminicoccus spp.), которые, в свою очередь, также сочетались с представителями аэробной грамотрицательной флоры (*Pseudomonas aeruginosa*, *Moraxella spp.*, *Flavobacterium spp.*) и дрожжеподобными грибами рода *Candida*, факультативно анаэробные грамотрицательные энтеробактерии (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*) идентифицировались в сочетании с факультативно анаэробными грамположительными неспорообразующими микроорганизмами и анаэробными грамотрицательными бактериями (*Bacteroides fragilis*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*), которые ассоциировались, в свою очередь, с дрожжеподобными грибами рода *Candida*. *Pseudomonas aeruginosa* определялся в сочетании с анаэробными грамположительными спорообразующими микроорганизмами (*Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*), а также с факультативно анаэробными грамположительными неспорообразующими микроорганизмами. Дополнительно в ассоциации *Candida spp.* и анаэробных грамотрицательных бактерий (*Bacteroides fragilis*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*) идентифицированы бактерии *Pseudomonas aeruginosa*. Также «тройная» ассоциация была представлена *Candida spp.*, анаэробные грамположительные спорообразующие микроорганизмы (*Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*) и энтеробактерии. При этом следует отметить, что из анаэробной флоры наиболее часто встречаются представители *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.* – представители грамотрицательной и грамположительной спорообразующей флоры. Значимых различий по аэробным и факультативно анаэробным микроорганизмам получено не было.

При развитии местного перитонита наиболее часто идентифицированы представители анаэробных грамположительных спорообразующих микроорганизмов (*Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*) в ассоциации с энтеробактериями (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*) (совместно с *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*) и микроаэрофилами (*Campylobacter spp.*, *Helicobacter pylori*), а также аэробных грамотрицательных бактерий (*Moraxella spp.*, *Flavobacterium spp.*) в ассоциации с анаэробными грамотрицательными бактериями (*Bacteroides*

fragilis, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*), анаэробных грамположительных неспорообразующих бактерий (*Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*) с *Candida spp.* При этом наиболее частыми возбудителями инфекционно-воспалительного процесса из анаэробной флоры были представители *Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.* ($p \leq 0,01$ при $U \leq U_{кр.}$).

При развитии распространённого перитонита наиболее часто идентифицированы представители факультативно анаэробных грамположительных неспорообразующих микроорганизмов (*E. faecium*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Str. faecalis*, *Lactobacillus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*) в ассоциации с анаэробными грамположительными спорообразующими (*Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*) и неспорообразующими (*Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*) микроорганизмами, а также последних в сочетании с энтеробактериями. Кроме того, дополнительно представители *Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.* ассоциировались с анаэробными грамотрицательными бактериями, *Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.* – с энтеробактериями, а *Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.* – с факультативно анаэробными грамположительными неспорообразующими бактериями и *Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.* При этом следует отметить, что значимых различий по частоте встречаемости микроорганизмов выявлено не было.

Таблица 20 – Спектр ассоциаций аэробных и анаэробных микроорганизмов, идентифицированных при осложнениях острого гангренозного калькулёзного холецистита

Культуры аэробов / анаэробов	Ан Гр«←» (<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Eubacterium spp.</i> , <i>Porphyromonas spp.</i> , <i>Prevotella spp.</i>) ^A	Ан Гр«+» спора «←» (<i>Peptostreptococcus spp.</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i>) ^B	Ан Гр«+» спора «+» (<i>Clostridium spp.</i> , <i>Ruminococcus spp.</i>) ^C
Ф/а Гр«+» спора «←» (<i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>Str. faecalis</i> , <i>Lactobacillus spp.</i> , <i>Rhodococcus spp.</i> , <i>Propionibacterium spp.</i>) ¹	Распространённый перитонит – 1 (3,6%) + ³	Распространённый перитонит – 1 (3,6%) + ^A	Распространённый перитонит – 1 (3,6%)
Ф/а Гр«+» спора «+» (<i>Bacillus spp.</i> , <i>Actinomyces spp.</i>) ²	Местный перитонит – 1 (3,6%)	Местный перитонит – 2 (7,2%)	Перивезикальный абсцесс – 2 (7,2%)
Ф/а Гр«←» энтеробактерии (<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. marcescens</i>) ³	Перивезикальный абсцесс – 1 (3,6%) ⁵	Распространённый перитонит – 1 (3,6%) + ¹	Перивезикальный инфильтрат – 3 (10,7%) + ²
Аэр. Гр«←» <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ⁴	Перивезикальный абсцесс – 2 (7,2%)	Перивезикальный инфильтрат – 2 (7,2%)	Перивезикальный абсцесс – 1 (3,6%) + ₁
Аэр. Гр«←» (<i>Moraxella spp.</i> , <i>Flavobacterium spp.</i>)	Перивезикальный абсцесс – 1 (3,6%) + ¹	Перивезикальный инфильтрат – 1 (3,6%)	Перивезикальный абсцесс – 1 (3,6%)
Микроаэрофилы Гр«←» (<i>Campylobacter spp.</i> , <i>Helicobacter pylori</i>) ⁵	Перивезикальный инфильтрат – 1 (3,6%) + ^B	Местный перитонит – 1 (3,6%)	Перивезикальный абсцесс – 1 (3,6%)

Продолжение таблицы 20

Культуры аэробов / анаэробов	Ан Гр«←» (<i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Eubacterium spp.</i> , <i>Porphyromonas spp.</i> , <i>Prevotella spp.</i>) ^A	Ан Гр«+» спора «←» (<i>Peptostreptococcus spp.</i> , <i>Bifidobacterium spp.</i>) ^B	Ан Гр«+» спора «+» (<i>Clostridium spp.</i> , <i>Ruminococcus spp.</i>) ^C
Дрожжеподобные грибы <i>Candida spp.</i>	Перивезикальный инфильтрат – 2 (7,2%) + ⁴	Местный перитонит – 1 (3,6%) ^{+C}	Перивезикальный абсцесс – 1 (3,6%) + ^A
Перивезикальный инфильтрат – 9 (32,1 %)			
Перивезикальный абсцесс – 10 (35,7 %)			
Местный перитонит – 5 (17,9 %)			
Распространённый перитонит – 4 (14,3 %)			

У пациентов с острым гангренозным калькулёзным холециститом наибольшее количество осложнений отмечалось в виде перивезикального абсцесса (35,7 %), на втором месте по частоте встречаемости – перивезикальный инфильтрат (32,1 %), затем местный перитонит (17,9 %) и распространённый перитонит (14,3 %). В термин «распространённый перитонит» включены понятия диффузного и разлитого перитонита с серозным, серозно-фибринозным, фибринозно-гнойным и желчным характером выпота. При этом необходимо отметить, что, в подавляющем большинстве случаев (91,2 %), при местном и распространённом перитоните обнаруживался перивезикальный инфильтрат разной степени выраженности.

При анализе спектра ассоциаций аэробных и анаэробных микроорганизмов, идентифицированных при осложнениях острого гангренозного калькулёзного холецистита, у 28 (87,5 %) пациентов с положительными результатами детекции (у 4 больных были получены отрицательные результаты идентификации) выявлены следующие закономерности.

При развитии перивезикального инфильтрата наиболее часто идентифицированы микроаэрофильные грамотрицательные бактерии (*Campylobacter spp.*, *Helicobacter pylori*) в сочетании с анаэробными

грамотрицательными бактериями (*Bacteroides fragilis*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*) и анаэробными грамположительными неспорообразующими микроорганизмами (*Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*). Дрожжеподобные грибы рода *Candida* в ассоциации с анаэробными грамотрицательными бактериями и *Pseudomonas aeruginosa*. Анаэробные грамположительные неспорообразующие микроорганизмы (*Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*) в сочетании с *Pseudomonas aeruginosa* или с представителями аэробной грамотрицательной флоры (*Moraxella spp.*, *Flavobacterium spp.*). Представители *Clostridium spp.*, *Ruminococcus spp.* в ассоциации с энтеробактериями и микроорганизмами *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.* При этом следует отметить, что значимых различий по частоте встречаемости микроорганизмов выявлено не было.

При развитии перивезикального абсцесса наиболее часто идентифицированы представители анаэробных грамположительных спорообразующих микроорганизмов (*Clostridium spp.*, *Ruminococcus spp.*) в ассоциации с микроорганизмами *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.* или *Pseudomonas aeruginosa* с факультативно анаэробными грамположительными неспорообразующими микроорганизмами (*E. faecium*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Str. faecalis*, *Lactobacillus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*) или с *Moraxella spp.*, *Flavobacterium spp.* или микроаэрофильными бактериями или с ассоциацией дрожжеподобных грибов рода *Candida* с анаэробными грамотрицательными бактериями. Последние были ассоциированы с энтеробактериями (и микроаэрофилами), строгими аэробами (*Pseudomonas aeruginosa*), а также *Moraxella spp.*, *Flavobacterium spp.* с факультативно анаэробными грамположительными неспорообразующими микроорганизмами. При этом может быть сделан вывод о том, что из анаэробной флоры наиболее часто встречаются представители *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Clostridium spp.*, *Ruminococcus spp.* – представители грамотрицательной и грамположительной спорообразующей флоры. Значимых различий получено не было.

При развитии местного перитонита наиболее часто идентифицированы представители анаэробных грамположительных неспорообразующих бактерий (*Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*) в ассоциации с факультативно анаэробными грамположительными спорообразующими микроорганизмами (*Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*), микроаэрофилами и дрожжеподобными грибами. Анаэробные грамотрицательные бактерии (*Bacteroides fragilis*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*) сочетались с представителями *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.* При этом наиболее частыми возбудителями инфекционно-воспалительного процесса из анаэробной флоры были представители *Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*

При развитии распространённого перитонита наиболее часто идентифицированы представители факультативно анаэробных грамположительных неспорообразующих микроорганизмов (*E. faecium*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Str. faecalis*, *Lactobacillus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*) в ассоциации со всеми группами анаэробных микроорганизмов. При этом в ассоциацию с анаэробными грамотрицательными бактериями также входили представители семейства *Enterobacteriaceae*. *Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.* были ассоциированы с энтеробактериями и факультативно анаэробными грамположительными неспорообразующими микроорганизмами. Значимых различий по частоте встречаемости микроорганизмов выявлено не было.

Отсутствие значимых различий по частоте встречаемости возбудителей инфекционно-воспалительного процесса в желчном пузыре, вероятно, объясняется малым числом наблюдений для каждой конкретной ассоциации микроорганизмов.

Таким образом, всего наблюдалось 23 пациента с ХКХ, 44 пациента с ОККХ, 46 – с ФКХ и 32 – с ГКХ. При этом положительные результаты идентификации аэробной, факультативно анаэробной, микроаэрофильной и анаэробной микрофлоры в монокультуре и в ассоциациях бактериологическим методом и методом ГЖХ получены в 11 случаях при ХКХ, в 37 случаях у пациентов с ОККХ, у 41 больного ФКХ и у 28 пациентов с ГКХ.

На основании вышесказанного можно предположить, что при наличии анаэробной инфекции и труднокультивируемых факультативно анаэробных, аэробных и микроаэрофильных микроорганизмов в большом проценте случаев развиваются деструктивные формы острого калькулёзного холецистита и его осложнения (таблица 21).

Таблица 21 – Идентификация возбудителей инфекции при осложнённых формах острого калькулёзного холецистита

Культуры микроорганизмов	ХКХ	ОККХ	ФКХ и ГКХ	Метод идентификации возбудителя	
				Бак. метод	ГЖХ
Аэробная микрофлора	8 (72,7 %)	26 (70,3 %)	27 (39,1 %)**	71 (49 %)	78 (53,8 %)
Анаэробная микрофлора	3 (27,3 %)	11 (29,7 %)	42 (60,9 %)**	1 (0,7 %)	39 (26,9 %)**
Всего:	11 (100 %)	37 (100 %)	69 (100 %)	72 (49,7 %)	117 (80,7 %)
** $\varphi < 0,01$ (при критерии Фишера $> 2,31$).					

Таким образом, метод газожидкостной хромато-масс-спектрометрии позволяет в короткие сроки (в течение 3 часов) определить наличие и концентрацию микроорганизмов в крови, пузырной желчи, биоптате стенки желчного пузыря и желчном конкременте, что позволяет использовать этот метод в качестве метода экспресс-диагностики как в дооперационном, так и в послеоперационном периоде.

При исследовании крови и параллельном исследовании испражнений становится возможным уже в первые сутки поступления больного с ургентной хирургической патологией, в том числе острым калькулёзным холециститом, в стационар сориентироваться в вопросе идентификации возбудителей инфекционно-воспалительного процесса и назначении рациональной антибиотикопрофилактики, пред- и послеоперационной антимикробной химиотерапии.

По результатам газожидкостной хромато-масс-спектрометрии крови и испражнений был установлен коэффициент (0,12), позволяющий верифицировать источник метаболитов микрофлоры, которые появляются в крови – кишечник или другой очаг инфекции, например, желчный пузырь.

Дальнейшее исследование в послеоперационном периоде пузырьной желчи, биоптата стенки желчного пузыря и желчных конкрементов, взятых интраоперационно, позволяют подтвердить или опровергнуть результаты первичного определения по крови, тем самым сводя к минимуму вероятность получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов детекции микроорганизмов – возбудителей инфекционно-воспалительного процесса в желчном пузыре.

При сравнении метода ГЖХ с бактериологическим методом (по аэробным микроорганизмам) получены идентичные результаты детекции микроорганизмов в подавляющем большинстве случаев (96 %). Таким образом, чувствительность метода для идентификации микрофлоры билиарной системы составила 95,2 %, специфичность – 89,2 %, что, в свою очередь, представляет метод ГЖХ в качестве метода с достаточно высокой диагностической ценностью.

Метод ГЖХ позволяет идентифицировать спектр строгих анаэробных микроорганизмов, диагностика которых затруднена при использовании классического метода бактериологической диагностики, даже с применением современных тест-систем для идентификации анаэробных микроорганизмов.

Кроме того, применение метода ГЖХ позволяет расширить спектр идентифицируемых аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных труднокультивируемых микроорганизмов по сравнению с бактериологическим методом.

Учитывая минимальную инвазивность метода, его можно использовать в качестве метода клинического динамического контроля эффективности антибактериальной терапии.

3.4 Результаты определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным химиопрепаратам при разных формах калькулёзного холецистита

При анализе результатов определения чувствительности выделенных культур к антибактериальным химиопрепаратам установлено, что большинство из представителей вышеуказанных штаммов чувствительны к применяемым лекарственным препаратам (рисунок 20).

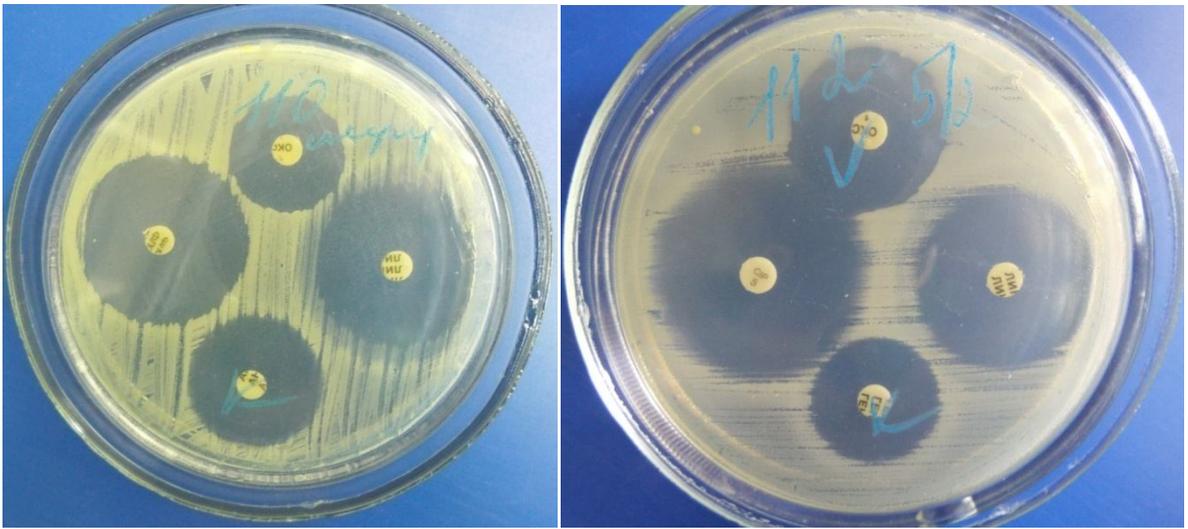


Рисунок 20 – Результат определения чувствительности аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов к основным антибактериальным химиопрепаратам диско-диффузионным методом

Однако ряд культур показал умеренную устойчивость или резистентность к некоторым антибактериальным средствам, которые достаточно широко используются для лечения больных калькулёзным холециститом как до, так и после операции.

Вопрос об антибактериальной химиотерапии, конечно, более актуален для деструктивных форм острого калькулёзного холецистита (флегмонозная и гангренозная формы) и его осложнений (перивезикальный инфильтрат, абсцесс, местный и распространённый перитонит), поскольку при операции по поводу хронического калькулёзного холецистита (при условии отсутствия осложнений и

дополнительных показаний для проведения антибиотикотерапии) применяется только предоперационная антибиотикопрофилактика. У пациентов с острым катаральным калькулёзным холециститом при отсутствии осложнений и дополнительных показаний для проведения антибиотикотерапии в подавляющем большинстве случаев в послеоперационном периоде антимикробная терапия не назначается.

Из группы факультативно анаэробных грамположительных неспорообразующих кокков устойчивость к гентамицину была выявлена у 9 % штаммов культуры *Streptococcus faecalis* с диаметром зоны подавления роста 3 мм, при этом была выявлена чувствительность к ципрофлоксацину и ампициллину (рисунок 21).

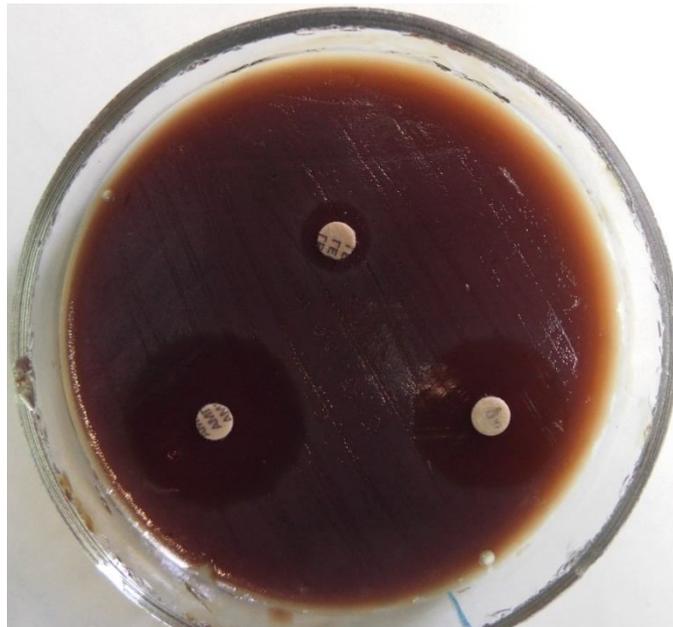


Рисунок 21 – Результат определения чувствительности культуры *Streptococcus faecalis* к гентамицину, ампициллину и ципрофлоксацину диско-диффузионным методом

Культура *Staphylococcus epidermidis* была устойчива к ципрофлоксацину в 5 % анализируемых штаммов, левофлоксацину (4 %), эритромицину (7 % штаммов) и чувствительна к амикацину (рисунок 22).

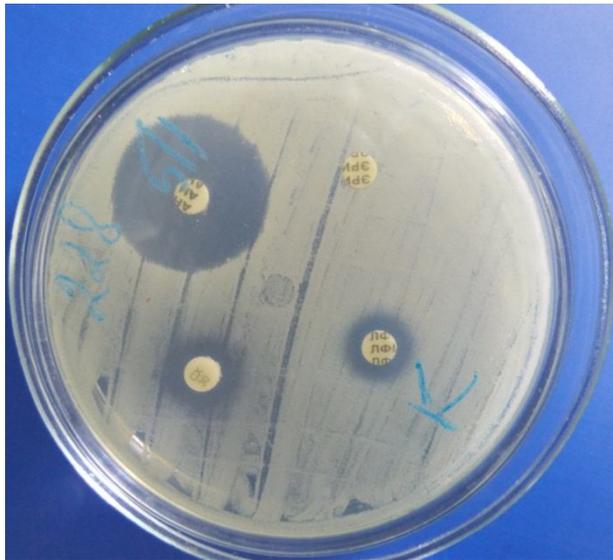


Рисунок 22 – Результат определения чувствительности культуры *Staphylococcus epidermidis* к ципрофлоксацину, левофлоксацину, эритромицину и амикацину диско-диффузионным методом

Культура *Staphylococcus saprophyticus* была резистентна к оксациллину, линкомицину, ципрофлоксацину и гентамицину – у одного пациента (рисунок 23).



Рисунок 23 – Результат определения чувствительности культуры *Staphylococcus saprophyticus* к оксациллину, линкомицину, ципрофлоксацину и гентамицину диско-диффузионным методом

Из факультативно анаэробных грамотрицательных неспорообразующих палочковидных энтеробактерий резистентность к цефтазидиму, цефотаксиму,

левофлоксацину, ампициллин сульбактаму, пефлоксацину и амикацину была установлена у одного пациента с идентифицированной культурой *Escherichia coli*.

При этом 15 % штаммов культуры *Escherichia coli* были устойчивы к левофлоксацину, 10 % – к пефлоксацину, 7 % – к амикацину и 4 % – к амоксициллин клавуланату (рисунок 24).

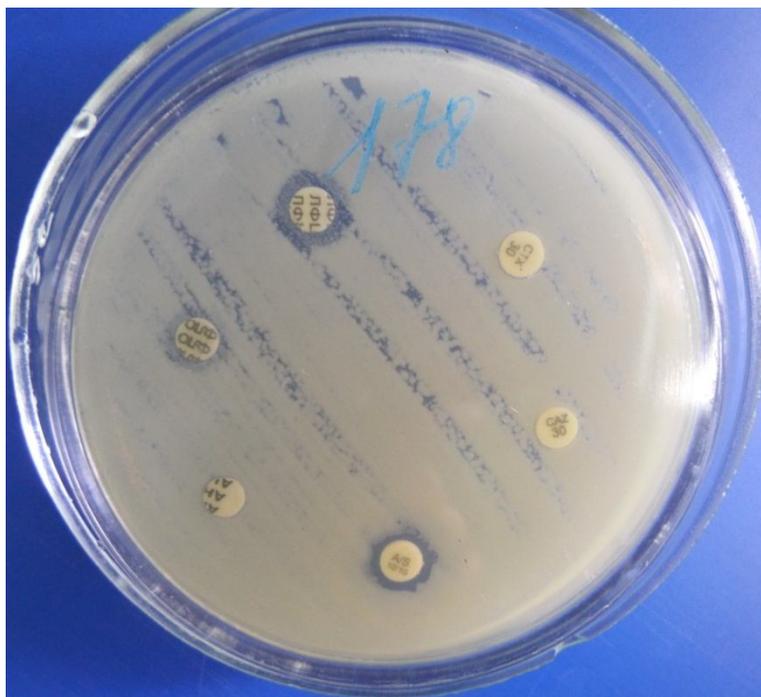


Рисунок 24 – Результат определения чувствительности культуры *Escherichia coli* к цефтазидиму, цефотаксиму, левофлоксацину, ампициллин сульбактаму, пефлоксацину и амикацину диско-диффузионным методом

В группе аэробных неспорообразующих грамотрицательных бактерий устойчивость к амикацину была выявлена у 6 % штаммов культуры *Acinetobacter baumannii* (одной из возбудителей нозокомиальных инфекций) (рисунок 25).



Рисунок 25 – Результат определения чувствительности культуры *Acinetobacter baumannii* к амикацину, пефлоксацину левофлоксацину, цефотаксиму, цефтазидиму и ампициллин сульбактаму диско-диффузионным методом

Культура *Pseudomonas aeruginosa* была устойчива к амикацину, имипенему, левофлоксацину, пефлоксацину, цефтазидиму и цефоперазону – у одного пациента. В 17% штаммов культура *Pseudomonas aeruginosa* была устойчива к левофлоксацину и чувствительна к другим антисинегнойным препаратам (рисунок 26).

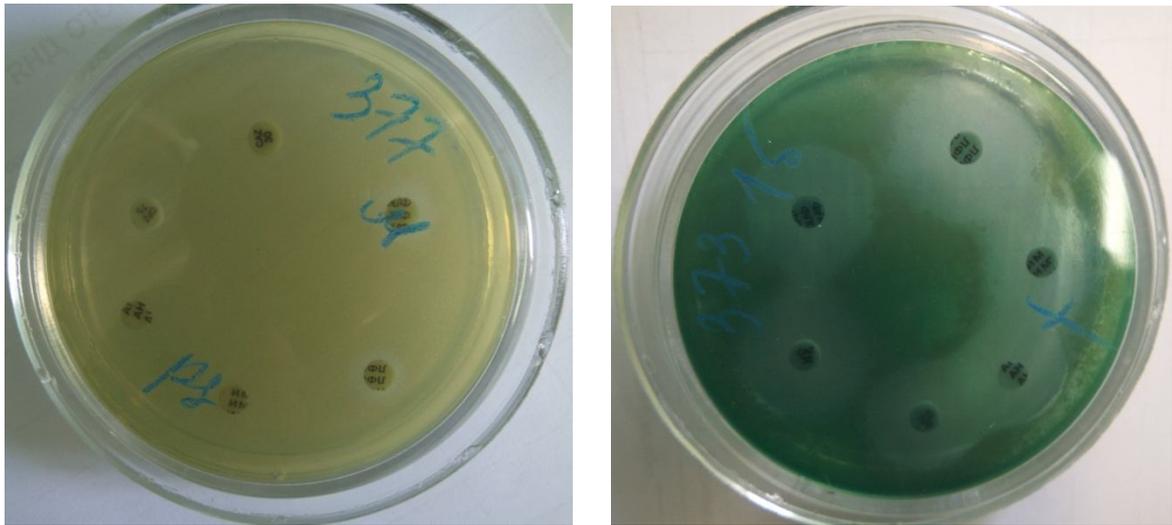


Рисунок 26 – Результат определения чувствительности культуры *Pseudomonas aeruginosa* к антимикробным химиопрепаратам диско-диффузионным методом

Единственный выделенный бактериологическим методом представитель анаэробных неспорообразующих грамотрицательных палочковидных бактерий *Bacteroides fragilis* был резистентен к метронидазолу и амоксициллину / клавулановой кислоте (при концентрации антибактериального препарата 8–16 и 4/2–8/4 мг/л соответственно).

Следует отметить, что при выделении у одного и того же больного из различных биологических материалов (пузырная желчь, биоптат стенки желчного пузыря, желчные конкременты) монокультур одного вида бактерий антибиотикограммы были идентичными.

Важным аспектом при определении антибиотикорезистентности является то, что при идентификации бактериальных ассоциаций была выявлена популяционная гетерорезистентность с перекрёстной устойчивостью разных культур микроорганизмов к одним и тем же антимикробным химиопрепаратам.

Таким образом, может быть сделан вывод о том, что большинство штаммов микроорганизмов, выделенных из различных биологических материалов больных калькулёзным холециститом, чувствительны к применяемым в клинической практике антимикробным средствам, которые включены в формуляр для эмпирической антимикробной химиотерапии при этой патологии. Однако необходимо помнить, что в настоящее время в стационарах, в том числе

общехирургического профиля, возрастает резистентность микроорганизмов, особенно возбудителей нозокомиальных инфекций, к широко применяемым антибактериальным препаратам. При этом увеличивается число людей, исходно поступающих в хирургический стационар уже с устойчивыми штаммами культур-возбудителей, что может быть связано с бесконтрольным приёмом антибиотиков или с недавним стационарным или амбулаторно-поликлиническим курсом (курсами) антибактериальной терапии по поводу какого-либо другого заболевания. Исходя из этого, при использовании экспресс-метода газожидкостной хромато-масс-спектрометрии становится возможным изначально ориентироваться в спектре возбудителей, их природной чувствительности и устойчивости. А также, исходя из полученных ранее данных для конкретного стационара, назначать антибактериальные препараты, максимально подходящие по всем параметрам в периоперационном периоде (предоперационная антибиотикопрофилактика, предоперационная и послеоперационная антибиотикотерапия), и тем самым оптимизировать антимикробную химиотерапию: постараться снизить или, по крайней мере, поддерживать на том же уровне процент резистентных культур и улучшить результаты лечения этой категории больных.

ГЛАВА 4 К ВОПРОСУ О РОЛИ МИКРОБНЫХ БИОПЛЁНОК В ЭТИОПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРОГО КАЛЬКУЛЁЗНОГО ХОЛЕЦИСТИТА

С применением сканирующей электронно-ионной микроскопии и рентгеновского микроанализа были изучены образцы желчных конкрементов, биоптаты стенки желчного пузыря и биоптаты стенки общего желчного протока.

По данным рентгеновского микроанализа, который позволяет определить не только качественный, но и количественный химический состав образцов, из 6 конкрементов все имели холестериновый состав, лишь только в 2 случаях конкременты содержали кальций, причём в первом случае концентрация кальция возрастала от центра к периферии, а во втором случае – от периферии к центру. В остальных случаях конкременты имели вполне однородный состав, большую часть которого составлял углерод. Также был в меньшей степени обнаружен кислород, на периферии – сера и фосфор. Так как, согласно методике, на образцы напылялось золото, на диаграмме визуализировались пики Au. Данное обстоятельство соответствует современному представлению о химическом составе желчных камней, так как, по различным данным, до 90 % конкрементов относятся к холестериновым. Различное содержание кальция в «слоях» конкрементов косвенно подтверждает этапность и длительность процесса литогенеза и указывает на возможную связь с нарушениями обмена веществ в организме и иммунными расстройствами. Кроме того, сами микробные тела могут являться очагами кальцинирования. Чёткой связи между макроскопическими характеристиками желчных камней и их минеральным составом выявить не удалось. Метод рентгеновского микроанализа позволяет, не нарушая структуры образца, определить его качественный и количественный состав, чего невозможно достичь применением иных методов (рисунок 27).

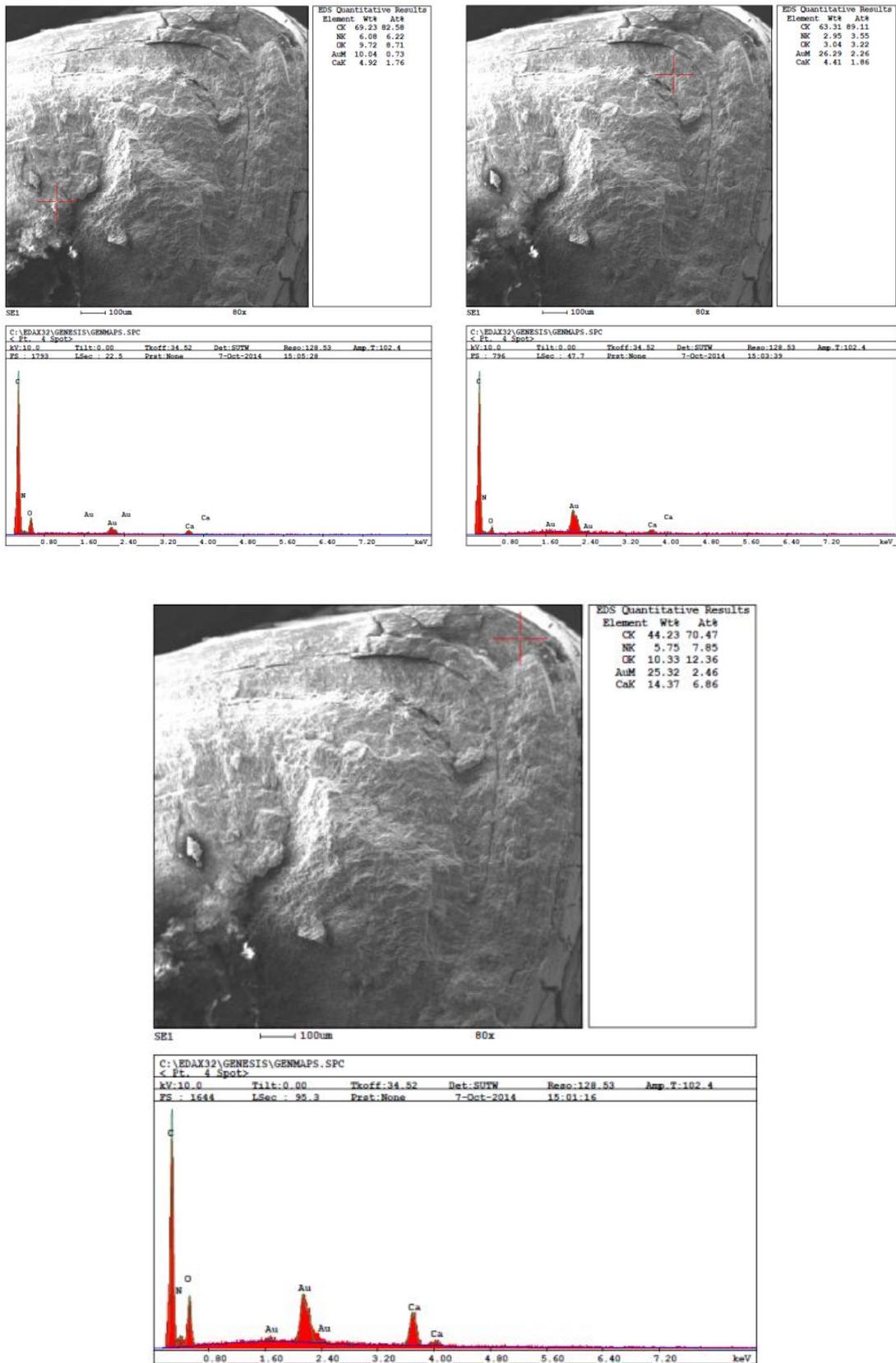


Рисунок 27 – Результаты рентгеновского микроанализа, иллюстрирующие увеличение содержания кальция от центра к периферии желчного конкремента

Все исследованные камни при инструментальных увеличениях от $\times 50$ до $\times 100$ имели гладкую поверхность, при больших увеличениях от $\times 200$ и более на поверхности визуализировались гладкие и пористые участки. Некоторые конкременты имели пластинчатую структуру. Кроме этого, выявлялись мелкие крошковидные наложения и тяжи (рисунки 28 и 29).



Рисунок 28 – Поверхность камня с участками гладкой и пористой поверхности, крошковидными наложениями, тяжами



Рисунок 29 – Наружная поверхность желчного конкремента. Хорошо видна «пластинчатая» структура камня, на которой фиксированы соединительнотканые тяжи

Посредством электронно-микроскопического исследования внешней поверхности желчных конкрементов были выявлены соединительнотканые тяжистые структуры, плотно фиксированные на поверхности конкремента, идущие в разных направлениях, среди которых визуализировались фибробласты и коллагеновые волокна (см. рисунок 29).

В химическом составе тяжей выявлен азот и сера с фосфором на периферии. Подобные «спайки» были описаны авторами на примере почечных конкрементов [138]. Постоянное травмирование стенки желчного пузыря острыми структурными элементами желчных камней вызывает воспаление. Фибробласты, находящиеся на поверхности, начинают синтезировать коллаген, который отграничивает поверхность конкремента от слизистой оболочки желчного пузыря. В результате камень может «привязываться» к стенке органа и фиксироваться. Это создает трудности при выполнении экстракорпоральной ударноволновой литотрипсии, поскольку во время процедуры при помощи ударной волны происходит дробление камня, соединительнотканые волокна рвутся, а части конкрементов остаются фиксированными ими к стенке желчного пузыря и не изгоняются из полости органа. Эти осколки служат в качестве центров кристаллизации холестерина, что приводит к рецидиву заболевания. Это подтверждается данными статистики, согласно которым после комплексного лечения, включающего литотрипсию и литолитическую терапию препаратами урсодезоксихолевой кислоты, с прекращением приёма последних рецидив развивается в 48–49 % случаев [93]. Кроме того, сама методика литотрипсии в желчном пузыре опасна развитием тяжёлых осложнений, таких как холангиолитиаз, холангит, механическая желтуха. Также при выполнении литотрипсии места разрывов соединительнотканых тяжей могут служить воротами для инфекции, которая присутствует в желчи при ЖКБ. По этой же причине нежелательны и такие оперативные вмешательства, как холецистолитотомия с холецистостомией.

Детальное изучение пористой наружной поверхности и внутренней поверхности камня показало, что она состоит из совокупности

кристаллоподобных структур. Кристаллоподобные структуры имели правильную геометрическую форму в виде параллелипипедов, между ними просматривались свободные пространства. Тяжи были идентичными по своему строению соединительнотканным волокнам с фибробластами (рисунки 30 и 31).

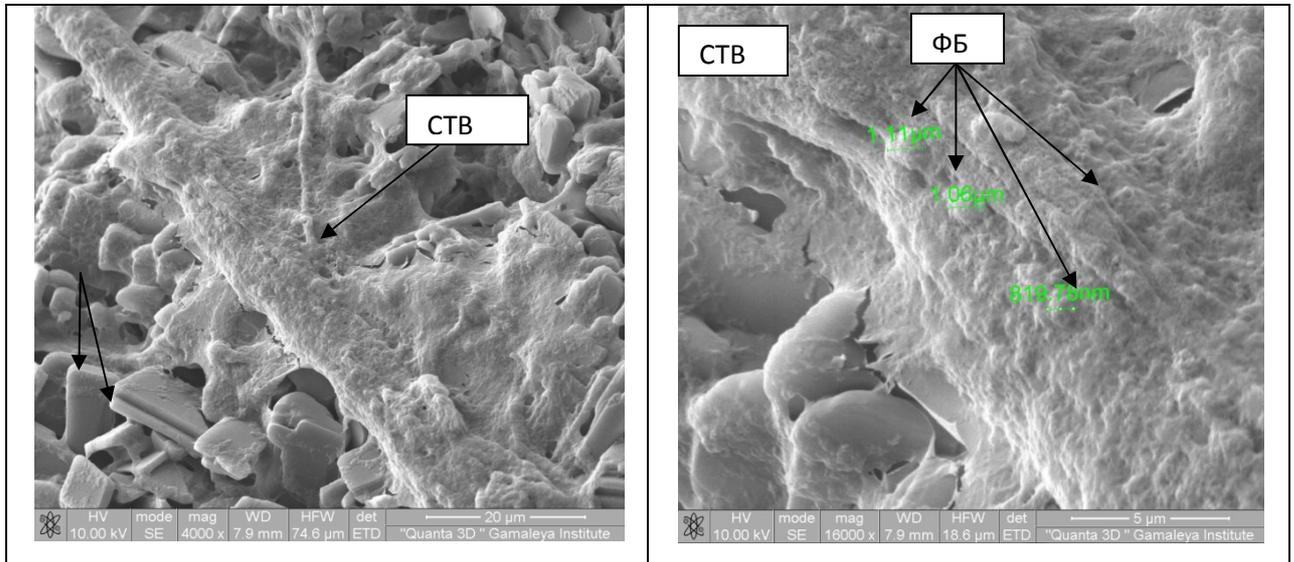


Рисунок 30 – Кристаллоподобные структуры ↑, СТВ – соединительнотканное волокно, ФБ – фибробласты

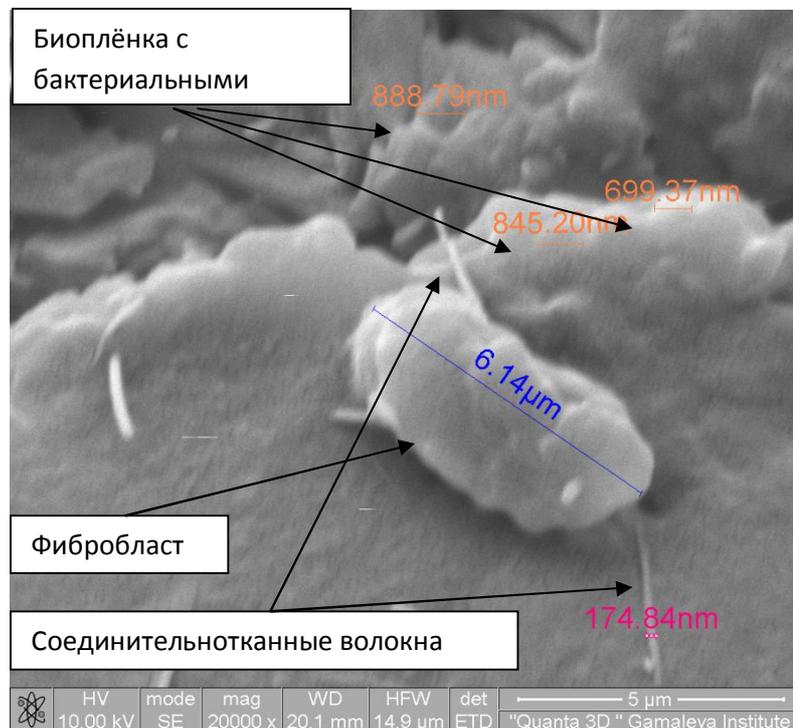
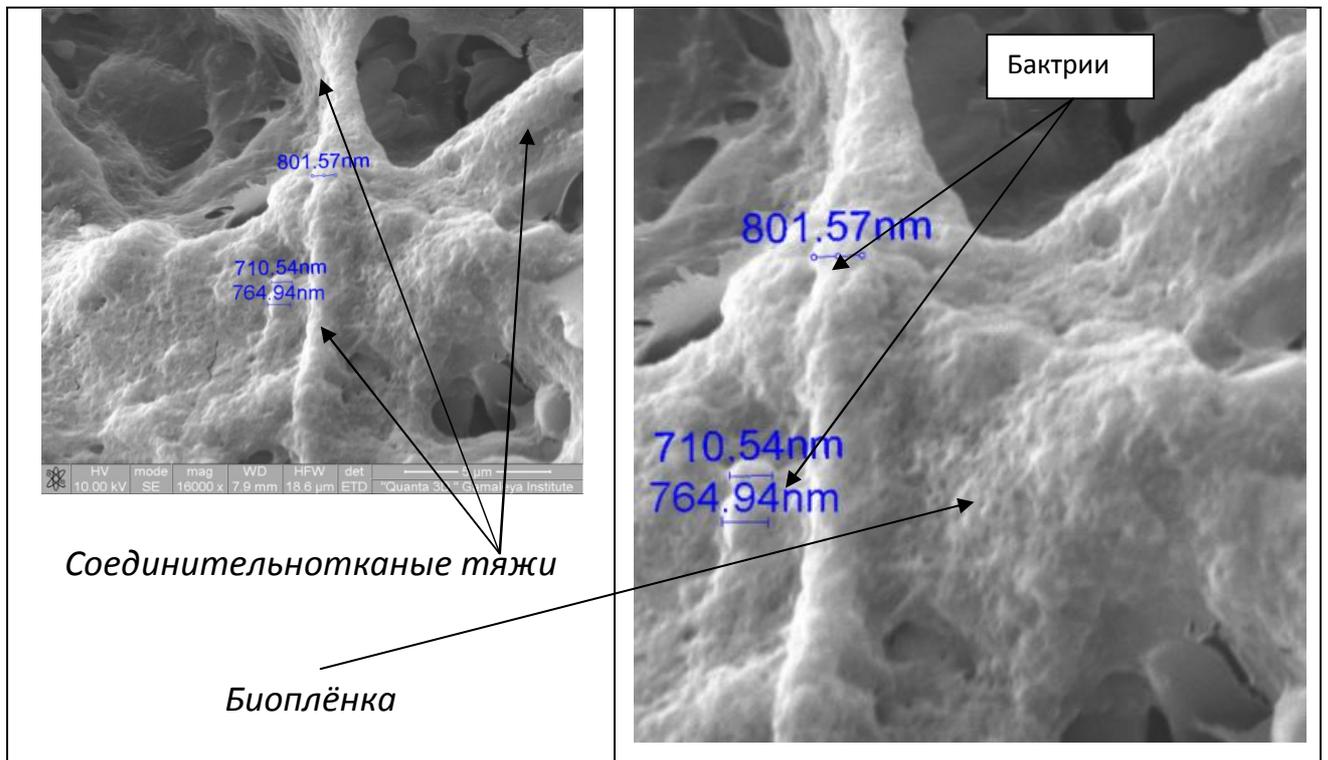


Рисунок 31 – Фибробласт, соединительнотканные волокна и биоплёнки с бактериальными клетками на внутренней поверхности конкремента

На поверхности камня, обращённого в полость желчного пузыря, были выявлены бактериальные биоплёнки, которые состояли из плотного экзоклеточного матрикса, под которым можно было видеть контуры бактерий. Следует отметить наличие тесной анатомической связи биоплёнок с соединительнотканными волокнами (рисунки 32 и 33).



Рисунки 32 – Визуализация анатомической связи биоплёнки с соединительнотканными тяжами

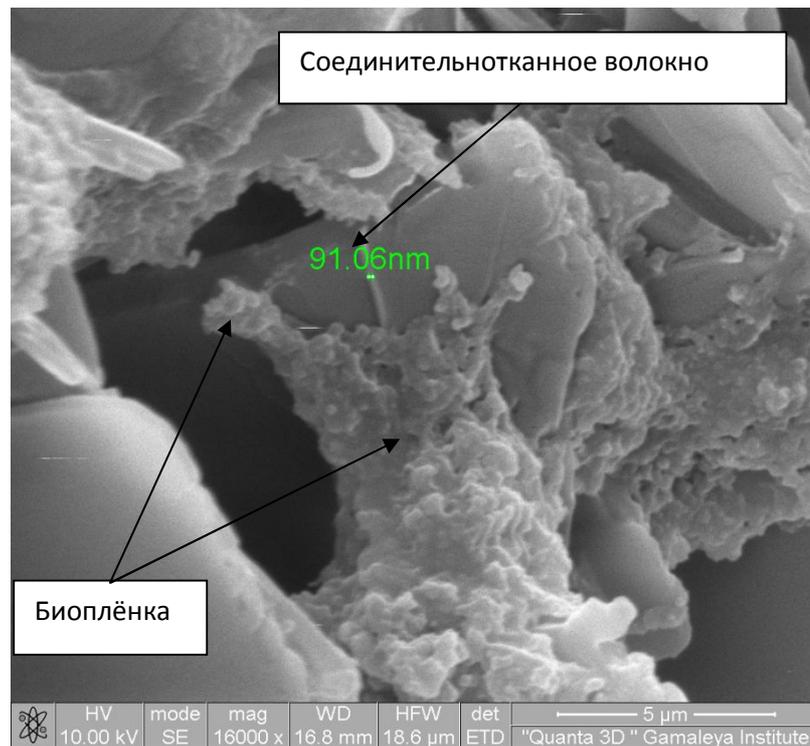


Рисунок 33 – Соединительнотканные волокна и биоплёнка с бактериями

Во всех образцах были обнаружены биоплёнки, представляющие собой мукополисахаридный матрикс с бактериальными клетками. Было отмечено, что матрикс интенсивнее формировался в непосредственной близости от соединительнотканых тяжей. Возможно, это связано с химической структурой последних, так как азот, сера и фосфор являются источниками питания для микроорганизмов. Биоплёнки располагались как на поверхности конкремента, так и внутри, причём внутри было обнаружено большее количество вегетирующих микроорганизмов. Вопрос о том, каким образом микроорганизмы попали внутрь конкремента, на сегодняшний день всё ещё остаётся открытым, но это можно представить следующим образом. Бактерии могли попасть внутрь конкремента либо в процессе литогенеза, постепенно адгезируясь на поверхности формирующегося конкремента, а затем обрастали всё новыми слоями холестерина, либо посредством щелевидных отверстий, обнаруженных на поверхности конкремента, размером до 3 мкм, которые ведут внутрь камня. Внутри камень кристаллоподобной структуры, что создаёт внутренние пространства, которые являются местом усиленной колонизации этих бактерий

(рисунки 34 и 35). По-видимому, внутри конкремента создаются более благоприятные условия для существования микроорганизмов, так как им проще прикрепиться к субстрату внутри камня, а не на наружной поверхности, где присутствует ток желчи, который механически «смывает» микробные тела. Кроме того, внутри конкремента бактерии физически менее доступны для антибактериальных химиопрепаратов и фагоцитов.

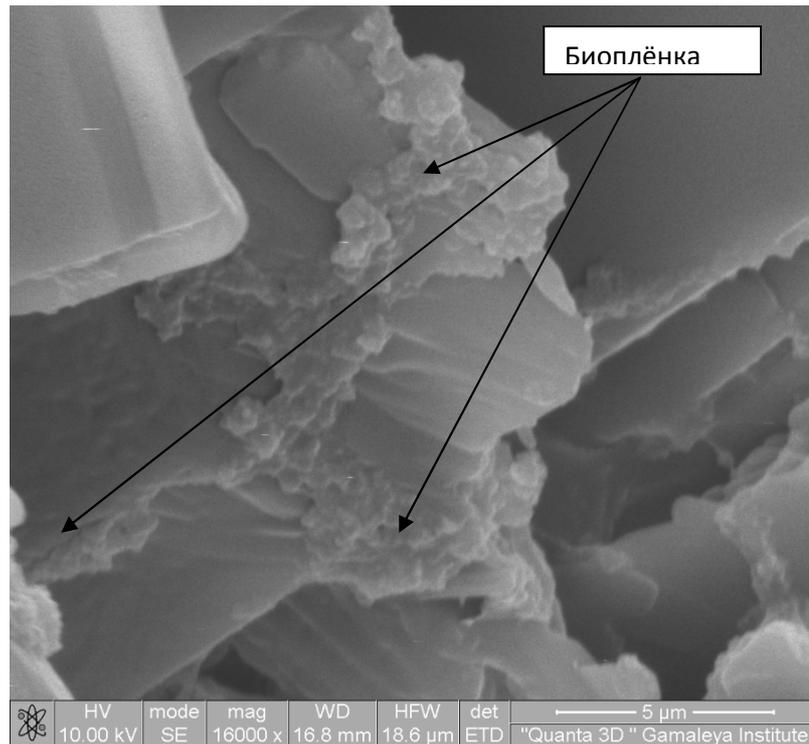


Рисунок 34 – Микробная биоплёнка на поверхности конкремента

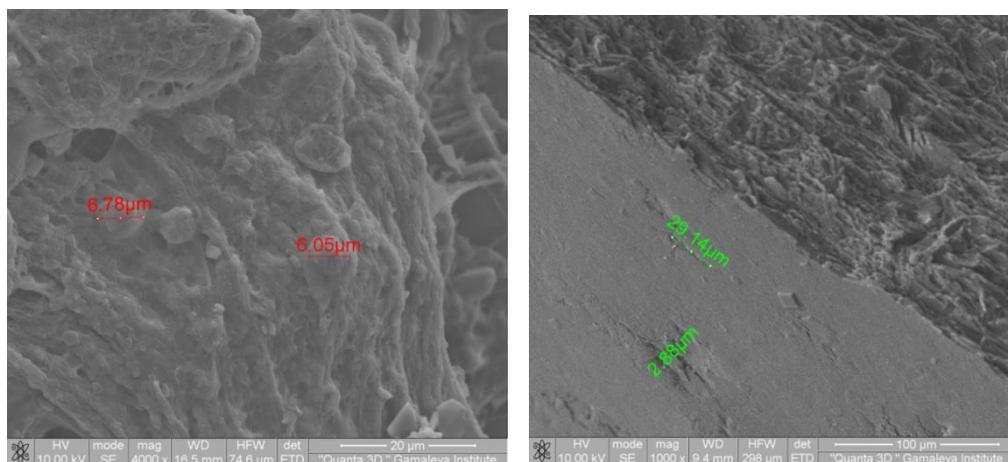
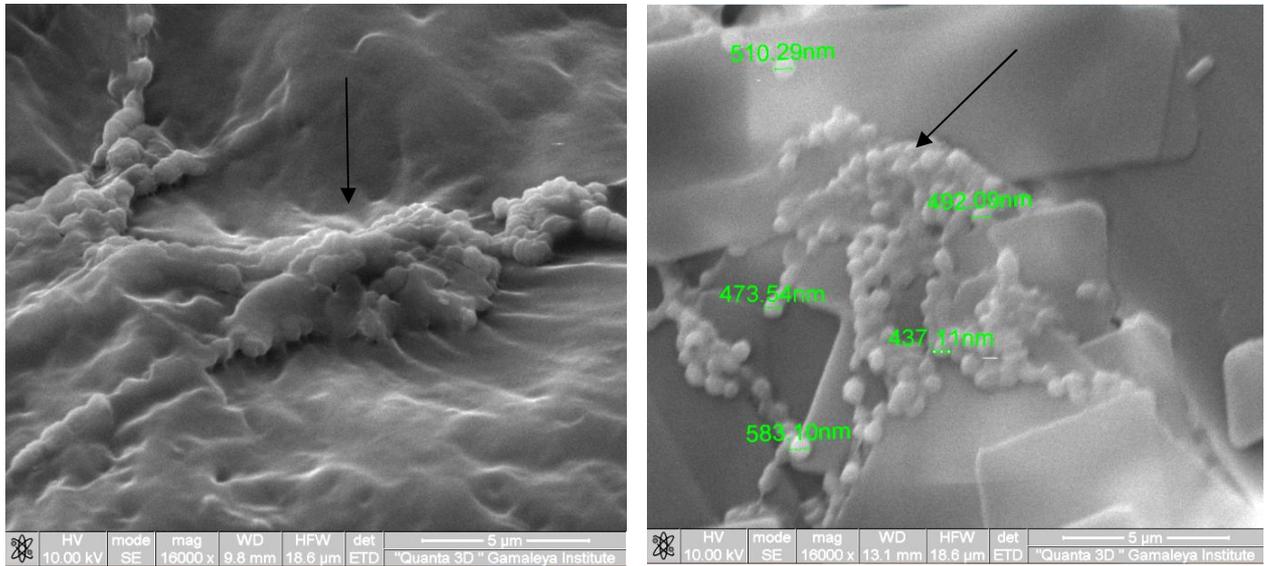


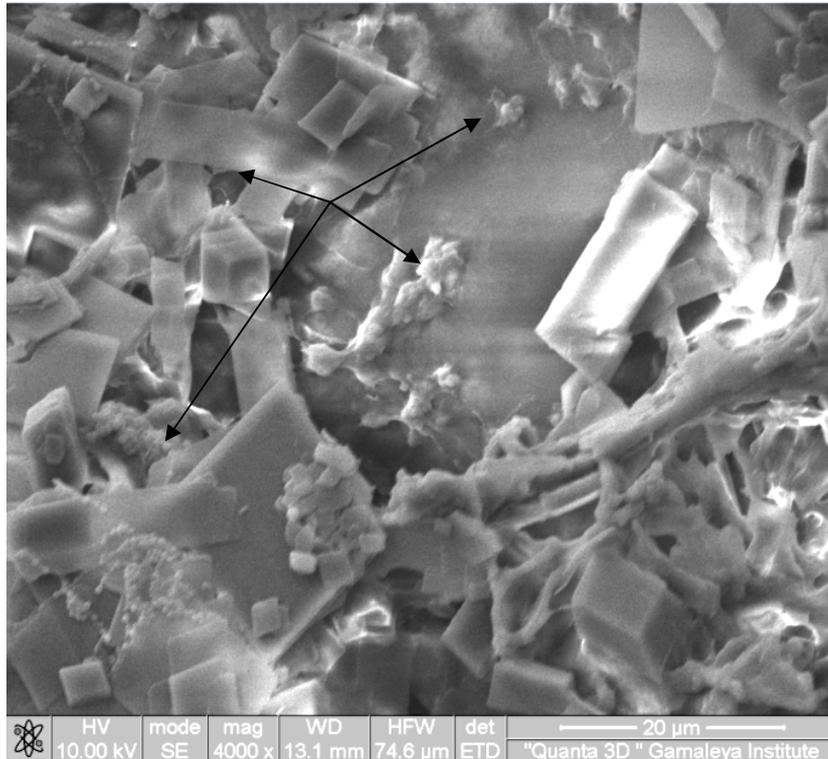
Рисунок 35 – Визуализация фибробластов среди массива соединительной ткани и отверстий на наружной поверхности камня

На поверхности скола желчного камня было выявлено множество вегетативных форм бактериальных клеток. Бактериальные биоплёнки локализовались на поверхности кристаллоподобных структур и между ними в свободных пространствах (рисунки 36 и 37).



Биоплёнка

Кокковидные бактерии



Кристаллоподобные структуры

Рисунок 36 – Визуализация вегетативных форм и биоплёнки на поверхности скола желчного конкремента

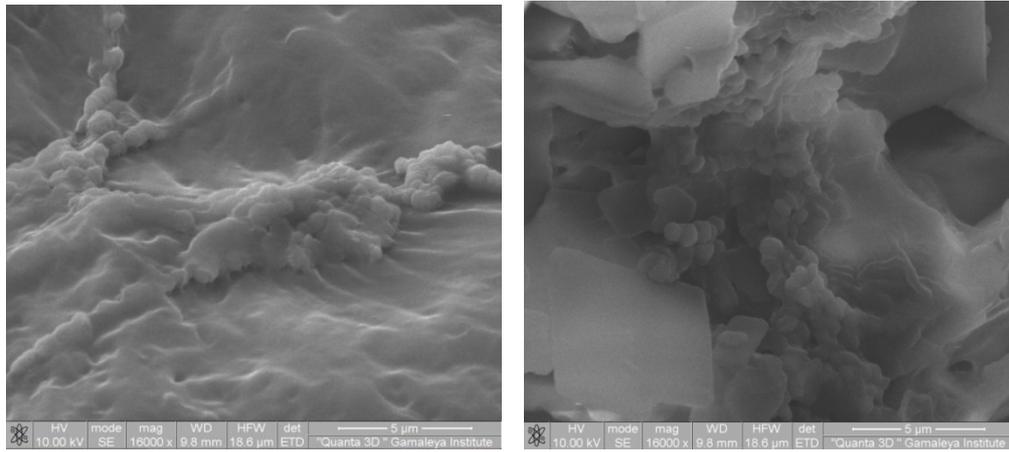


Рисунок 37 – Визуализация бактериальной биоплёнки внутри конкремента

Наличие биоплёнок на поверхности и внутри желчных конкрементов создаёт все необходимые условия для поддержания хронического инфекционного процесса в желчном пузыре. Даже у бессимптомных камненосителей это создаёт постоянную угрозу развития острого инфекционного процесса при изменении некоторых условий, например, при иммунодепрессии или возрастании концентрации питательных веществ для бактерий. Также биоплёнки являются причиной развития инфекционных осложнений при выполнении экстракорпоральной ударноволновой литотрипсии, так как бактериальные биоплёнки под действием ударной волны или ультразвука разрываются, что приводит к распространению микробных тел и обсеменению окружающих тканей микробными эмболами с последующим образованием биоплёнок в местах отсевов. Кроме того, на сегодняшний день воздействие ультразвука на микробные биоплёнки остаётся до конца не изученным, что создаёт дополнительные опасности.

Таким образом, все вышеперечисленные факты ещё раз подтверждают общепринятую тактику в отношении больных желчнокаменной болезнью вне зависимости от клинических проявлений. Всем пациентам при обнаружении холецистолитиаза должна быть рекомендована операция холецистэктомия, так как только это может обеспечить практически полную санацию.

Также для исключения возможности инфекционных осложнений особое внимание следует уделить антибиотикопрофилактике даже при хронических

формах холецистита. Желательно, чтобы подбор антибактериального химиотерапевтического препарата осуществлялся не эмпирически, а с учётом природной антибактериальной чувствительности разных видов бактерий, данные о которых можно получить, исследуя на дооперационном этапе кровь, а удалённые конкременты, пузырную желчь и биоптат стенки желчного пузыря – в ранние сроки после операции при помощи экспресс-метода газожидкостной хромато-масс-спектрометрии.

При исследовании в дегидратированных образцах было обнаружено изменение структуры биоплёнки: она уменьшилась в размерах, появились округлые дефекты, единичные бактерии. Соединительная ткань стала более рельефной, хотя и дегидратировалась, но в меньшей степени, чем биоплёнка, что подтверждает мукополисахаридную природу последней. Также изменилась структура конкремента, что обусловлено дегидратацией холестерина (рисунки 38 и 39).

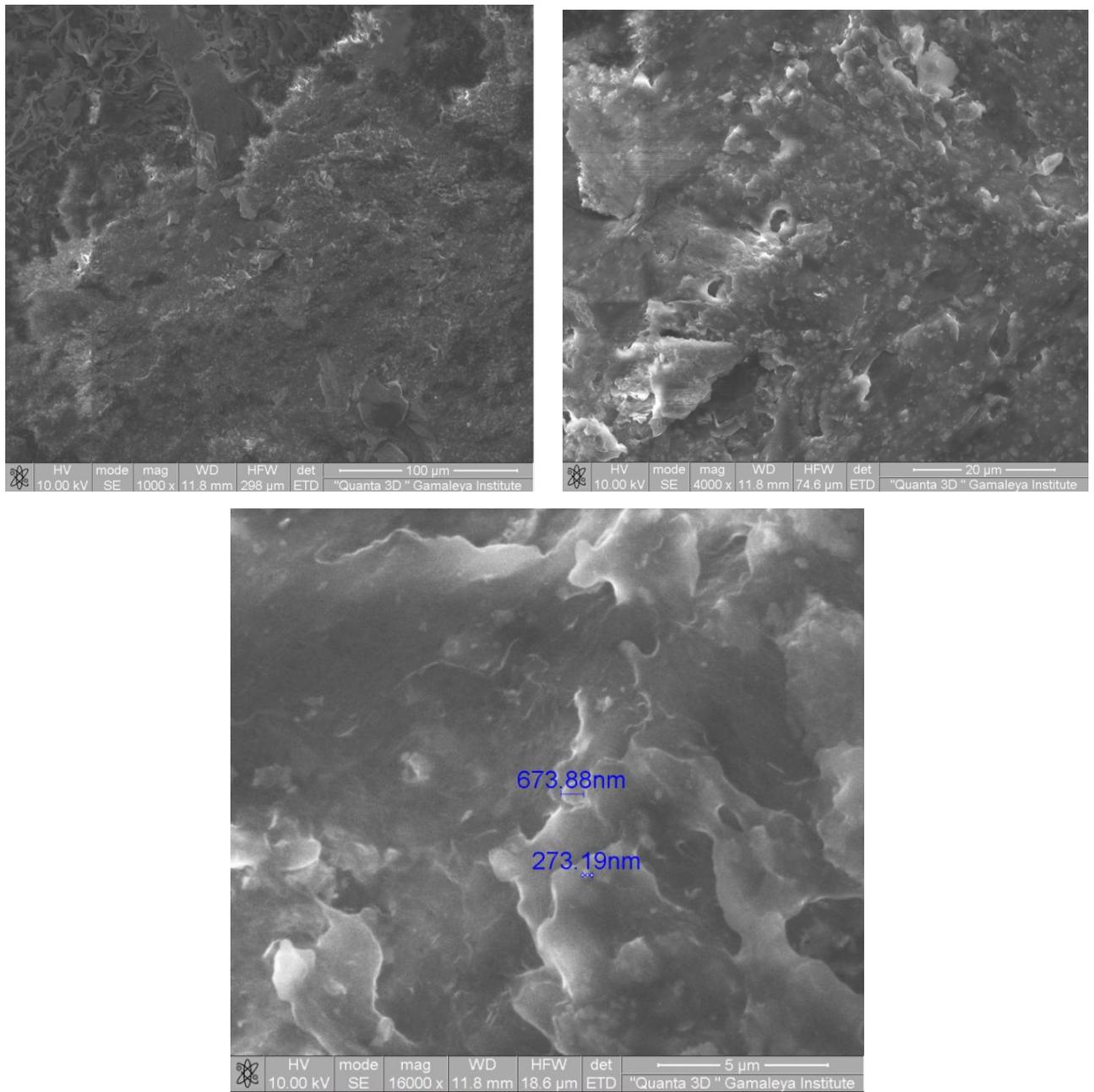
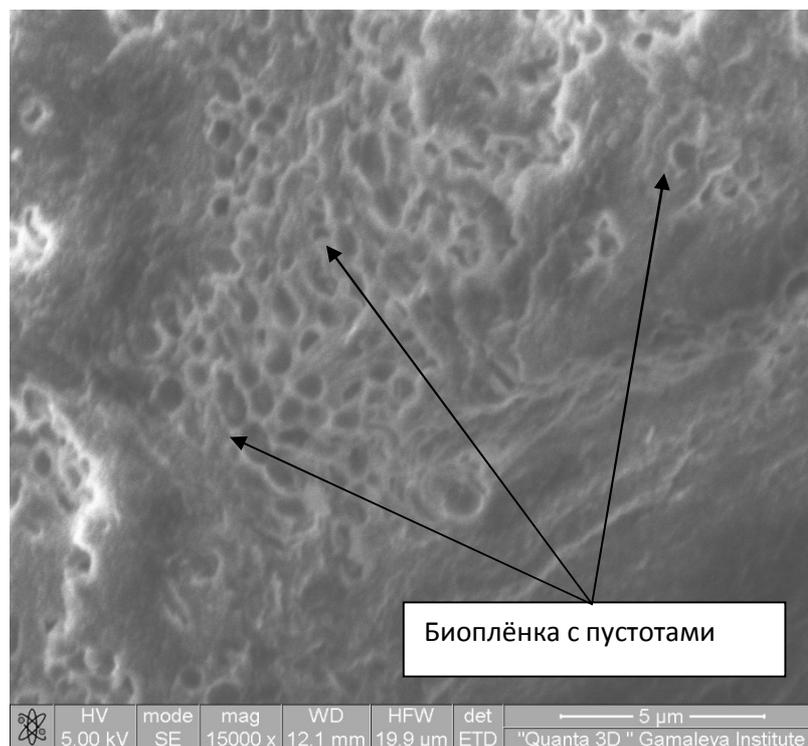


Рисунок 38 – Визуализация соединительной ткани и биоплёнки с бактериями после дегидратации



Рисунки 39 – Поверхность конкремента после обработки спиртом.

Виден полуразрушенный матрикс с пустотами

Исследование эпителиальной выстилки желчного пузыря (рисунки 40 и 41) и общего желчного протока также показало наличие бактериальных биоплёнок (рисунок 42). Кроме того, на поверхности слизистой желчного пузыря визуализируются кристаллоподобные структуры холестерина, которые плотно адгезированы к слизистой оболочке желчного пузыря.

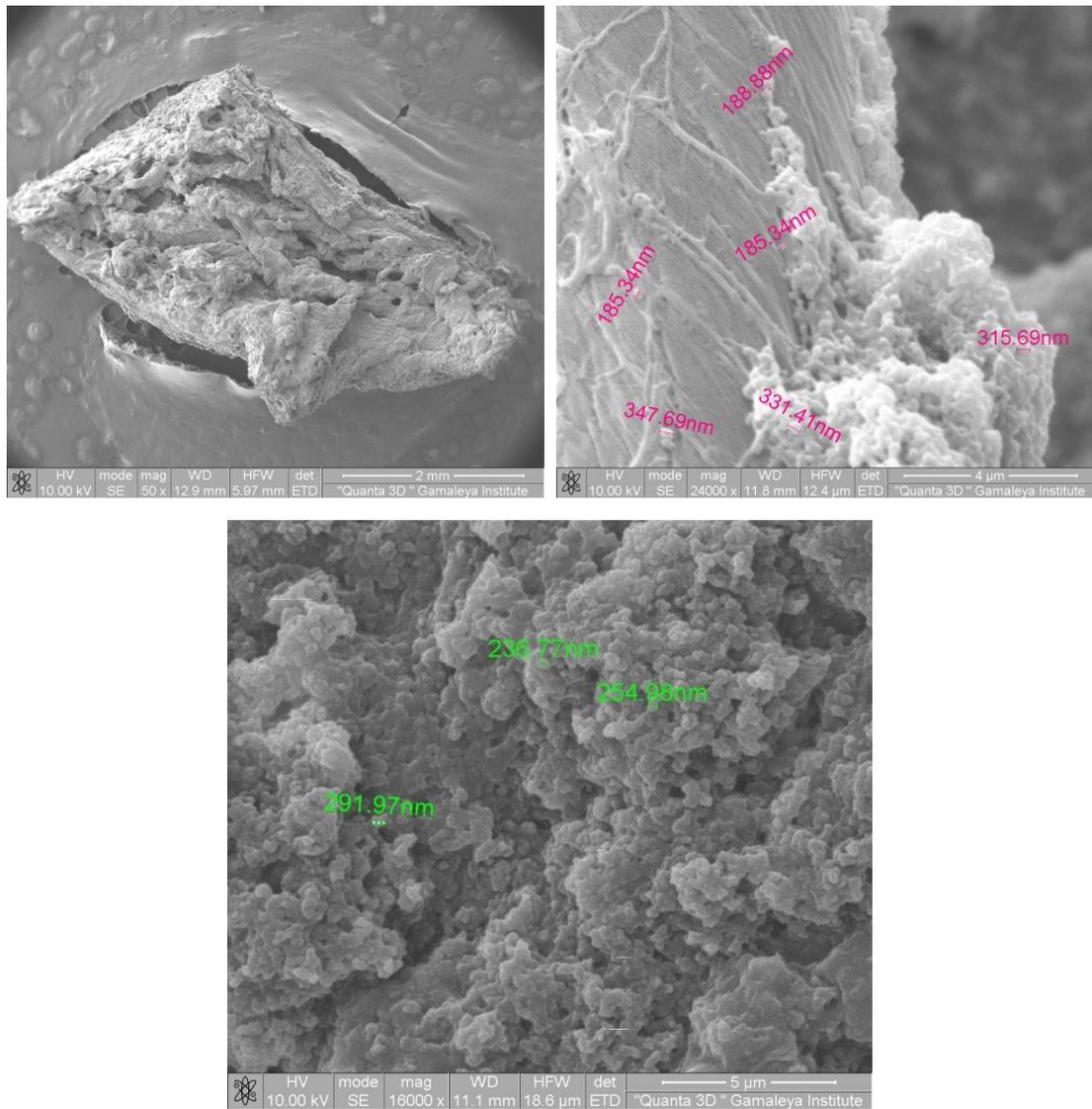


Рисунок 40 – Внутренняя поверхность желчного пузыря. Визуализация соединительнотканых тяжей и биоплёнки с микроорганизмами

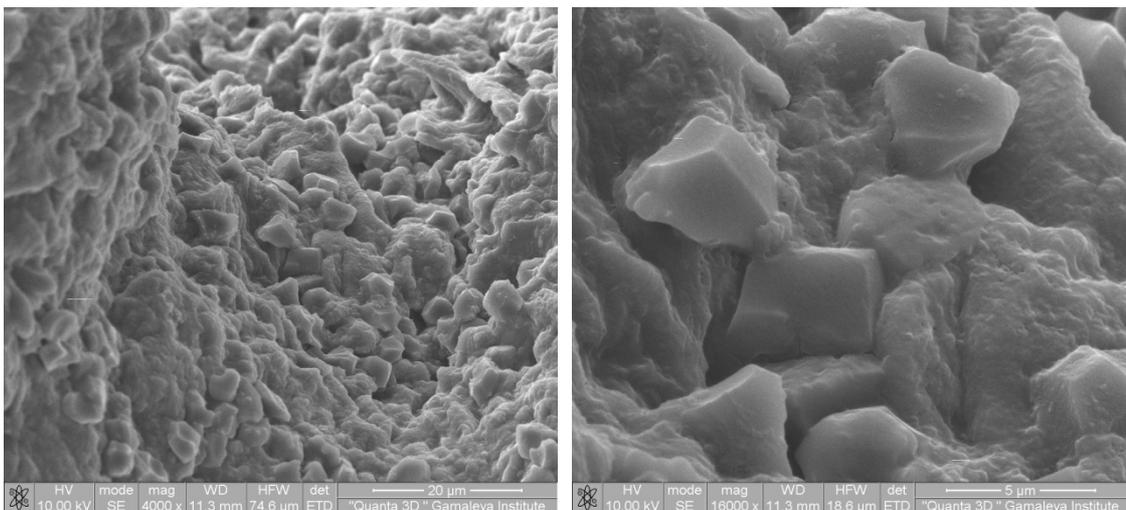


Рисунок 41 – Слизистая оболочка желчного пузыря с фиксированными псевдокристаллами холестерина

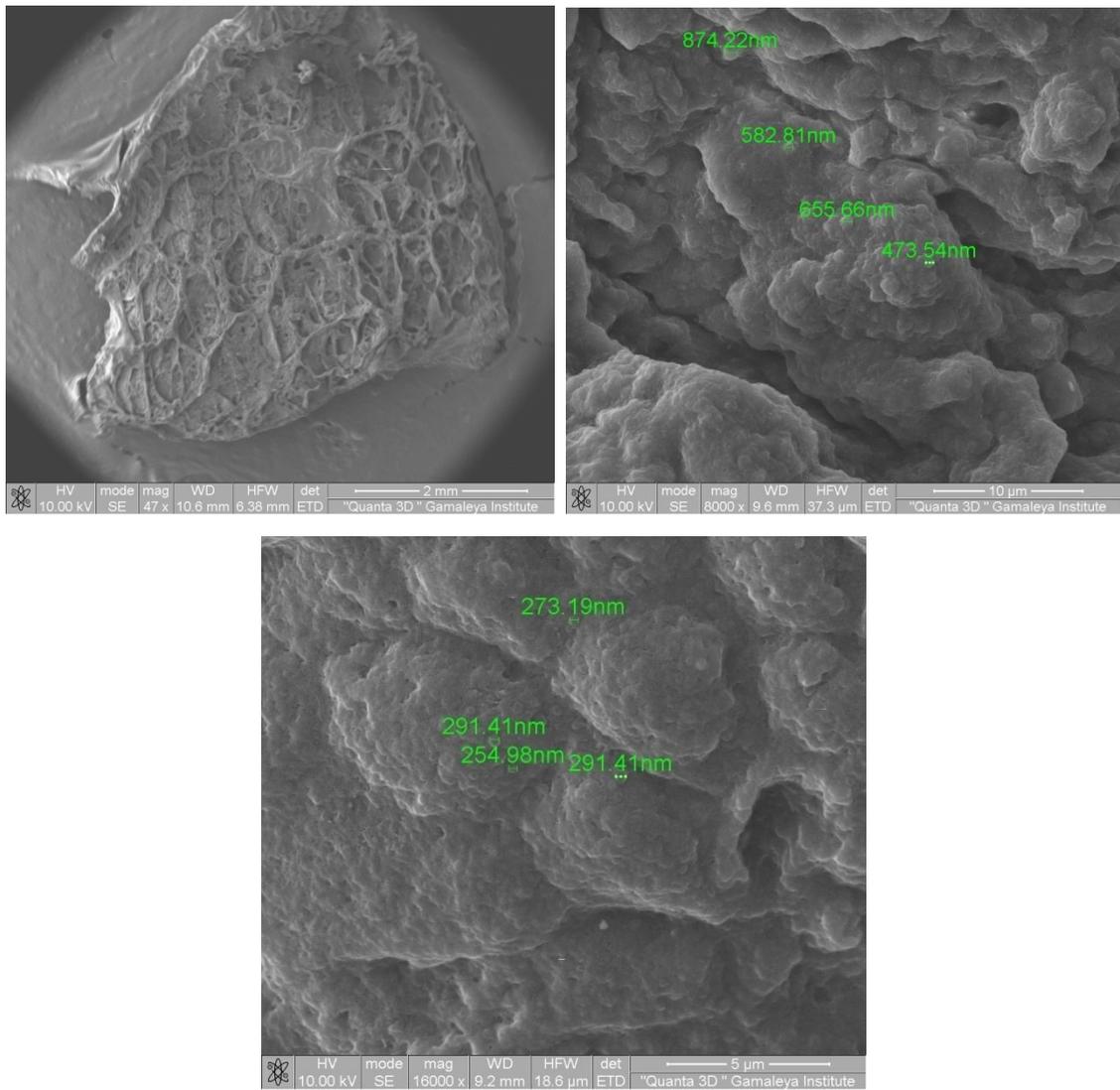


Рисунок 42 – Внутренняя поверхность общего желчного протока.

Визуализация биоплёнки с микроорганизмами

Таким образом, подавляющее большинство желчных конкрементов относятся к холестериновым, а процесс камнеобразования носит длительный и этапный характер. Тела микроорганизмов могут быть центрами кальцинирования.

Соединительнотканые волокна, распространяющиеся в разных направлениях и непосредственно связывающие поверхность желчного конкремента с тканями внутренней поверхности желчного пузыря, образуются в результате постоянного механического травмирования слизистой желчного пузыря острыми рельефами поверхностей конкрементов. Эти волокна служат хорошим субстратом для образования бактериальных биоплёнок, так как в своём химическом составе содержат азот, серу и фосфор, которые являются

питательной базой для бактерий.

Бактериальные биоплёнки располагаются не только на поверхности, но и внутри конкрементов, причём даже в большей степени, что говорит о более благоприятных условиях существования внутри конкремента, а не снаружи.

Все больные желчнокаменной болезнью должны быть оперированы, так как носят на камнях массу неактивных микробных биоплёнок, которые в любой момент могут начать вегетировать, приводя к генерализации инфекции. Экстракорпоральная ударноволновая литотрипсия не может быть рекомендована как метод выбора для лечения желчнокаменной болезни, даже при наличии холестериновых желчных конкрементов, так как при этом внутри желчного пузыря неизбежно останутся фрагменты соединительнотканых тяжей с осколками конкрементов, которые в последующем будут играть роль центров камнеобразования. Ультразвук или ударная волна может послужить толчком для вегетации бактериальных клеток и развития острого инфекционно-воспалительного процесса. Единственным радикальным методом лечения, позволяющим санировать основную массу биоплёнок, является холецистэктомия, но даже при хроническом калькулёзном холецистите необходима антибиотикопрофилактика, а в случае острого калькулёзного холецистита с перивезикальными осложнениями – целевая этиотропная антибиотикотерапия.

Таким образом, в результате проведённого исследования было доказано наличие на поверхности желчных камней и внутри него бактериальной микрофлоры. Следует подчеркнуть, что значительно больше бактерий выявлялось внутри камня, подавляющее большинство из которых составляли вегетативные формы. Биоплёнки преимущественно локализовались на поверхности камня, что, очевидно, связано с неблагоприятным воздействием желчи на бактерии, а экзоклеточный матрикс биоплёнки является защитным барьером от внешней агрессивной среды для бактерий.

Наличие соединительнотканых волокон на поверхности камня указывает на пролиферацию фибробластов на поверхности камня и формирование коллагеновых волокон, которые могут фиксировать конкремент в полости

желчного пузыря. В свою очередь, соединительнотканые волокна являются объектом колонизации со стороны бактерий и формирования на них биоплёнки.

Обнаружение бактериальных биоплёнок, связанных с поверхностью эпителиальной выстилки желчных протоков, указывает на их сохранение в протоках после операции холецистэктомии и соответственно сохранение потенциальной угрозы развития послеоперационных неблагоприятных состояний, осложнений и могут являться одним из дискуссионных до сих пор, этиологических факторов развития патологического симптомокомплекса после холецистэктомии, а именно в раннем послеоперационном периоде – инфекционно-воспалительных осложнений, в отдалённом периоде – рецидивного холангиолитиаза, холангита.

На основании данных, полученных в настоящем исследовании, можно говорить об активации микрофлоры при флегмонозном и гангренозном калькулёзном холецистите, а желчный камень является резервуаром патогенной микрофлоры. Очевидно, что в этом случае антибиотики не способны проникнуть в очаг инфекции (внутрь камня). Кроме этого, бактериальные биоплёнки, локализованные на поверхности камня, устойчивы к действию антибактериальных препаратов. В связи с этим назначение антибиотиков в целях профилактики гнойно-септических осложнений при калькулёзном холецистите не представляется оптимальным для эрадикации патогенной микрофлоры. Поэтому единственно патогенетически обоснованным способом лечения является холецистэктомия. Но при этом больному должна быть назначена целевая антибиотикопрофилактика и антимикробная химиотерапия с учётом чувствительности микроорганизмов.

Следует учитывать колонизацию эпителия слизистой оболочки желчевыводящих путей бактериальными биоплёнками, которые не удаляются при холецистэктомии. В связи с этим необходимо применять антибиотики, сохраняющие высокую концентрацию в желчи, к которым чувствительна микрофлора, персистирующая в желчных протоках.

В настоящее время проводятся многочисленные исследования,

направленные на выяснение причин камнеобразования в желчном пузыре, подавляющее большинство из них сводится к сугубо биохимическим аспектам этого вопроса. Идут дискуссии о повышении литогенности желчи, образовании холестериновых «сладжей» вследствие нарушения обмена холестерина.

В ходе нашего исследования поверхности сколов желчных конкрементов при помощи метода сканирующей электронно-ионной микроскопии в толще конкрементов нами были обнаружены пустоты, по форме и размерам напоминающие бактериальные клетки (рисунок 43).

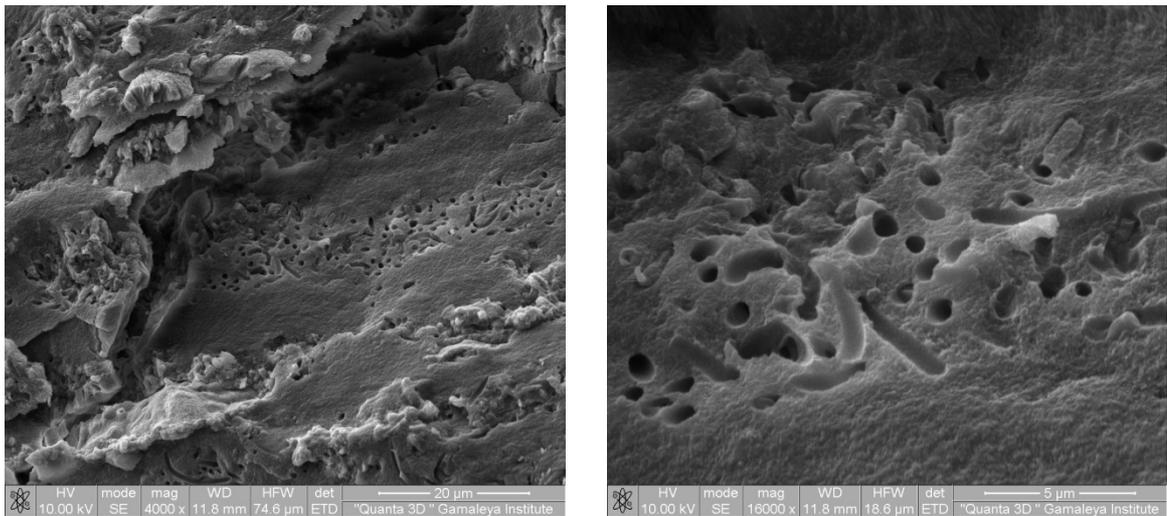


Рисунок 43 – На внутренней поверхности конкремента имеются пустоты-отпечатки, по форме и размеру соответствующие бактериям

Судя по всему, эти пустоты-отпечатки ранее были представлены микробными телами, на которые с течением времени наслаивались новые слои холестерина. С окончанием жизненного цикла бактериальные тела элиминировались, оставив на своём месте эти пустоты.

Учитывая тот факт, что желчь практически здоровых людей стерильна, найденные нами пустоты-отпечатки позволяют нам предполагать, что микроорганизмы могут представлять собой центры кристаллизации желчи, вокруг которых позднее формируются желчные конкременты. Полученные нами данные сопоставимы с данными литературы, в которых встречаются экспериментальные исследования, показывающие роль сальмонелл в патогенезе желчнокаменной болезни (Л. В. Диденко и соавт., 2009).

ГЛАВА 5 ОПТИМИЗАЦИЯ ЛЕЧЕБНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ ПРИ КАЛЬКУЛЁЗНОМ ХОЛЕЦИСТИТЕ

5.1 Повышение эффективности лечения больных калькулёзным холециститом

На основании полученных результатов при проведении бактериологического метода, газожидкостной хромато-масс-спектрметрии пациенты 4-й и 6-й групп получали целевую антимикробную химиотерапию.

У 21 пациента 3-й группы применялись следующие антимикробные химиопрепараты и их комбинации: защищённые пенициллины, фторхинолоны, цефалоспорины III–IV пок.

У 23 больных 4-й группы применялись цефалоспорины III–IV пок., цефалоспорины III–IV пок. + метронидазол, защищенные пенициллины, фторхинолоны, фторхинолоны + метронидазол, цефалоспорины III–IV пок. + аминогликозиды, фторхинолоны + аминогликозиды, макролиды + цефалоспорины III–IV пок., макролиды + аминогликозиды, макролиды + метронидазол, линкозамиды + аминогликозиды, линкозамиды + фторхинолоны, линкозамиды + цефалоспорины III–IV пок., тетрациклины + аминогликозиды, тетрациклины + фторхинолоны, тетрациклины + метронидазол.

У 38 пациентов 5-й группы были использованы цефалоспорины III–IV пок., цефалоспорины III–IV пок. + метронидазол, защищенные пенициллины, фторхинолоны, фторхинолоны + метронидазол.

У 40 больных 6-й группы применялись фторхинолоны, фторхинолоны + аминогликозиды, фторхинолоны + метронидазол, защищенные цефалоспорины + аминогликозиды, защищенные цефалоспорины, защищенные пенициллины + аминогликозиды, защищенные пенициллины, цефалоспорины III–IV пок. + метронидазол, цефалоспорины III–IV пок., цефалоспорины III–IV пок. + аминогликозиды, оксазолидиноны + фторхинолоны, оксазолидиноны + цефалоспорины III–IV пок., оксазолидиноны + метронидазол, карбапенемы,

линкозамиды + аминогликозиды, линкозамиды + фторхинолоны, линкозамиды + цефалоспорины III–IV пок., гликопептиды + фторхинолоны, гликопептиды + цефалоспорины III–IV пок., гликопептиды + метронидазол, макролиды + цефалоспорины III–IV пок., макролиды + аминогликозиды, макролиды + метронидазол, тетрациклины + аминогликозиды, тетрациклины + фторхинолоны, тетрациклины + метронидазол.

Кроме того, пациентам 6-й группы на основании полученного коэффициента по результатам газожидкостной хромато-масс-спектрометрии в предоперационном периоде назначалась целевая антимикробная химиотерапия.

В том случае, когда по результатам газожидкостной хромато-масс-спектрометрии крови и испражнений был получен коэффициент (более 0,12), свидетельствующий о желчном пузыре как источнике инфекции, при поступлении пациента в ранние сроки назначалась целевая предоперационная антибиотикотерапия согласно схемам, описанным выше.

На рисунках 44 и 45 отражена динамика среднего количества экв. клеток / г $\times 10^5$ грамположительных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (*Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*) в 3–4-й группах. Норма – 1 750 экв. клеток/г $\times 10^5$.

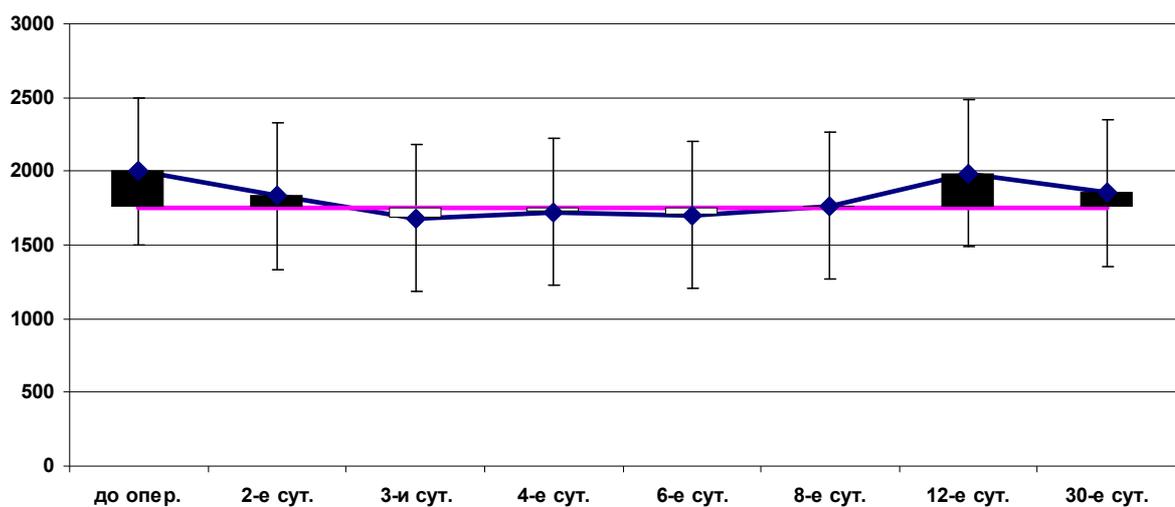


Рисунок 44 – Динамика среднего количества экв. клеток / г $\times 10^5$ грамположительных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов у больных 3-й группы

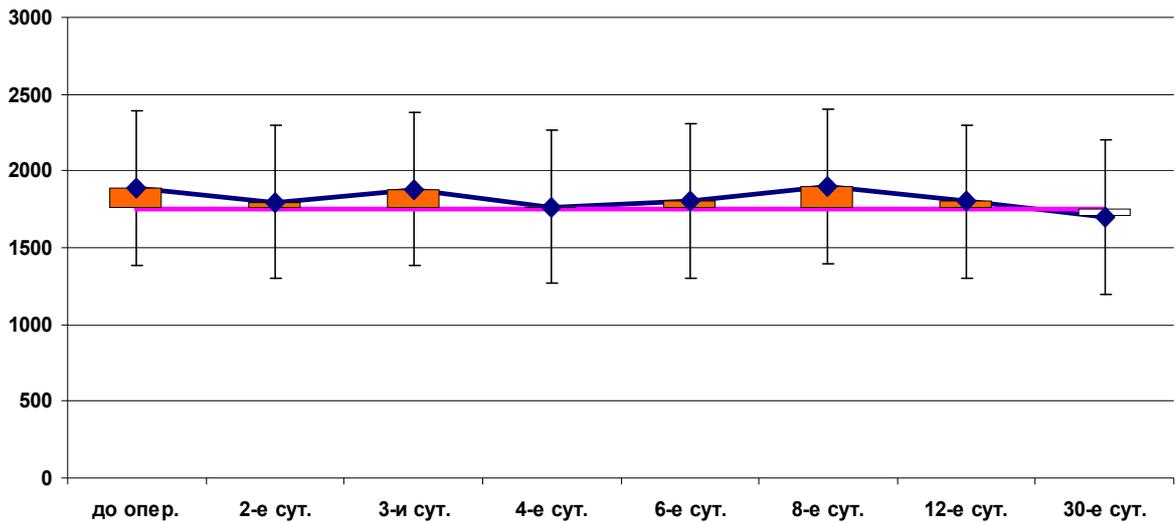


Рисунок 45 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов у больных 4-й группы

На рисунках 46 и 47 отражена динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамотрицательных аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов (*Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.*, *Campylobacter spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*) в 3–4-й группах. Норма – 31 клетка / г × 10⁵.

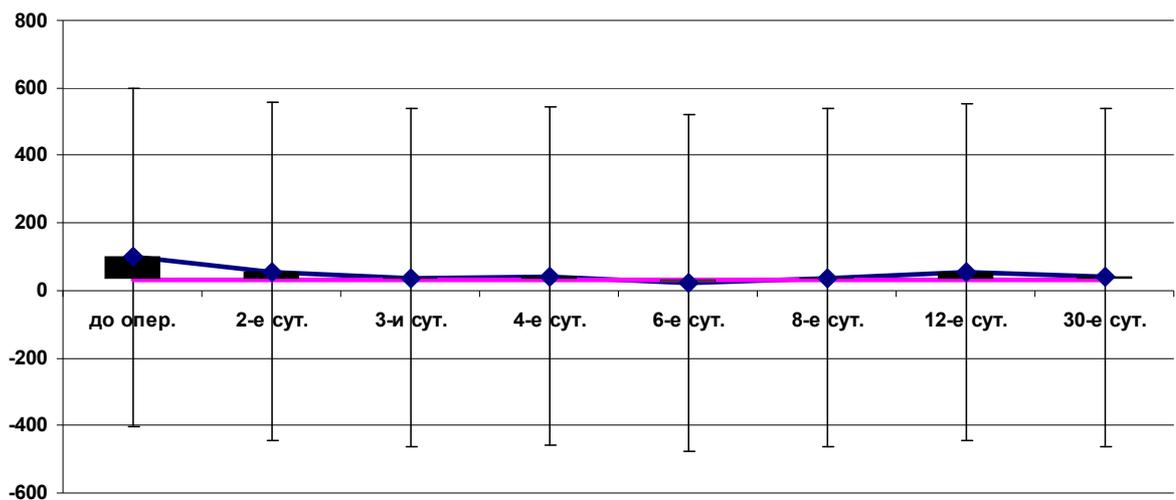


Рисунок 46 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамотрицательных аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов у больных 3-й группы

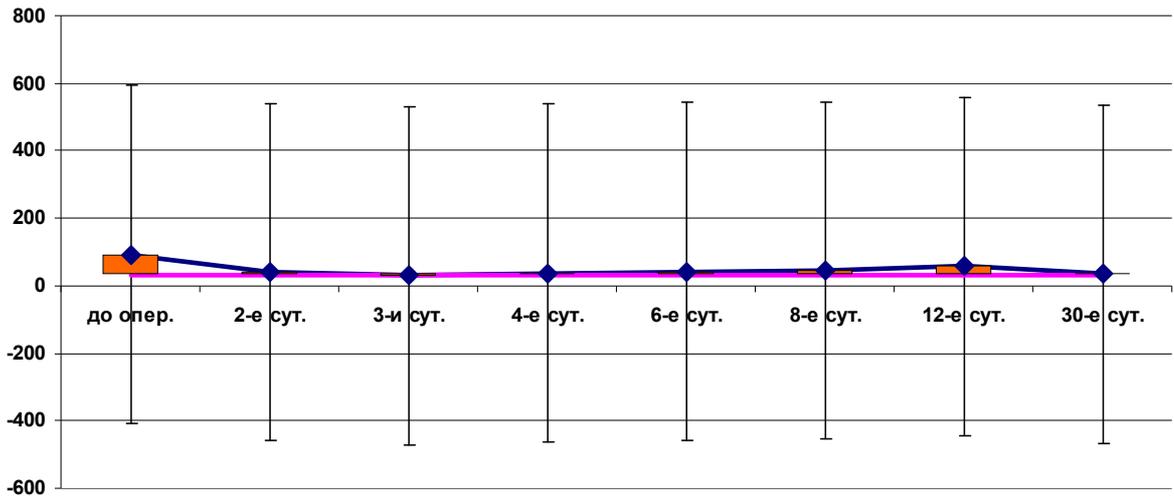


Рисунок 47 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамотрицательных аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов у больных 4-й группы

На рисунках 48 и 49 отражена динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных анаэробных неспорообразующих микроорганизмов (*Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*) в 3–4-й группах. Норма – 2 534 клетки / г × 10⁵.

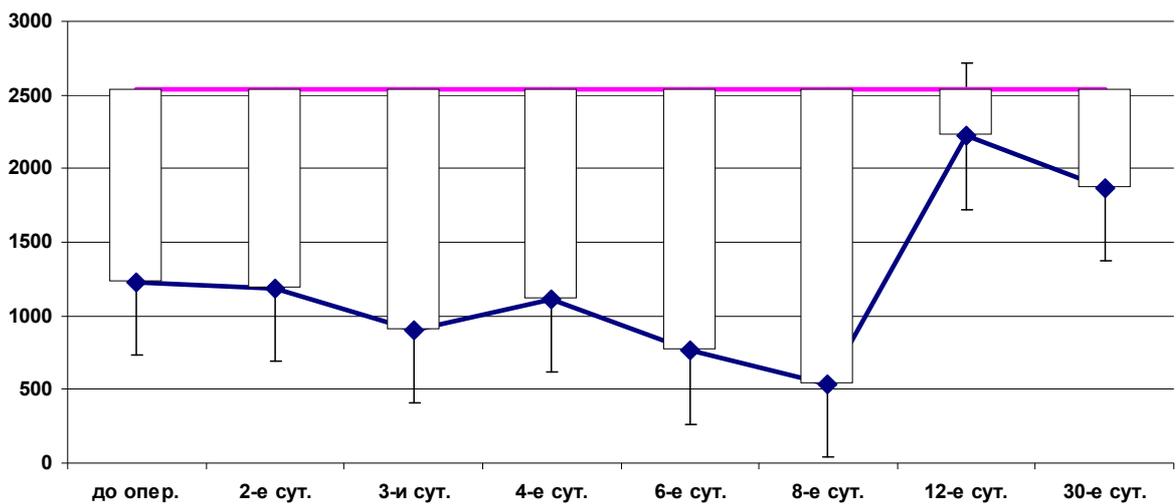


Рисунок 48 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных анаэробных неспорообразующих микроорганизмов у больных 3-й группы

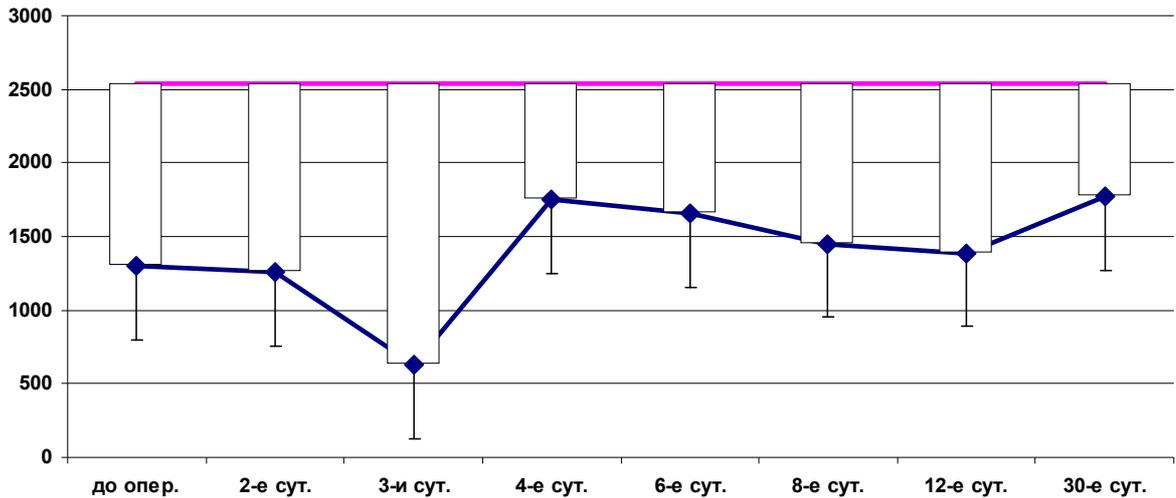


Рисунок 49 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных анаэробных неспорообразующих микроорганизмов у больных 4-й группы

На рисунках 50 и 51 отражена динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных анаэробных спорообразующих микроорганизмов (*Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*) в 3–4-й группах. Норма – 1 710 экв. клеток / г × 10⁵.

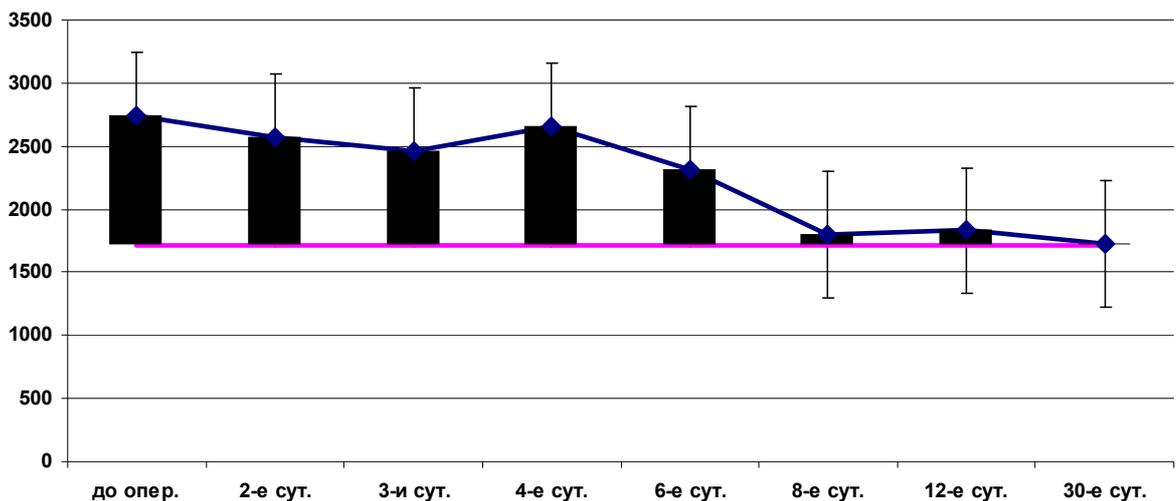


Рисунок 50 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных анаэробных спорообразующих микроорганизмов у больных 3-й группы

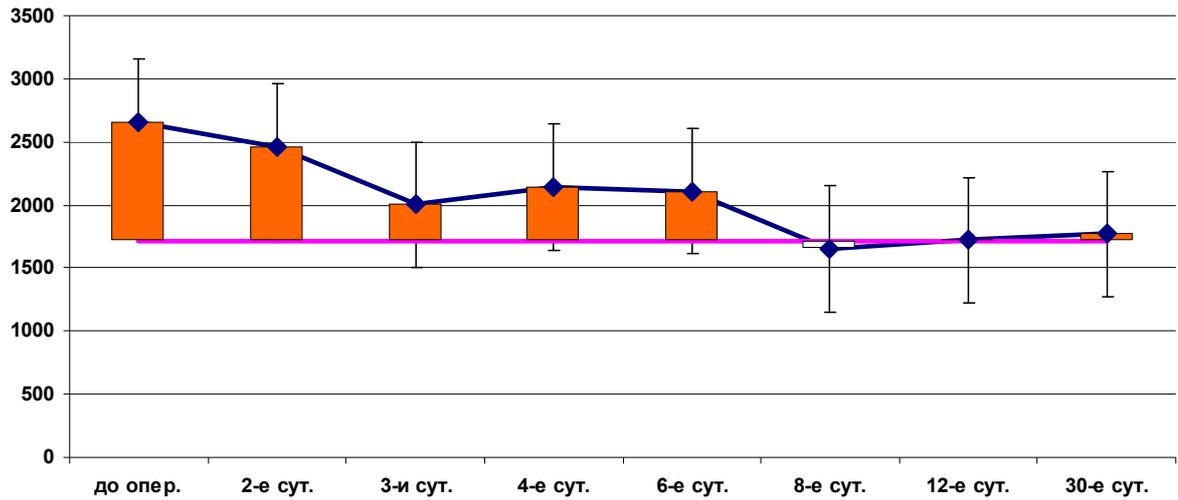


Рисунок 51 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных анаэробных спорообразующих микроорганизмов у больных 4-й группы

На рисунках 52 и 53 отражена динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамотрицательных анаэробных микроорганизмов (*Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides fragilis*) в 3–4-й группах. Норма – 1 769 экв. клеток / г × 10⁵.

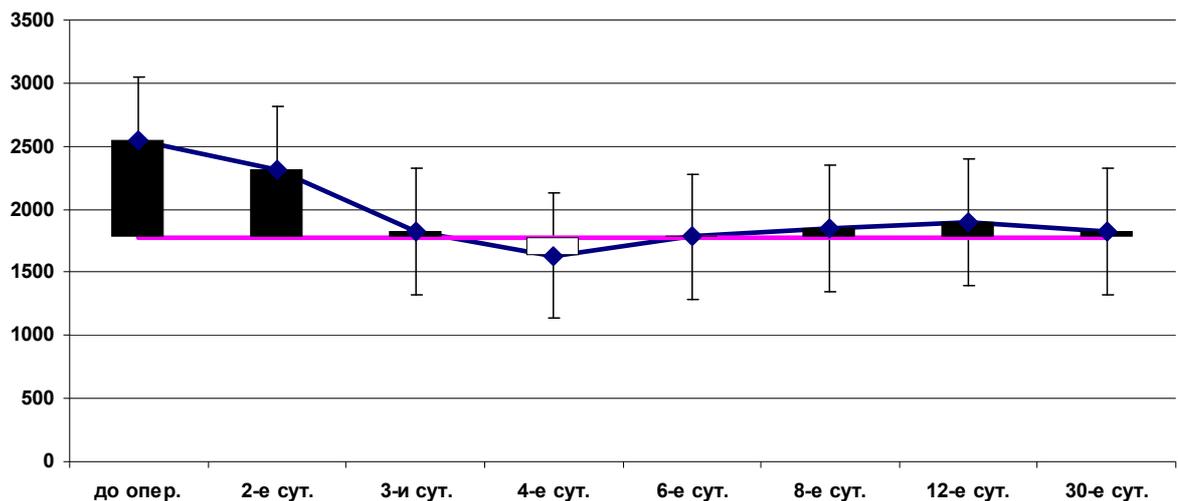


Рисунок 52 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамотрицательных анаэробных микроорганизмов у больных 3-й группы

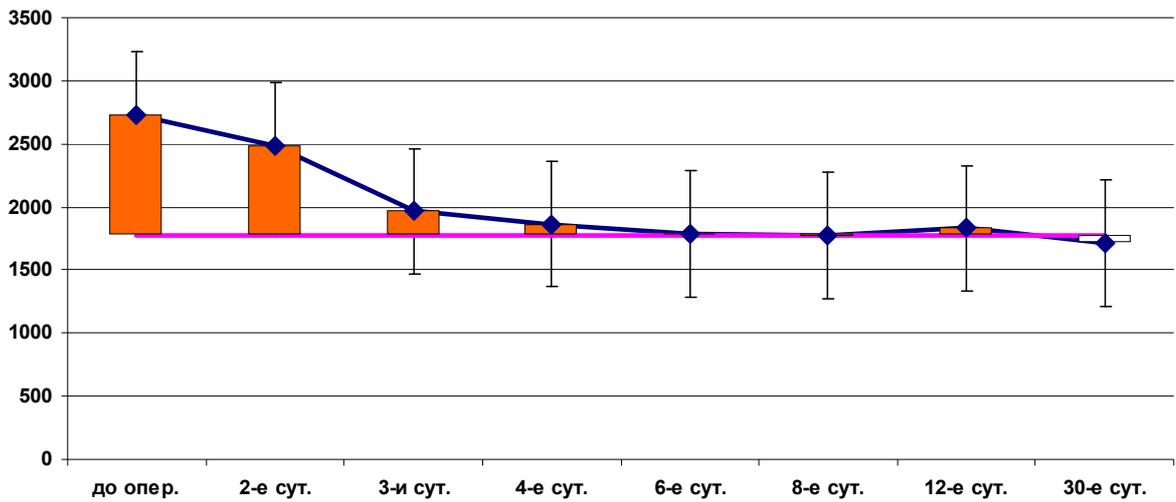


Рисунок 53 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ граммотрицательных анаэробных микроорганизмов у больных 4-й группы

На рисунках 54 и 55 отражена динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (*Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*) в 5–6-й группах. Норма – 1 750 экв. клеток / г × 10⁵.

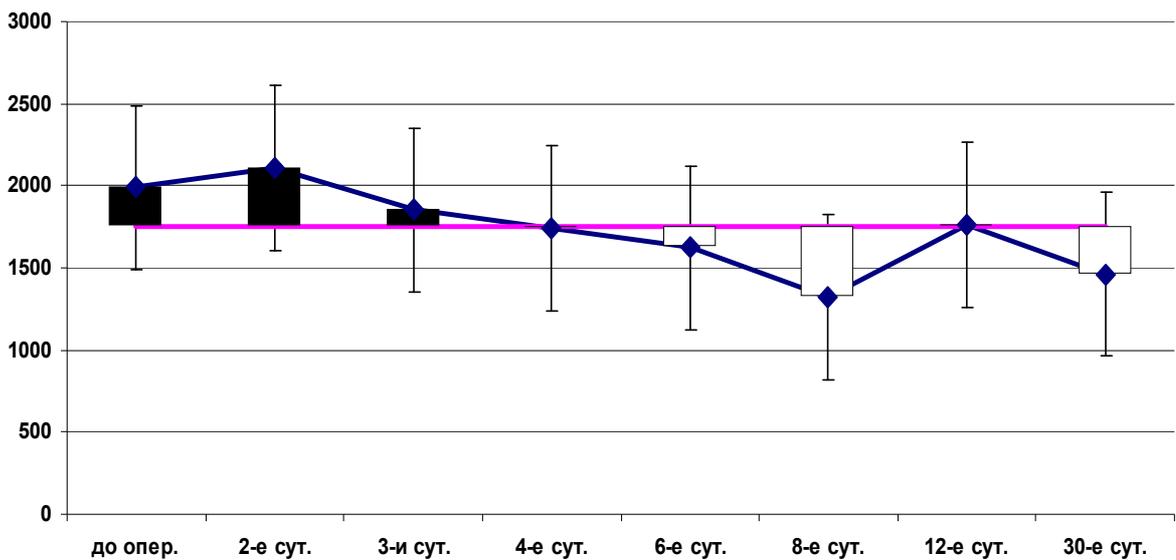


Рисунок 54 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов у больных 5-й группы

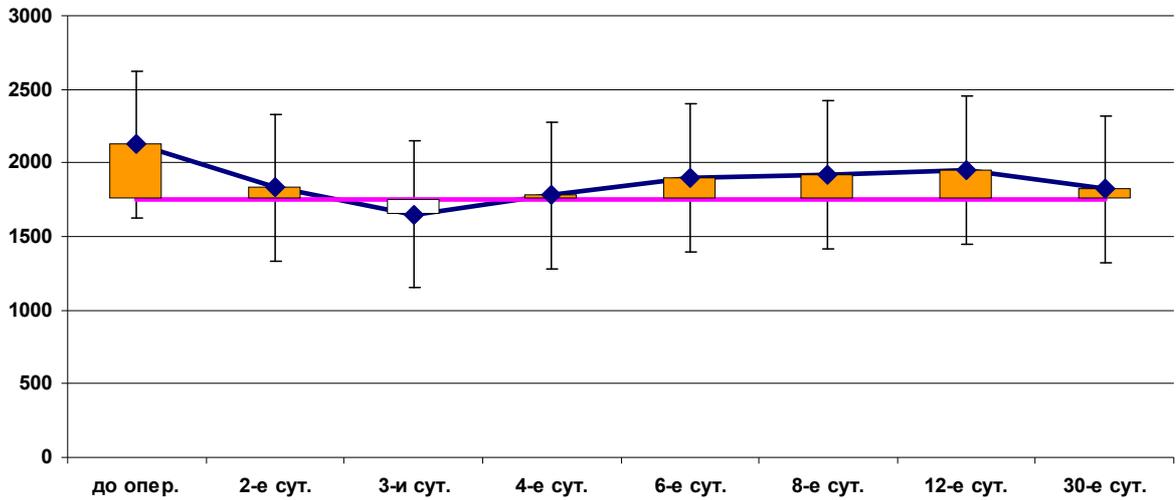


Рисунок 55 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов у больных 6-й группы

На рисунках 56 и 57 отражена динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамотрицательных аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов (*Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.*, *Campylobacter spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*) в 5–6-й группах. Норма – 31 клетка / г × 10⁵.

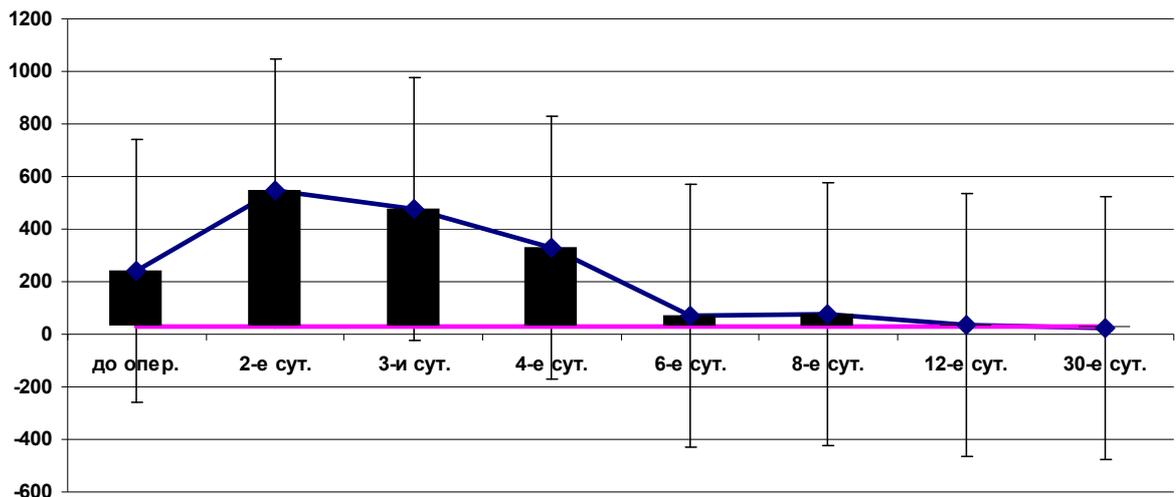


Рисунок 56 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамотрицательных аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов у больных 5-й группы

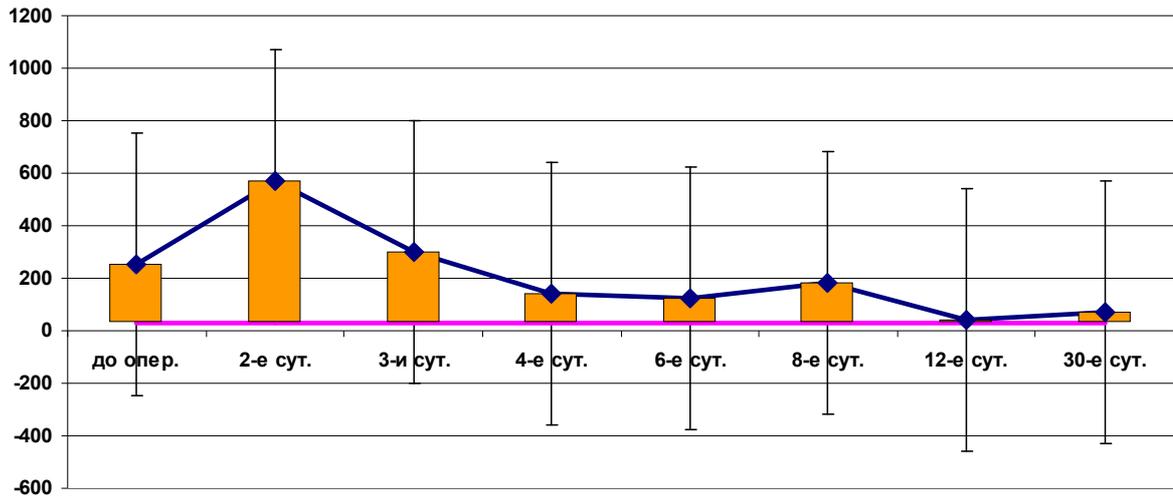


Рисунок 57 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамотрицательных аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов у больных 6-й группы

На рисунках 58 и 59 отражена динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных анаэробных неспорообразующих микроорганизмов (*Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*) в 5–6-й группах. Норма – 2 534 клетки / г × 10⁵.

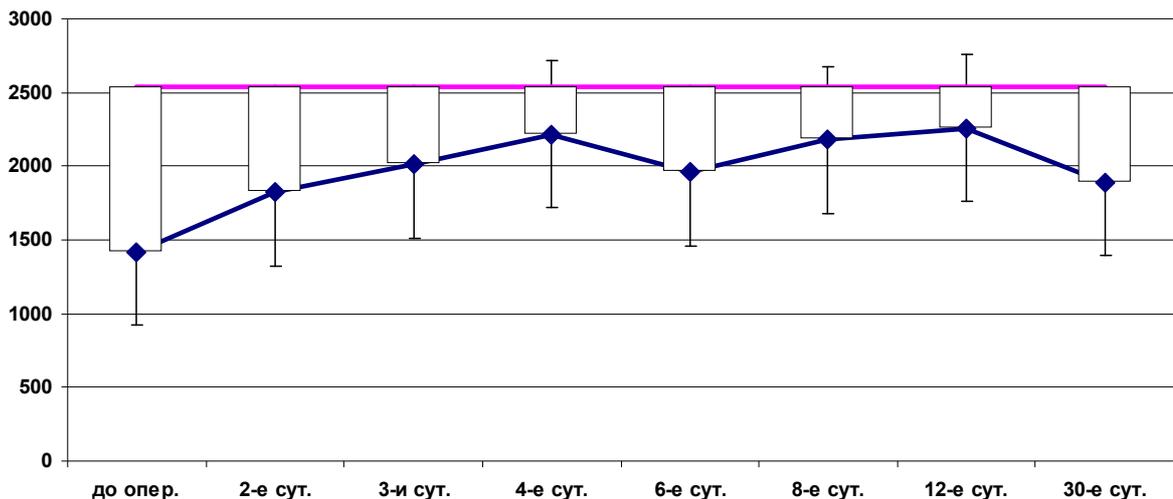


Рисунок 58 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных анаэробных неспорообразующих микроорганизмов у больных 5-й группы

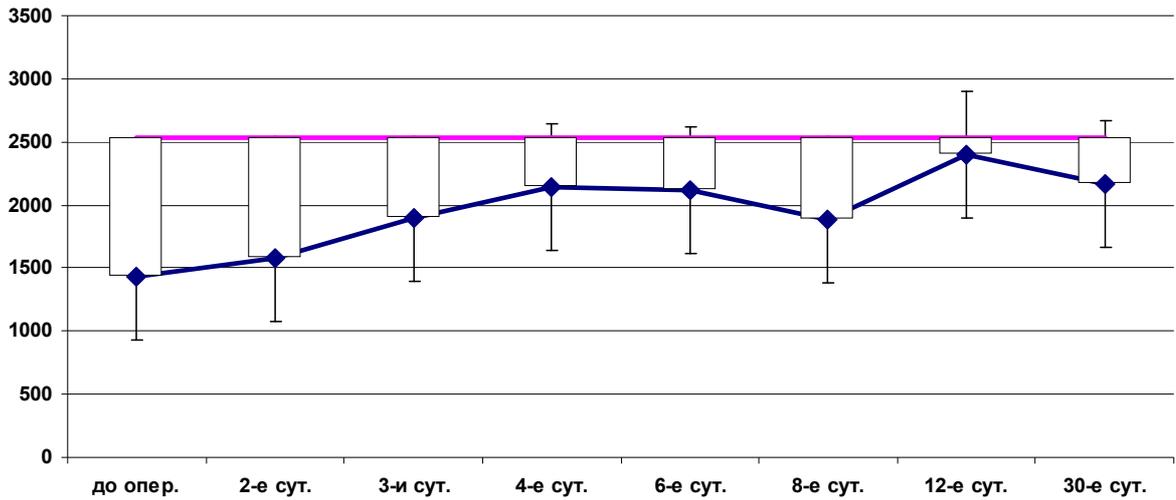


Рисунок 59 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных анаэробных неспорообразующих микроорганизмов у больных 6-й группы

На рисунках 60 и 61 отражена динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных анаэробных спорообразующих микроорганизмов (*Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*) в 5–6-й группах. Норма – 1 710 экв. клеток / г × 10⁵.

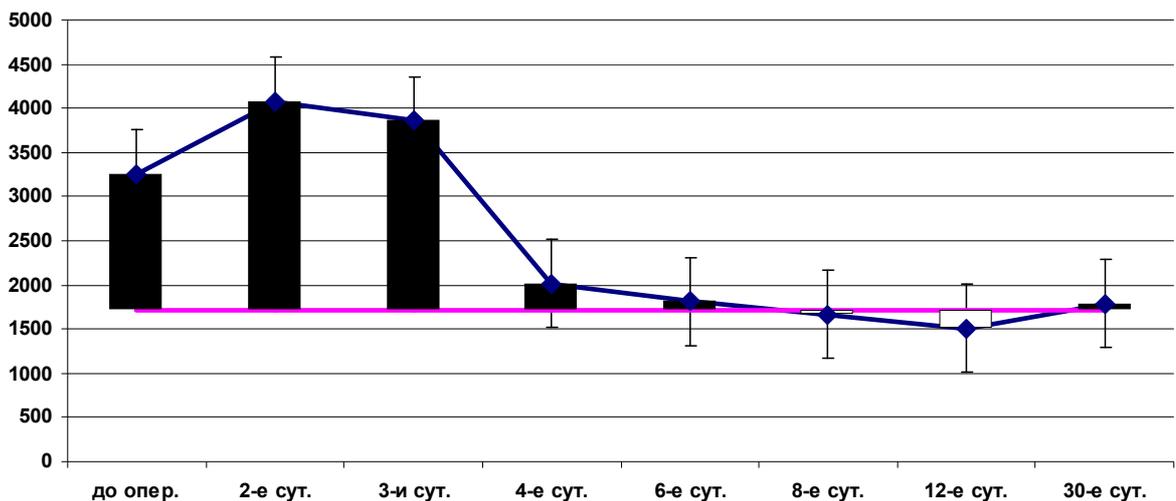


Рисунок 60 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных анаэробных спорообразующих микроорганизмов у больных 5-й группы

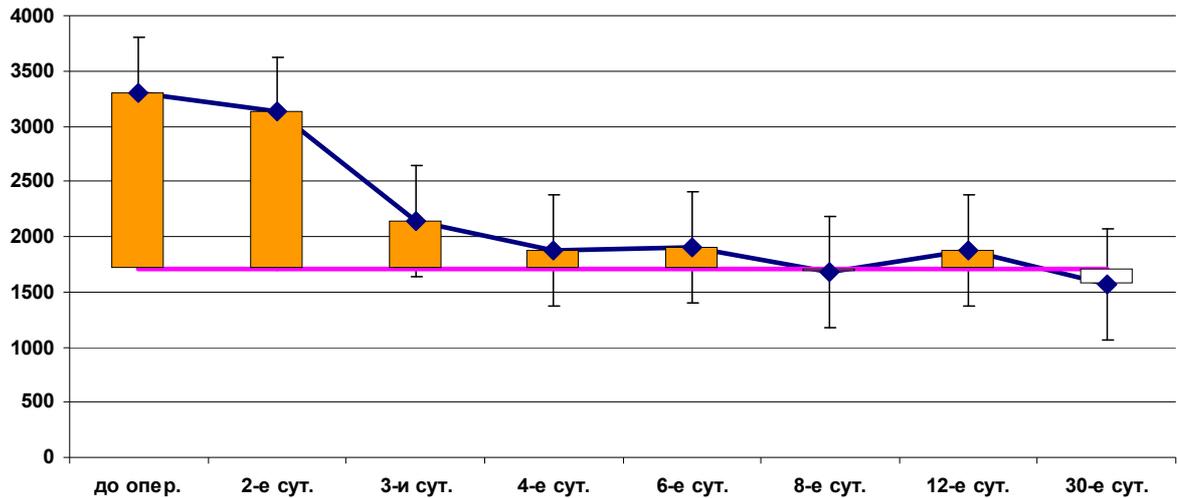


Рисунок 61 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамположительных анаэробных спорообразующих микроорганизмов у больных 6-й группы

На рисунках 62 и 63 отражена динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамотрицательных анаэробных микроорганизмов (*Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides fragilis*) в 5–6-й группах. Норма – 1 769 экв. клеток / г × 10⁵.

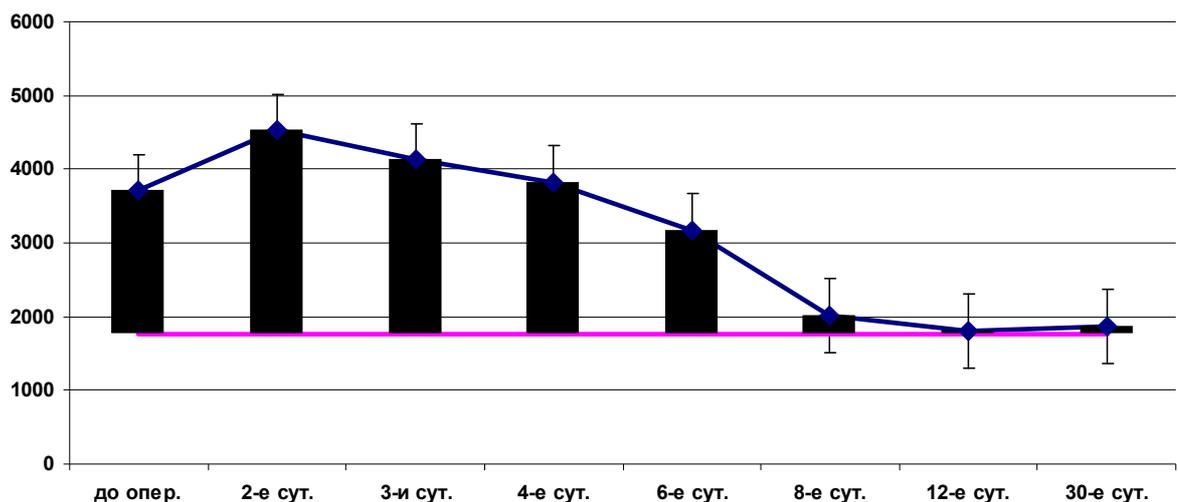


Рисунок 62 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамотрицательных анаэробных микроорганизмов у больных 5-й группы

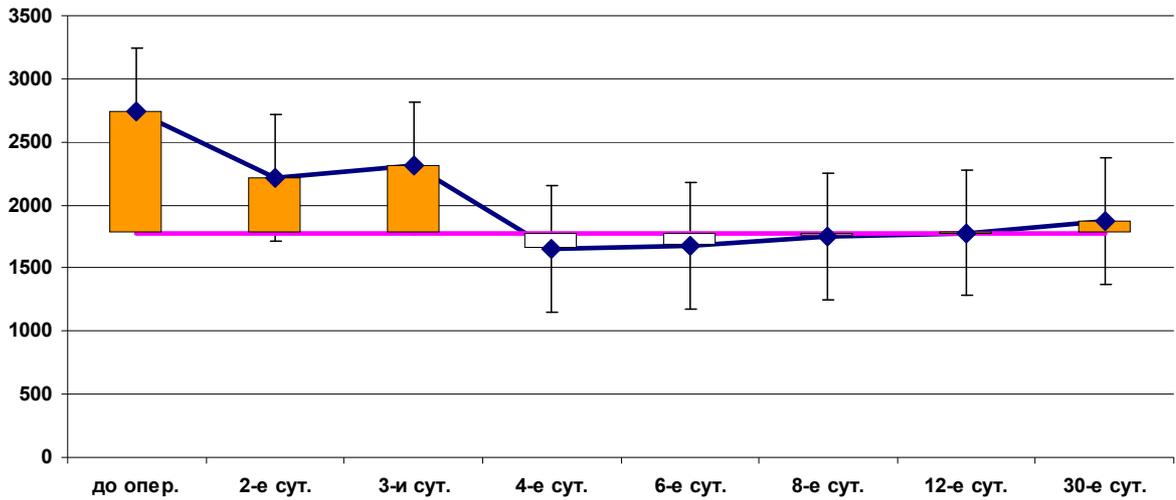


Рисунок 63 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10⁵ грамотрицательных анаэробных микроорганизмов у больных 6-й группы

Проведён анализ результатов детекции микрофлоры отделяемого по дренажам из брюшной полости после холецистэктомии на фоне установки в ложе желчного пузыря гемостатической губки, пропитанной раствором диклофенака натрия, у больных острым калькулёзным холециститом с перивезикальными осложнениями (перивезикальный инфильтрат, перивезикальный абсцесс, абсцесс ложа желчного пузыря), представленный в таблице 22.

Таблица 22 – Результаты детекции микрофлоры отделяемого по дренажам из брюшной полости после холецистэктомии на фоне установки в ложе желчного пузыря гемостатической губки, пропитанной раствором диклофенака натрия

Материал	Время забора	N экв. кл./г × 10 ⁵	Сред. к-во экв. кл./г × 10 ⁵	Крит. значимости	Сред. к-во экв. кл./г × 10 ⁵		Крит. значимости	Сред. к-во экв. кл./г × 10 ⁵		Крит. значимости
			2-я гр.		3-я гр.	4-я гр.		5-я гр.	6-я гр.	
Кровь	до операции	30 300	45 115	$p \leq 0,01$ при $U \leq U_{кр.}$	37 269	37 071	—	42 528	40 033	—
Экссудат	1-е сут.	30 300	38 712	$p \leq 0,05$ при $U \leq U_{кр.}$	53 964	48 258	—	567 245	507 027	—
	5-е сут.	30 300	31 258	—	37 025	33 029	—	401 741	274 502	$p \leq 0,05$ при $U \leq U_{кр.}$
Крит. дост.	—	—	—	—	—	—	—	—	$p \leq 0,05$ при $T \leq T_{кр.}$	—

При анализе результатов детекции микрофлоры отделяемого по дренажам из брюшной полости на 1-е и 5-е сутки послеоперационного периода выявлены статистически значимые различия между показателями количества эквивалент клеток в крови и экссудате у пациентов 2-й группы по сравнению с нормой.

В 6-й группе, по сравнению с 5-й группой, выявлены статистически значимые отличия на 5-е сутки по количеству клеток в экссудате.

Кроме того, у пациентов 6-й группы статистически значимые различия выявлены на 5-е сутки послеоперационного периода по сравнению с 1-и сутками по показателю количества эквивалент клеток в отделяемом по дренажам.

Как видно из таблицы 23, после холецистэктомии из лапаротомного доступа в 5-й группе осложнения (серома послеоперационного рубца, абсцесс послеоперационного рубца, серома ложа желчного пузыря) составили 4 случая (10,5 %), в 6-й группе (серома послеоперационного рубца, серома ложа желчного пузыря) – 2 случая (5 %).

После малоинвазивной холецистэктомии в 5-й группе отмечены такие осложнения, как инфильтрат послеоперационного рубца, серома ложа желчного пузыря – 3 случая (7,9 %), в 6-й группе – инфильтрат послеоперационного рубца – 1 случай (2,5 %).

После лапароскопической холецистэктомии у больных 5-й группы сформировались инфильтрат послеоперационного рубца и абсцесс ложа желчного пузыря – 2 случая (5,2 %), в 6-й группе (серома послеоперационного рубца) – 1 случай (2,5 %).

Таблица 23 – Послеоперационные осложнения у больных 5-й и 6-й групп

Вид доступа	Осложнения после ХЭ	5-я группа (n = 38)	6-я группа (n = 40)
Лапаротомия	Серома п/о рубца	2 (5,3 %)	1 (2,5 %)
	Инфильтрат п/о рубца	—	—
	Абсцесс п/о рубца	1 (2,6 %)	—
	Серома ложа ЖП	1 (2,6 %)	1 (2,5 %)
	Абсцесс ложа ЖП	—	—

Продолжение таблицы 23

Вид доступа	Осложнения после ХЭ	5-я группа (n = 38)	6-я группа (n = 40)
Мини-доступ	Серома п/о рубца	—	—
	Инфильтрат п/о рубца	2 (5,3 %)	1 (2,5 %)
	Абсцесс п/о рубца	—	—
	Серома ложа ЖП	1 (2,6 %)	—
	Абсцесс ложа ЖП	—	—
Лапароскопия	Серома п/о рубца	—	1 (2,5 %)
	Инфильтрат п/о рубца	1 (2,6 %)	—
	Абсцесс п/о рубца	—	—
	Серома ложа ЖП	—	—
	Абсцесс ложа ЖП	1 (2,6 %)	—
ИТОГО:		9 (23,7 %)	4 (10 %)*
<p>* $\varphi < 0,05$ (при критерии Фишера $> 1,64$) Коэф. сопряжённости Пирсона (C) = 0,378 (сила связи средняя) Нормир. значение коэф. Пирсона (C) = 0,535 (сила связи относительно сильная)</p>			

Таким образом, у больных 6-й группы на фоне целевого применения антимикробных химиопрепаратов, по сравнению с 5-й группой (9 (23,7 %)), был отмечен меньший процент осложнений – 4 (10 %).

Летальность составила 1,4 % (2 пациента) от 145 больных, составивших 2–6-ю группы. Причинами летальных исходов были массивная тромбоэмболия лёгочного ствола и синдром полиорганной недостаточности на фоне декомпенсации тяжёлой сопутствующей сердечно-сосудистой и почечной патологии (в 5-й и 6-й группах).

5.2 Результаты коррекции дисбиоза у пациентов с острым калькулёзным холециститом

По результатам исследования методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии на дисбиоз в 3-й группе до операции (до назначения антимикробной химиотерапии) у 3 (14,3 %) был выявлен дисбиоз кишечника

II ст., у 15 (71,4 %) – дисбиоз I ст.

В 4-й группе до операции (до назначения антимикробной химиотерапии) у 4 (17,4 %) был выявлен дисбиоз кишечника II ст., у 15 (65,2 %) – дисбиоз I ст.

В 5-й группе до операции (до назначения антимикробной химиотерапии) у 6 (15,8 %) был выявлен дисбиоз кишечника II ст., у 29 (76,3 %) – дисбиоз I ст.

В 6-й группе до операции (до назначения антимикробной химиотерапии) у 7 (17,5 %) был выявлен дисбиоз кишечника II ст., у 27 (67,5 %) – дисбиоз I ст.

При динамическом наблюдении с контролем показателей методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии на наличие и степень дисбиоза кишечника установлено, что при заборе материала к моменту завершения курса антибактериальной терапии (в среднем к 5–7-у дню) у всех пациентов развивается или усугубляется дисбиоз различной степени выраженности.

Так, в 3-й группе у 3 (14,3 %) был выявлен дисбиоз кишечника III ст., у 16 (76,2 %) – дисбиоз II ст. и 2 (9,5 %) – дисбиоз I ст.

В 4-й группе у 5 (21,7 %) был выявлен дисбиоз кишечника II ст., у 17 (73,9 %) – дисбиоз I ст.

В 5-й группе у 10 (26,3 %) был выявлен дисбиоз кишечника III ст., у 12 (31,6 %) был выявлен дисбиоз кишечника II ст., у 16 (42,1 %) – дисбиоз I ст.

В 6-й группе у 8 (20 %) был выявлен дисбиоз кишечника II ст., у 29 (72,5 %) – дисбиоз I ст.

Для коррекции выявленных дисбиотических изменений применялись пре-, про- и синбиотики (пребиотики: Лактофильтрум 1,0 г (2 таблетки) 3 раза в день, перорально в течение 14–21 дня, пробиотики: Бифидумбактерин-форте 2 пакетика (1 пакетик – 5 доз; 1 доза – 10^9 КОЕ/мл) 3 раза в день, перорально в течение 5–15 дней, синбиотики: Бифиформ Комплекс 2 таблетки 1 раз в день во время еды, перорально в течение 10–14 дней), начиная курс со дня установления диагноза дисбиоз II–III ст., которые являются клинически значимыми, с последующими рекомендациями приёма препаратов после выписки и амбулаторным контролем эффективности проводимого лечения. При этом у всех пациентов 3–6-й групп на момент выписки клинических проявлений дисбиоза выявлено не было.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время желчнокаменная болезнь остаётся одной из самых распространённых хирургических патологий. В среднем в развитых странах желчнокаменная болезнь выявляется у 10–15 % взрослого населения. А острый калькулёзный холецистит занимает сегодня третье место в структуре неотложных хирургических заболеваний органов брюшной полости, уступая лишь острому аппендициту и острому панкреатиту. Больные с острым калькулёзным холециститом составляют от 10 до 50 % от общего числа больных с острой хирургической патологией. Ежегодно в мире выполняется более 3 миллионов холецистэктомий, в России число подобных операций доходит до 300 тысяч.

В настоящее время ключевая роль в развитии воспаления желчного пузыря отводится микроорганизмам, однако, результаты исследований, представленные в литературе, достаточно противоречивы. Всё ещё мало работ, отражающих место анаэробных микроорганизмов в патогенезе деструктивных форм острого калькулёзного холецистита. Существует необходимость экспресс-метода диагностики патогенной микрофлоры желчного пузыря, который являлся бы и методом клинического динамического контроля антимикробной химиотерапии при калькулёзном холецистите. Идентификация достаточно неприхотливых аэробных и факультативно анаэробных бактерий не представляет особых трудностей для рутинных методов микробиологической диагностики, хотя и может требовать достаточно длительного времени для идентификации до вида. Идентификация анаэробов и других труднокультивируемых микроорганизмов при помощи классического бактериологического метода сопряжена с рядом проблем, таких, как чёткое соблюдение правил забора материала, срочная транспортировка образцов в бактериологическую лабораторию, строгое соблюдение анаэробноза. В связи с этими обстоятельствами очевидна необходимость точного, специфического, быстрого метода диагностики микроорганизмов, который бы позволял клиницисту уже в первые часы поступления больного в стационар сориентироваться в вопросах

антибактериальной химиотерапии. Кроме того, метод должен быть неинвазивным, чтобы иметь возможность осуществлять мониторинг концентрации микроорганизмов в процессе лечения после операции и своевременно корректировать антимикробную терапию. Таким методом является газожидкостная хромато-масс-спектрометрия.

В последние годы огромное значение в развитии хронического воспаления отводится бактериальным биоплёнкам. Ранее считалось, что биоплёнки могут формироваться только на изделиях медицинского назначения. В литературе встречаются данные о формировании биоплёнок на поверхности почечных конкрементов и камней предстательной железы. В зарубежных источниках имеются данные о формировании биоплёнок на эпителии слизистой оболочки мочевого пузыря у больных с циститом, а учёные из США при помощи сканирующей электронной микроскопии наглядно демонстрируют бактериальные биоплёнки на слизистой придаточных пазух носа пациентов с хроническим риносинуситом. Данных о возможности образования биоплёнок на поверхности желчных конкрементов, а также на слизистой оболочке желчного пузыря и, что более важно, на слизистой оболочке общего желчного протока, в литературе не встречается.

В настоящем исследовании все больные были разделены на 6 групп.

1-я группа (n = 30) – группа сравнения (здоровые люди).

2-я группа (n = 23) – больные ЖКБ, хроническим калькулёзным холециститом, которым была выполнена холецистэктомия (традиционным способом, лапароскопическая или из мини-доступа). Перед операцией больным проводилась антибиотикопрофилактика.

3-я группа (n = 21) – больные ЖКБ, острым катаральным калькулёзным холециститом, которым была выполнена холецистэктомия (традиционным способом, лапароскопическая или из мини-доступа). Перед операцией больным проводилась антибиотикопрофилактика. После операции проводилась эмпирическая антибактериальная химиотерапия.

4-я группа (n = 23) – больные ЖКБ, острым катаральным калькулёзным

холециститом, которым была выполнена холецистэктомия (традиционным способом, лапароскопическая или из мини-доступа). Перед операцией больным проводилась антибиотикопрофилактика. После операции проводилась целевая антибактериальная химиотерапия.

5-я группа (n = 38) – больные ЖКБ, острым деструктивным калькулёзным холециститом, которым была выполнена холецистэктомия (традиционным способом, лапароскопическая или из мини-доступа). Перед и после операции больным проводилась эмпирическая антибактериальная химиотерапия.

6-я группа (n = 40) – больные ЖКБ, острым деструктивным калькулёзным холециститом, которым была выполнена холецистэктомия (традиционным способом, лапароскопическая или из мини-доступа). Перед и после операции больным проводилась целевая антибактериальная химиотерапия.

При необходимости у больных 2–6-й группы интраоперационно после удаления желчного пузыря с целью гемостаза в ложе устанавливалась гемостатическая губка Surgicel Original $5,1 \times 7,6$ см.

Кроме того, у больных 6-й группы дополнительно гемостатическая губка SURGICEL® NU-KNIT™ $7,5 \times 10$ см обрабатывалась раствором диклофенака натрия 3 мл (75 мг) и устанавливалась в ложе желчного пузыря и область инфильтрата.

У всех пациентов 3–6-й групп по показаниям назначались про-, пре- и синбиотики.

В 1-ю группу – группу сравнения – вошли люди, у которых никогда не было жалоб на боли, дискомфорт в эпигастрии. При ультрасонографии брюшной полости у этих людей патологии печени, желчного пузыря, желчевыводящих протоков выявлено не было. Клинические и биохимические анализы соответствовали норме. Пациенты были признаны условно здоровыми.

Во 2-ю группу исследования вошли пациенты с клинической картиной ЖКБ, хронического калькулёзного холецистита, подтверждённой ультрасонографически (были обнаружены конкременты желчного пузыря без признаков билиарной гипертензии и патологии внутри- и внепечёночных

желчных протоков), обратившиеся в хирургическое отделение в плановом порядке с различной давностью анамнеза желчнокаменной болезни.

В 3-ю и 4-ю группы вошли больные с клинической картиной ЖКБ, острого калькулёзного холецистита (недеструктивного), подтверждённой ультрасонографически (были обнаружены конкременты, утолщение стенки, увеличение размеров желчного пузыря без признаков деструкции стенки, билиарной гипертензии и патологии внутри- и внепечёночных желчных протоков), поступившие в хирургическое отделение в экстренном порядке с различными сроками от момента начала заболевания.

5-ю и 6-ю группы составили больные с клинической картиной ЖКБ, острого деструктивного калькулёзного холецистита, подтверждённой ультрасонографически (были обнаружены конкременты, утолщение стенки, увеличение размеров желчного пузыря с признаками деструкции стенки, без признаков билиарной гипертензии и патологии внутри- и внепечёночных желчных протоков), поступившие в хирургическое отделение в экстренном порядке с различными сроками от момента начала заболевания.

Микробиологическое исследование пузырной желчи, биоптата стенки желчного пузыря и желчных конкрементов показало высокий процент положительных результатов посевов при ФКХ – 89,1 % и ГКХ – 81,3 %. При ОКХХ высеваемость микроорганизмов составила всего 18,2 %, что, вероятно, свидетельствует о небольшой давности обтурации шейки желчного пузыря конкрементом и небольшой продолжительности воспалительного процесса в желчном пузыре, на первом этапе носящего неинфекционный характер. При ХКХ высеваемость микроорганизмов составила всего 8,7 %.

В желчи основную долю среди выделенных микроорганизмов составили факультативно анаэробные грамположительные неспорообразующие кокки (*Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus faecalis*) – 34,5 % и факультативно анаэробные грамотрицательные неспорообразующие палочковидные энтеробактерии (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*) –

43,4 %; аэробные неспорообразующие грамотрицательные бактерии (представители семейства Moraxellaceae: *Moraxella spp.* (палочковидные, коккобациллы, *Moraxella catarrhalis* – диплококки) и *Acinetobacter spp.* (кокки), *Pseudomonas aeruginosa* (палочковидные бактерии)) – 17,5 %, удельный вес дрожжеподобных грибов рода *Candida* составил 3,2 %, анаэробные неспорообразующие грамотрицательные палочковидные бактерии (*Bacteroides fragilis*) – 1,4 %. При этом доля *Pseudomonas aeruginosa* составила 9,5 %. Микробный пейзаж биоптатов и желчных конкрементов по качественному и количественному составу почти не отличался от микрофлоры желчи.

При ХКХ чаще высевались представители семейства Enterobacteriaceae из биоптата стенки желчного пузыря, с поверхности и сколов желчных конкрементов.

При ОККХ получены представители семейства Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, а также *Staphylococcus spp.* из всех трёх биологических материалов.

При ФКХ были выделены из трёх биологических материалов микроорганизмы семейства Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, *Staphylococcus spp.* и *Pseudomonas aeruginosa*, а также *Streptococcus faecalis* из биоптата стенки желчного пузыря, с поверхности и сколов желчных конкрементов. *Bacteroides fragilis* выделен у 1 пациента.

При ГКХ были выделены микроорганизмы семейства Enterobacteriaceae, Enterococcaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida spp.*, *Moraxella spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Acinetobacter calcoaceticus* практически в равных долях из трёх биоматериалов.

При идентификации микроорганизмов в желчи основную долю составили микроорганизмы в монокультуре – 52,4 %, при исследовании биоптата стенки желчного пузыря, поверхности и сколов желчных конкрементов идентифицированные монокультуры составили 27,4 и 32,5 % соответственно.

При ХКХ и ОККХ выделенные микроорганизмы в монокультуре составили 41,7 %, при ФКХ и ГКХ – 18,4 %.

При идентификации микроорганизмов в желчи доля микробных ассоциаций

составила 47,6 %, при исследовании биоптата стенки желчного пузыря, поверхности и сколов желчных конкрементов идентифицированные монокультуры составили 72,6 и 67,5 % соответственно.

При ХКХ и ОККХ выделенные микроорганизмы в монокультуре составили 58,3 %, при деструктивных формах калькулёзного холецистита – 81,6 %.

При этом ассоциации микроорганизмов были представлены *Escherichia coli* + *Enterococcus faecium* + *Klebsiella pneumoniae*; *Enterococcus faecalis* + *Staphylococcus epidermidis* + *Serratia marcescens*; *Escherichia coli* + *Staphylococcus saprophyticus* + *Streptococcus faecalis*; *Pseudomonas aeruginosa* + *Moraxella spp.* + *Enterococcus faecium*; *Bacteroides fragilis* + *Escherichia coli*; *Candida spp.* + *Staphylococcus saprophyticus* + *Streptococcus faecalis*; *Acinetobacter calcoaceticus* + *Enterococcus faecalis*.

На основании полученных результатов может быть сделан вывод о том, что обсеменение желчного пузыря происходит в основном энтерогенным восходящим путём, при этом не исключаются гематогенный и лимфогенный путь проникновения инфекционного агента. На основании данных литературы, учитывая отрицательные результаты посевов пузырной желчи в норме, полученной при дуоденальном зондировании, может быть сделан вывод о том, что контаминация желчного пузыря происходит при патологии – в частности, при нарушении барьерной функции области большого дуоденального соска, повышении литогенности желчи и формировании желчных конкрементов. Но вопрос о первичности появления микроорганизмов в желчном пузыре или вторичном присоединении инфекции, появлении микролитов, а затем и конкрементов, остаётся дискуссионным и требует дальнейшего изучения, особенно учитывая тот факт, что положительные результаты посевов были получены не только с поверхности желчных конкрементов, но и со сколов.

По результатам газожидкостной хромато-масс-спектрометрии крови и испражнений был установлен коэффициент, позволяющий верифицировать источник метаболитов микрофлоры, которые появляются в крови. Коэффициент был получен посредством вычисления отношения нормального количества экв.

клеток / $\text{г} \times 10^5$ в крови к нормальному количеству экв. клеток / $\text{г} \times 10^5$ в испражнениях = 0,12. Показатели менее 0,12 должны расцениваться таким образом, что в качестве источника метаболитов микрофлоры является кишечник, что, в свою очередь, расценивается как дисбиоз. Показатели соотношения, превышающие 0,12, должны расцениваться таким образом, что в качестве источника метаболитов микрофлоры является другой патологический очаг инфекционно-воспалительного характера, например, желчный пузырь. В 1-й группе среди здоровых лиц общее количество экв. клеток в крови составило $33\ 299/\text{г} \times 10^5$, а общее количество экв. клеток в испражнениях $316\ 302/\text{г} \times 10^5$. Таким образом, при соотношении числа экв. клеток / $\text{г} \times 10^5$ в крови к числу экв. клеток / $\text{г} \times 10^5$ в испражнениях составило 0,1. Из чего может быть сделан вывод о том, что источником жирных кислот, альдегидов и стероидов в крови является кишечник, что расценено как проявление дисбиоза.

По результатам исследования были идентифицированы представители грамположительных аэробных и факультативно анаэробных неспорообразующих микроорганизмов (*Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*); грамположительных аэробных и факультативно анаэробных спорообразующих микроорганизмов (*Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*); грамотрицательных аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных неспорообразующих микроорганизмов (*Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.*, *Campylobacter spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*); грамположительных анаэробных неспорообразующих микроорганизмов (*Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*); грамположительных анаэробных спорообразующих микроорганизмов (*Clostridium spp.*, *Ruminococcus spp.*); грамотрицательных анаэробных неспорообразующих микроорганизмов (*Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides fragilis*); а также грибов *Candida spp.*

При исследовании крови методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии при всех формах калькулёзного холецистита (хроническом, остром катаральном и деструктивном формах) клинически значимых различий по

среднему количеству экв. клеток / г $\times 10^5$ выявлено не было. Но при анализе полученных результатов конкретно по группам микроорганизмов получены клинически значимые различия по представителям *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Candida spp.* – при хроническом калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Peptostreptococcus spp.* – при остром катаральном калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.*, *Campylobacter spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Candida spp.* – при остром флегмонозном калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Peptostreptococcus spp.*, *Eubacterium spp.*, *Bacteroides fragilis* – при остром гангренозном калькулёзном холецистите.

При исследовании пузырной желчи методом газожидкостной хроматографии при хроническом калькулёзном холецистите клинически значимых различий по среднему количеству экв. клеток / г $\times 10^5$ выявлено не было, а при остром катаральном, флегмонозном и гангренозном холецистите получены клинически значимые различия. При исследовании пузырной желчи по группам микроорганизмов клинически значимые различия получены по представителям семейства *Enterobacteriaceae* – при хроническом калькулёзном холецистите; по представителям *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Ruminococcus spp.*, *Prevotella spp.*, *Candida spp.* – при остром катаральном калькулёзном холецистите; по представителям *Lactobacillus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridium spp.*, *Ruminococcus spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Candida spp.* – при остром флегмонозном калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*,

Lactobacillus spp., *Staphylococcus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Candida spp.* – при остром гангренозном калькулёзном холецистите.

При исследовании биоптата стенки желчного пузыря при хроническом калькулёзном холецистите клинически значимых различий по среднему количеству экв. клеток / г $\times 10^5$ выявлено не было, а при остром катаральном, флегмонозном и гангренозном холецистите получены клинически значимые различия. При исследовании биоптата стенки желчного пузыря по группам микроорганизмов клинически значимые различия получены по представителям семейства *Enterobacteriaceae* – при хроническом калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*, *Eubacterium spp.*, *Prevotella spp.*, *Candida spp.* – при остром катаральном калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.*, *Campylobacter spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Candida spp.* – при остром флегмонозном калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Rhodococcus spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Flavobacterium spp.*, *Campylobacter spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*, *Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Candida spp.* – при остром гангренозном калькулёзном холецистите.

При исследовании желчных конкрементов при хроническом, остром катаральном и флегмонозном калькулёзном холецистите клинически значимых различий по среднему количеству экв. клеток / г $\times 10^5$ выявлено не было, а при остром гангренозном холецистите получены клинически значимые различия. При исследовании желчных конкрементов по группам микроорганизмов клинически значимые различия получены по представителям *Streptococcus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Ruminicoccus spp.* – при хроническом калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Peptostreptococcus spp.*, *Ruminicoccus spp.* – при остром катаральном калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Ruminicoccus spp.* – при остром флегмонозном калькулёзном холецистите; по представителям *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Actinomyces spp.*, *Campylobacter spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Helicobacter pylori*, *Peptostreptococcus spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Bacteroides fragilis* – при остром гангренозном калькулёзном холецистите.

В монокультуре анаэробы идентифицированы всего у 36 (30,8 %) пациентов, что соответствует их идентификации в 123 (26,3 %) образцах.

При этом у 28 (19,3 %) пациентов анаэробные микроорганизмы идентифицированы не были. В группе больных хроническим калькулёзным холециститом у 12 (52,2 %) пациентов анаэробные микроорганизмы идентифицированы не были, в группе больных острым катаральным калькулёзным холециститом – у 7 (15,9 %), у пациентов с острым флегмонозным калькулёзным холециститом – в 10,9 % случаев (5 пациентов), и у 4 (12,5 %) больных острым гангренозным калькулёзным холециститом получены отрицательные результаты детекции анаэробов методом ГЖХ.

Микробные ассоциации были представлены в 81 (55,9 %) случае в 4 комбинациях при хроническом калькулёзном холецистите, в 6 комбинациях – при остром катаральном калькулёзном холецистите, в 8 – при остром

флегмонозном калькулёзном холецистите и в 6 сочетаниях – при остром гангренозном калькулёзном холецистите.

С развитием инфекционно-воспалительного процесса в желчном пузыре от острой катаральной формы (54,3 %), острого флегмонозного калькулёзного холецистита (59,9 %) и к острому гангренозному холециститу (65,3 %) прослеживается явная тенденция к увеличению количества ассоциаций микробных культур. Это позволяет сделать предположение о том, что с нарастанием выраженности воспалительного процесса в желчном пузыре от катаральной до гангренозной форм микробная флора детектируется в ассоциациях, что позволяет сделать вывод о возрастающей роли микст-инфекций в развитии острого калькулёзного холецистита.

Таким образом, всего наблюдалось 23 пациента с ХКХ, 44 пациента с ОККХ, 46 – с ФКХ и 32 – с ГКХ. При этом положительные результаты идентификации аэробной, факультативно анаэробной, микроаэрофильной и анаэробной микрофлоры в монокультуре и в ассоциациях бактериологическим методом и методом ГЖХ получены в 11 случаях при ХКХ, в 37 случаях у пациентов с ОККХ, у 41 больного ФКХ и у 28 пациентов с ГКХ.

На основании вышесказанного можно предположить, что при наличии анаэробной инфекции и труднокультивируемых факультативно анаэробных, аэробных и микроаэрофильных микроорганизмов в большом проценте случаев развиваются деструктивные формы острого калькулёзного холецистита и его осложнения.

Таким образом, метод газожидкостной хромато-масс-спектрометрии позволяет в короткие сроки (в течение 3 часов) определить наличие и концентрацию микроорганизмов в крови, пузырной желчи, биоптате стенки желчного пузыря и желчном конкременте, что позволяет использовать этот метод в качестве метода экспресс-диагностики как в дооперационном, так и в послеоперационном периоде.

При исследовании крови и параллельном исследовании испражнений становится возможным уже в первые сутки поступления больного с ургентной

хирургической патологией, в том числе острым калькулёзным холециститом, в стационар сориентироваться в вопросе идентификации возбудителей инфекционно-воспалительного процесса и назначении рациональной антибиотикопрофилактики, пред- и послеоперационной антимикробной химиотерапии.

При анализе результатов определения чувствительности выделенных культур к антимикробным химиопрепаратам установлено, что большинство из представителей вышеуказанных штаммов чувствительны к применяемым лекарственным препаратам. Устойчивость к гентамицину была выявлена у 9 % штаммов культуры *Streptococcus faecalis*. Культура *Staphylococcus epidermidis* была устойчива к ципрофлоксацину в 5 % анализируемых штаммов, левофлоксацину (4 %), эритромицину (7 % штаммов). Культура *Staphylococcus saprophyticus* была резистентна к оксациллину, линкомицину, ципрофлоксацину и гентамицину у одного пациента. Из факультативно анаэробных грамотрицательных неспорообразующих палочковидных энтеробактерий резистентность к цефтазидиму, цефотаксиму, левофлоксацину, ампициллин сульбактаму, пефлоксацину и амикацину была установлена у одного пациента с идентифицированной культурой *Escherichia coli*. При этом 15 % штаммов культуры *Escherichia coli* были устойчивы к левофлоксацину, 10 % – к пефлоксацину, 7 % – к амикацину и 4 % – к амоксициллин клавуланату. В группе аэробных неспорообразующих грамотрицательных бактерий устойчивость к амикацину была выявлена у 6 % штаммов культуры *Acinetobacter baumannii*. Культура *Pseudomonas aeruginosa* была устойчива к амикацину, имипенему, левофлоксацину, пефлоксацину, цефтазидиму и цефоперазону у одного пациента. В 17 % штаммов культура *Pseudomonas aeruginosa* была устойчива к левофлоксацину и чувствительна к другим антисинегнойным препаратам. Единственный выделенный бактериологическим методом представитель анаэробных неспорообразующих грамотрицательных палочковидных бактерий *Bacteroides fragilis* был резистентен к метронидазолу и к амоксициллину / клавулановой кислоте. Таким образом, может быть сделан вывод о том, что

большинство штаммов микроорганизмов, выделенных из различных биологических материалов больных калькулёзным холециститом, чувствительны к применяемым в клинической практике антимикробным средствам, которые включены в формуляр для эмпирической антимикробной химиотерапии при этой патологии. Однако необходимо помнить, что в настоящее время в стационарах, в том числе общехирургического профиля, возрастает резистентность микроорганизмов, особенно возбудителей нозокомиальных инфекций, к широко применяемым антибактериальным препаратам. При этом увеличивается число людей, исходно поступающих в хирургический стационар уже с устойчивыми штаммами культур-возбудителей, что может быть связано с бесконтрольным приёмом антибиотиков или с недавним стационарным или амбулаторно-поликлиническим курсом (курсами) антибактериальной терапии по поводу какого-либо другого заболевания. Исходя из этого, при использовании экспресс-метода газожидкостной хромато-масс-спектрометрии становится возможным изначально ориентироваться в спектре возбудителей, их природной чувствительности и устойчивости. А также, исходя из полученных ранее данных для конкретного стационара, назначать антибактериальные препараты, максимально подходящие по всем параметрам в периоперационном периоде (предоперационная антибиотикопрофилактика, предоперационная и послеоперационная антибиотикотерапия), и тем самым оптимизировать антимикробную химиотерапию: постараться снизить или, по крайней мере, поддерживать на том же уровне процент резистентных культур и улучшить результаты лечения этой категории больных.

С применением сканирующей электронно-ионной микроскопии и рентгеновского микроанализа были изучены образцы желчных конкрементов, биоптаты стенки желчного пузыря и биоптаты стенки общего желчного протока.

По данным рентгеновского микроанализа, который позволяет определить не только качественный, но и количественный химический состав образцов, из 6 конкрементов все имели холестериновый состав, лишь только в 2 случаях конкременты содержали кальций, причём в первом случае концентрация кальция

возрастала от центра к периферии, а во втором случае – от периферии к центру.

Посредством электронно-микроскопического исследования внешней поверхности желчных конкрементов были выявлены соединительнотканые тяжистые структуры, плотно фиксированные на поверхности конкремента, идущие в разных направлениях, среди которых визуализировались фибробласты и коллагеновые волокна.

Во всех образцах были обнаружены биоплёнки, представляющие собой мукополисахаридный матрикс с бактериальными клетками. Было отмечено, что матрикс интенсивнее формировался в непосредственной близости от соединительнотканых тяжей. Возможно, это связано с химической структурой последних, так как азот, сера и фосфор являются источниками питания для микроорганизмов. Биоплёнки располагались как на поверхности конкремента, так и внутри, причём внутри было обнаружено большее количество вегетирующих микроорганизмов. По-видимому, внутри конкремента создаются более благоприятные условия для существования микроорганизмов, так как им проще прикрепиться к субстрату внутри камня, а не на наружной поверхности, где присутствует ток желчи, который механически «смывает» микробные тела. Кроме того, внутри конкремента бактерии физически менее доступны для антибактериальных химиопрепаратов и фагоцитов.

Исследование эпителиальной выстилки желчного пузыря и общего желчного протока также показало наличие бактериальных биоплёнок.

Таким образом, все вышеперечисленные факты ещё раз подтверждают общепринятую тактику в отношении больных желчнокаменной болезнью вне зависимости от клинических проявлений. Всем пациентам при обнаружении холецистолитиаза должна быть рекомендована операция холецистэктомия, так как только это может обеспечить практически полную санацию.

Кроме того, для исключения возможности инфекционных осложнений особое внимание следует уделить антибиотикопрофилактике даже при хронических формах холецистита. Желательно, чтобы подбор антибактериального химиотерапевтического препарата осуществлялся не

эмпирически, а с учётом природной антибактериальной чувствительности разных видов бактерий, данные о которых можно получить, исследуя на дооперационном этапе кровь, а удалённые конкременты, пузырную желчь и биоптат стенки желчного пузыря – в ранние сроки после операции.

Следует учитывать колонизацию эпителия слизистой оболочки желчевыводящих путей бактериальными биоплёнками, которые не удаляются при холецистэктомии. В связи с этим необходимо применять антибиотики, сохраняющие высокую концентрацию в желчи, и к которым чувствительна микрофлора, персистирующая в желчных протоках.

Также, в ходе исследования поверхности сколов желчных конкрементов, были обнаружены пустоты-отпечатки бактериальных клеток. Это позволяет предполагать, что микроорганизмы могут представлять собой центры кристаллизации желчи, вокруг которых позднее формируются желчные конкременты.

У 21 пациента 3-й группы применялись следующие антимикробные химиопрепараты и их комбинации: защищённые пенициллины, фторхинолоны, цефалоспорины III–IV пок.

У 23 больных 4-й группы применялись цефалоспорины III–IV пок., цефалоспорины III–IV пок. + метронидазол, защищённые пенициллины, фторхинолоны, фторхинолоны + метронидазол, цефалоспорины III–IV пок. + аминогликозиды, фторхинолоны + аминогликозиды, макролиды + цефалоспорины III–IV пок., макролиды + аминогликозиды, макролиды + метронидазол, линкозамиды + аминогликозиды, линкозамиды + фторхинолоны, линкозамиды + цефалоспорины III–IV пок., тетрациклины + аминогликозиды, тетрациклины + фторхинолоны, тетрациклины + метронидазол.

У 38 пациентов 5-й группы были использованы цефалоспорины III–IV пок., цефалоспорины III–IV пок. + метронидазол, защищённые пенициллины, фторхинолоны, фторхинолоны + метронидазол.

У 40 больных 6-й группы применялись фторхинолоны, фторхинолоны + аминогликозиды, фторхинолоны + метронидазол, защищённые цефалоспорины +

аминогликозиды, защищённые цефалоспорины, защищённые пенициллины + аминогликозиды, защищённые пенициллины, цефалоспорины III–IV пок. + метронидазол, цефалоспорины III–IV пок., цефалоспорины III–IV пок. + аминогликозиды, оксазолидиноны + фторхинолоны, оксазолидиноны + цефалоспорины III–IV пок., оксазолидиноны + метронидазол, карбапенемы, линкозамиды + аминогликозиды, линкозамиды + фторхинолоны, линкозамиды + цефалоспорины III–IV пок., гликопептиды + фторхинолоны, гликопептиды + цефалоспорины III–IV пок., гликопептиды + метронидазол, макролиды + цефалоспорины III–IV пок., макролиды + аминогликозиды, макролиды + метронидазол, тетрациклины + аминогликозиды, тетрациклины + фторхинолоны, тетрациклины + метронидазол.

Кроме того, пациентам 6-й группы, на основании полученного коэффициента по результатам газожидкостной хромато-масс-спектрометрии, в предоперационном периоде назначалась целевая антимикробная химиотерапия.

В том случае, когда по результатам газожидкостной хромато-масс-спектрометрии крови и испражнений был получен коэффициент (более 0,12), свидетельствующий о желчном пузыре как источнике инфекции, при поступлении пациента в ранние сроки назначалась целевая предоперационная антибиотикотерапия согласно схемам, описанным выше.

При анализе результатов детекции микрофлоры отделяемого по дренажам из брюшной полости после холецистэктомии на 1-е и 5-е сутки послеоперационного периода на фоне установки в ложе желчного пузыря гемостатической губки, пропитанной раствором диклофенака натрия, у больных острым калькулёзным холециститом с перивезикальными осложнениями, были выявлены статистически значимые различия между показателями количества эквивалент клеток в крови и экссудате у пациентов 2-й группы по сравнению с нормой. В 6-й группе по сравнению с 5-й группой выявлены статистически значимые отличия на 5-е сутки по количеству клеток в экссудате. У пациентов 6-й группы статистически значимые различия выявлены на 5-е сутки послеоперационного периода по сравнению с 1-и сутками по показателю

количества эквивалент клеток в отделяемом по дренажам.

После холецистэктомии из лапаротомного доступа в 5-й группе общее число осложнений (серома послеоперационного рубца, абсцесс послеоперационного рубца, серома ложа желчного пузыря) составило 4 (10,5 %), в 6-й группе (серома послеоперационного рубца, серома ложа желчного пузыря) – 2 (5 %).

После малоинвазивной холецистэктомии в 5-й группе отмечены такие осложнения, как инфильтрат послеоперационного рубца, серома ложа желчного пузыря – 3 (7,9 %), во 6-й группе – инфильтрат послеоперационного рубца – 1 (2,5 %).

После лапароскопической холецистэктомии у больных 5-й группы сформировались инфильтрат послеоперационного рубца и абсцесс ложа желчного пузыря – 2 (5,2 %), в 6-й группе (серома послеоперационного рубца) – 1 (2,5 %).

Таким образом, у больных 6-й группы на фоне рационального применения антимикробных химиопрепаратов по сравнению с 5-й группой (9 (23,7 %)) был отмечен меньший процент осложнений – 4 (10 %).

Летальность составила 1,4 % (2 пациента) от 145 больных, составивших 2–6-ю группы. Причинами летальных исходов были массивная тромбоэмболия лёгочного ствола и синдром полиорганной недостаточности на фоне декомпенсации тяжёлой сопутствующей сердечно-сосудистой и почечной патологии (в 5-й и 6-й группах).

По результатам исследования методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии на дисбиоз в 3-й группе до операции (до назначения антимикробной химиотерапии) у 3 пациентов (14,3 %) был выявлен дисбиоз кишечника II ст., у 15 (71,4 %) – дисбиоз I ст. В 4-й группе до операции (до назначения антимикробной химиотерапии) у 4 (17,4 %) был выявлен дисбиоз кишечника II ст., у 15 (65,2 %) – дисбиоз I ст. В 5-й группе до операции (до назначения антимикробной химиотерапии) у 6 (15,8 %) был выявлен дисбиоз кишечника II ст., у 29 (76,3 %) – дисбиоз I ст. В 6-й группе до операции (до назначения антимикробной химиотерапии) у 7 (17,5 %) был выявлен дисбиоз кишечника II ст., у 27 (67,5 %) – дисбиоз I ст.

При динамическом наблюдении с контролем показателей методом

газожидкостной хромато-масс-спектрометрии на наличие и степень дисбиоза кишечника установлено, что при заборе материала к моменту завершения курса антибактериальной терапии (в среднем к 5–7-у дню) у всех пациентов развивается или усугубляется дисбиоз различной степени выраженности.

Так, в 3-й группе у 3 (14,3 %) был выявлен дисбиоз кишечника III ст., у 16 (76,2 %) – дисбиоз II ст. и 2 (9,5 %) – дисбиоз I ст. В 4-й группе у 5 (21,7 %) был выявлен дисбиоз кишечника II ст., у 17 (73,9 %) – дисбиоз I ст. В 5-й группе у 10 (26,3 %) был выявлен дисбиоз кишечника III ст., у 12 (31,6 %) был выявлен дисбиоз кишечника II ст., у 16 (42,1 %) – дисбиоз I ст. В 6-й группе у 8 (20 %) был выявлен дисбиоз кишечника II ст., у 29 (72,5 %) – дисбиоз I ст.

Для коррекции выявленных дисбиотических изменений применялись пре-, про- и синбиотики, начиная курс со дня установления диагноза дисбиоз II-III ст., которые являются клинически значимыми, с последующими рекомендациями приёма препаратов после выписки и амбулаторным контролем эффективности проводимого лечения. При этом у всех пациентов 3–6-й групп на момент выписки клинических проявлений дисбиоза выявлено не было.

ВЫВОДЫ

1. Микробиологическое исследование у больных калькулёзным холециститом позволяет определить спектр микроорганизмов (аэробных, факультативно анаэробных и анаэробных) и назначить эффективную целевую антимикробную химиотерапию.

2. Метод газожидкостной хромато-масс-спектрометрии позволяет в течение трех часов идентифицировать спектр аэробных, факультативно анаэробных и анаэробных микроорганизмов в крови, пузырной желчи, биоптате стенки желчного пузыря и может применяться в качестве метода динамического контроля клинической эффективности антимикробной терапии при остром калькулёзном холецистите.

3. На поверхности и внутри желчных конкрементов обнаружены микробные биоплёнки. Кроме того, биоплёнки обнаружены на поверхности слизистой оболочки желчного пузыря и внутренней поверхности общего желчного протока, что подтверждает целесообразность целевой антибактериальной химиотерапии после операции.

4. Предложенный вариант усовершенствования целевой антибактериальной химиотерапии, основанный на получении ранних результатов газожидкостной хромато-масс-спектрометрии, позволяет снизить частоту осложнений после холецистэктомии с 23,7 до 10 %.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В комплекс диагностических мероприятий у больных калькулёзным холециститом необходимо включить исследование крови, испражнений, пузырной желчи, биоптата стенки желчного пузыря и желчных конкрементов методом газожидкостной хромато-масс-спектрометрии, позволяющей в первые часы поступления больного в стационар назначить целевую антибактериальную химиотерапию.

2. Определение отношения полученных результатов газожидкостной хромато-масс-спектрометрии крови к испражнениям позволяет, при сопоставлении с коэффициентом 0,12, верифицировать источник метаболитов микрофлоры. Показатели менее 0,12 должны расцениваться таким образом, что в качестве источника метаболитов микрофлоры является кишечник, что, в свою очередь, расценивается как дисбиоз. Показатели соотношения, превышающие 0,12, должны расцениваться таким образом, что в качестве источника метаболитов микрофлоры является желчный пузырь.

3. У пациентов с острым калькулёзным холециститом, особенно при развитии деструктивных форм, обязательно назначение целевой антибактериальной химиотерапии, так как при исследовании биоматериалов методом электронно-ионной микроскопии установлено, что микробные биоплёнки формируются не только на желчных конкрементах и слизистой оболочке желчного пузыря, но также и на внутренней поверхности желчных протоков.

4. При остром калькулёзном холецистите с перивезикальными осложнениями, сопровождающимися повышенной кровоточивостью, после холецистэктомии в ложе желчного пузыря и область инфильтрата показана установка гемостатической губки, пропитанной раствором диклофенака натрия, позволяющая в послеоперационном периоде сократить число эквивалент клеток микроорганизмов в отделяемом по дренажам из брюшной полости.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ	аланинаминотрансфераза
АСТ	аспартатаминотрансфераза
БМ	бактериологический метод
ГЖХ	газожидкостная хроматография
ГКХ	гангренозный калькулёзный холецистит
ГПДЗ	гепатопанкреатодуоденальная зона
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ДПК	двенадцатиперстная кишка
ЖВП	желчевыводящие пути
ЖК	желчные кислоты
ЖКБ	желчнокаменная болезнь
ЖКТ	желудочно-кишечный тракт
ЖП	желчный пузырь
ИОУЗИ	интраоперационное УЗИ
КА	кровяной агар
КСЛМ	конфокальный сканирующий лазерный микроскоп
КТ	компьютерная томография
ЛХЭ	лапароскопическая холецистэктомия
МРХПГ	магнитно-резонансная панкреатохолангиография
МХЭ	мини-инвазивная холецистэктомия
МЯТ	магнитно-ядерная томография
НПВС	нестероидные противовоспалительные средства
ОЖП	общий желчный проток
ОКХ	острый калькулёзный холецистит
ОККХ	острый катаральный калькулёзный холецистит
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РНК	рибонуклеиновая кислота
СКС	среда для контроля стерильности

СЭМ	сканирующий электронный микроскоп
УЗИ	ультразвуковое исследование
ФКХ	флегмонозный калькулёзный холецистит
ФЭГДС	фиброэзофагогастродуоденоскопия
ХКХ	хронический калькулёзный холецистит
ХЭ	холецистэктомия
ША	агар Шадлера
ЩФ	щелочная фосфотаза
ЭПСТ	эндоскопическая папиллосфинктеротомия
ЭРХПГ	эндоскопическая ретроградная холангиопанкреатография
ЯМР	ядерный магнитный резонанс
АТСС	American Type Culture Collection (Американская коллекция типовых культур)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Институт клинических и лабораторных стандартов)
EPS	Extracellular Polymeric Substance (внеклеточное полимерное вещество)
NCCLC	National Committee for Clinical Laboratory Standards (Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам)
NOTES	Natural Orifices Transluminal Endoscopic Surgery (транслюменальный эндоскопический хирургический доступ)
PIA	Polysaccharide Intercellular Adhesin (полисахарид межклеточный адгезин)
QS	Quorum Sensing (чувство кворума)
SILS	Single Incision Laparoscopic Surgery (хирургия единого лапароскопического доступа)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиев, Ю. Г. Минилапаротомный доступ в хирургическом лечении желчнокаменной болезни / Ю. Г. Алиев // Хирургия. – 2013. – № 3. – С. 95–97.
2. Ардатская, М. Д. Возможности и перспективы использования хроматографических методов в оценке и коррекции микробиоценоза различных биотопов макроорганизма / М. Д. Ардатская, Н. С. Иконников, О. Н. Минушкин // Клинич. лаб. диагностика. – 2005. – № 9. – С. 77d.
3. Ардатская, М. Д. Определение короткоцепочечных жирных кислот в различных биологических субстратах методом газожидкостной хроматографии и их диагностическое значение в клинике внутренних болезней / М. Д. Ардатская, Н. С. Иконников, О. Н. Минушкин // Клинич. лаб. диагностика. – 2004. – № 9. – С. 63.
4. Ардатская, М. Д. Способ определения короткоцепочечных жирных кислот (фракции C₂ – C₆ с изомерами) в различных биологических субстратах методом газожидкостной хроматографии, (патент РФ на изобретение № 2220755 от 23.07.2002) / М. Д. Ардатская, Н. С. Иконников, О. Н. Минушкин // Клинич. лаб. диагностика. – 2004. – № 9. – С. 64.
5. Афиногенова, А. Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А. Г. Афиногенова, Е. Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. – 2011. – № 3. – С. 119–125.
6. Барановский, А. Ю. Дисбактериоз кишечника / А. Ю. Барановский, Э. А. Кондрашина. – 3-е изд. – СПб. : Питер, 2007. – 240 с.
7. Белобородов, В. А. Желчнокаменная болезнь и ее осложнения / В. А. Белобородов, Р. А. Пахомова, А. А. Белобородов. – Красноярск: Центр печати, 2008. – 180 с.
8. Бельмер, С. В. Дисбактериоз кишечника и роль пробиотиков в его коррекции / С. В. Бельмер, А. В. Малкоч // Лечащий врач. – 2006. – № 6. – С. 18.
9. Бельмер, С. В. Коррекция нарушений микробиоценоза кишечника / С. В. Бельмер // Эффективная фармакотерапия. – 2014. – № 34. – С. 26–33.

10. Блохина, И. Н. Дисбактериоз и его профилактика / И. Н. Блохина // Педиатрия. – 1981. – № 10. – С. 6–9.
11. Бобров, О. Е. Очерки хирургии острого холецистита / О. Е. Бобров, С. И. Хмельницкий, Н. А. Мендель. – Кировоград : ПОЛИУМ, 2008. – 216 с.
12. Бондаренко, В. М. Дисбактериоз кишечника как клинко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы / В. М. Бондаренко, Т. В. Мацу-левич. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 304 с.
13. Видеоэндоскопическое хирургическое лечение желчнокаменной болезни у пациентов пожилого и старческого возраста / Ф. С. Курбанов [и др.] // Хирургия. – 2012. – № 12. – С. 44–46.
14. Виноградов, И. В. Первый опыт комплексного электронно-микроскопического и бактериологического исследования камней предстательной железы / И. В. Виноградов, Д. Г. Ким, Л. В. Диденко // Андрология и генитальная хирургия. – 2014. – № 3. – С. 87–91.
15. Влияние бигуанидов на формирование стрептококковой биопленки на модели культуры клеток фибробластов кожи эмбриона человека / А. Г. Афиногенова [и др.] // Инфекции в хирургии. – 2011. – № 1. – С. 3–11.
16. Влияние *Helicobacter pylori* инфекции на частоту диспепсических расстройств у больных желчнокаменной болезнью / Н. А. Агафонова, [и др.] // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2006. – № 5. – С. 92.
17. Возможности масс-спектрометрии микробных маркеров в лабораторном мониторинге дисбиозов и инфекций / М. А. Годков [и др.] // Справочник заведующего КДЛ. – 2011. – № 7. – С. 35–44.
18. Волков, А. Ю. Инструментальные методы определения элементарного состава биосубстратов / А. Ю. Волков, А. А. Мокроусов // Клинич. лаб. диагностика. – 2005. – № 9. – С. 78d.
19. Гасилина, Т. В. Механизмы развития и пути коррекции антибиотик-ассоциированной диареи / Т. В. Гасилина, С. В. Бельмер // Лечащий врач. – 2014. – № 6. – С. 14.

20. Генетическая паспортизация и изучение способности к формированию биопленок лактобациллами, выделенными из полости рта здоровых людей / Ю. В. Червинец [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2011. – № 2. – С. 44–46.

21. Гепатобилисцинтиграфия в хирургии желчнокаменной болезни / В. Е. Васильев [и др.] // Анналы хирургии. – 2000. – №1. – С. 48–52.

22. Глушков, Н. И. Результаты минилапаротомных вмешательств в лечении желчнокаменной болезни у больных пожилого и старческого возраста / Н. И. Глушков, А. В. Скородумов, А. В. Гурина // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2009. – № 6. – С. 72–75.

23. Гостев, В. В. Бактериальные биопленки и инфекции / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // Журнал инфектологии. – 2010. – Т. 2, № 3. – С. 4–15.

24. Григорьева, И. Н. Основные факторы риска желчнокаменной болезни / И. Н. Григорьева // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2007. – № 6. – С. 17–21.

25. Губергриц, Н. Б. Хроническая абдоминальная боль. Билиарная боль. Боль при заболеваниях печени. – М. : Медпрактика-М, 2007. – 400 с.

26. Дергачев, А. Я. Лучевая диагностика желчевыводящей системы перед лапароскопической холецистэктомией. Ч. I: Ультразвуковые методы / А. Я. Дергачев, А. Р. Бродский // Вестн. рентгенологии и радиологии. – 2000. – № 2. – С. 55–64.

27. Дергачев, А. Я. Лучевая диагностика желчевыводящей системы перед лапароскопической холецистэктомией. Ч. II: Неультразвуковые методы / А. Я. Дергачев, А. Р. Бродский // Вестн. рентгенологии и радиологии. – 2000. – № 3. – С. 48–56.

28. Донецкая, Э. Г. Клиническая микробиология: руководство для специалистов клинической лабораторной диагностики / Э. Г. Донецкая. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 480 с.

29. Ермолов, А. С. Хирургия желчнокаменной болезни / А. С. Ермолов // Анналы хирургии. – 1998. – № 3. – С. 13–24.

30. Желчнокаменная болезнь / С. А. Дадвани [и др.]. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 176 с.
31. Желчнокаменная болезнь / Ю. М. Дедерер [и др.]. – М. : Медицина, 1983. – 176 с.
32. Желчнокаменная болезнь и постхолецистэктомический синдром / Ю. С. Винник [и др.]. – Красноярск : Версо, 2010. – 231 с.
33. Желчнокаменная болезнь. Современные подходы к диагностике, лечению и профилактике: пособие для врачей / Т. Э. Скворцова [и др.]. – М. : Форте принт, 2013. – 32 с.
34. Журавлева, Л. В. Сочетанное применение урсодезоксихолевой кислоты и домперидона в лечении пациентов с холелитиазом / Л. В. Журавлёва, Е. М. Кривоносова // Современная гастроэнтерология. – 2013. – № 5. – С. 77–82.
35. Завгородняя, Е. Ф. Дисбактериоз кишечника (обзор) / Е. Ф. Завгородняя // Дальневосточный журн. инфекционной патологии. – 2010. – № 16. – С. 131–141.
36. Завгородняя, Е. Ф. Дисбиотические нарушения кишечника. Спорные вопросы изучения проблемы / Е. Ф. Завгородняя // Дальневосточный журн. инфекционной патологии. – 2012. – № 21. – С. 191–195.
37. Зеленин, К. Н. Газовая хроматография в медицине / К. Н. Зеленин // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – № 11. – С. 20–25.
38. Зубарева, Н. А. О возможном механизме инфицирования желчных путей при холелитиазе / Н. А. Зубарева, П. Я. Сандаков, Т. И. Карпунина // Анналы хирургии. – 1998. – № 1. – С. 55–57.
39. Изучение малых молекул микробного происхождения в крови человека с применением хромато-масс-спектрометрии / Н. В. Белобородова [и др.] // Клинич. лаб. диагностика. – 2005. – № 9. – С. 78.
40. Изучение процесса образования биопленки патогенными микроорганизмами на поверхности почечных камней / Э. Р. Толордава [и др.] // Клинич. лаб. диагностика. – 2010. – № 9. – С. 31–32.
41. Ильина, Т. С. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и

системы регуляции их развития / Т. С. Ильина, Ю. М. Романова, А. Л. Гинцбург // Генетика. – 2004. – № 40. – С. 1–12.

42. Ильченко, А. А. Желчнокаменная болезнь / А. А. Ильченко. – М. : Анахарсис, 2004. – 200 с.

43. Ильченко, А. А. К вопросу классификации желчнокаменной болезни / А. А. Ильченко // Эксперим. и клинич. гастроэнтерология. – 2004. – № 1. – С. 8–12.

44. Ильченко, А. А. Классификация желчнокаменной болезни / А. А. Ильченко // Терапевт. архив. – 2004. – № 2. – С. 75–79.

45. Использование высокоэффективной жидкостной и газовой хроматографии в медицинских исследованиях / Е. М. Королева [и др.] // Клинич. лаб. диагностика. – 2004. – № 9. – С. 66–67.

46. Использование лапароскопической холецистэктомии в лечении деструктивных форм острого холецистита / А. П. Уханов [и др.] // Вестник хирургии. – 2010. – Т. 169, № 2. – С. 15–19.

47. К вопросу о лечении желчнокаменной болезни и ее осложнений / В. В. Бирюков [и др.] // Вестн. клинич. больницы № 51. – 2013. – Т. V, № 5 (2). – С. 25–27.

48. Карпищенко, А. И. Метод газожидкостной хроматографии в диагностике генерализованной хирургической инфекции / А. И. Карпищенко, Г. И. Элькин // Клинич. лаб. диагностика. – 2000. – № 9. – С. 11.

49. Каширская, Н. Ю. Значение пробиотиков и пребиотиков в регуляции кишечной микрофлоры / Н. Ю. Каширская // Рус. мед. журн. – 2000. – № 13–14. – С. 572–576.

50. Клиническая хирургия: национальное руководство: в 3 т. / под ред. В. С. Савельева, А. И. Кириенко. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2009. – Т. 2. – 832 с.

51. Клинические лекции по абдоминальной хирургии : учеб. пособие / Н. В. Мерзликин [и др.]. – Томск : ТМЛ-Пресс, 2007. – 496 с.

52. Клюев, Н. А. Современные методы масс-спектрометрического анализа органических соединений / Н. А. Клюев, Е. С. Бродский // Рос. хим. журн. (Журн. рос. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева). – 2002. – Т. XLVI, № 4. – С. 57–63.

53. Козлова, Е. В. Микробиоценоз кишечника при билиарной патологии / Е. В. Козлова, С. В. Волков // Тезисы VI съезда Научного общества гастроэнтерологов России, 1-3 февраля 2006 года. – М., 2006. – С. 126–127.
54. Крыжановская, Н. А. Хроматографические методы исследования в практике клиничко-диагностической лаборатории / Н. А. Крыжановская, Т. А. Басалгина // Клинич. лаб. диагностика. – 2004. – № 9. – С. 63а–63.
55. Крымцева, Т. А. Обнаружение маркеров микроорганизмов в составе жирных кислот биологических жидкостей урогенитального тракта и исследование их диагностической значимости / Т. А. Крымцева // Клинич. лаб. диагностика. – 2004. – № 9. – С. 67а–67.
56. Кузнецова, Г. Г. О стадиях нарушения биоценоза кишечника при хронических колитах / Г. Г. Кузнецова // Сов. медицина. – 1972. – № 11. – С. 67.
57. Куликов, А. Г. Эффективность раннего восстановительного лечения пациентов, перенесших холецистэктомию / А. Г. Куликов, М. Д. Ардатская, Н. Ю. Сарапулова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. – № 9. – С. 97–102.
58. Лапароскопическая холецистэктомия через гастроскоп – первый шаг на пути к транслюминальной эндоскопической хирургии (NOTES) / Ю. Г. Старков [и др.] // Хирургия. – 2008. – № 5. – С. 70–72.
59. Лапароскопические операции при остром холецистите / М. Ф. Черкасов [и др.] // Хирургия. – 2004. – № 1. – С. 15–18.
60. Лопухов, Л. В. Полимеразная цепная реакция в клинической лабораторной диагностике / Л. В. Лопухов, М. В. Эйдельштейн // Клинич. микробиология и антимикробная терапия. – 2000. – Т. 2, № 3. – С. 96–106.
61. Лямин, А. В. Проблемы в медицине, связанные с бактериальными плёнками / А. В. Лямин, Е. А. Боткин, А. В. Жестков // Клинич. микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 4. – С. 268–275.
62. Магомедов, М. С. Синдром нарушенного пищеварения при желчно-каменной болезни: этиопатогенез, диагностика и принципы лечения / М. С. Магомедов, В. И. Ревякин, В. А. Петухов // Анналы хирургии. – 2007. – № 1.

– С. 11–18.

63. Максименко, В. Б. Нарушение концентрационной и моторно-эвакуаторной функции желчного пузыря при холецистолитиазе / В. Б. Максименко // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2006. – № 4. – С. 24–28.

64. Мараховский, Ю. Х. Желчнокаменная болезнь: современное состояние проблемы / Ю. Х. Мараховский // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2003. – № 1. – С. 81–92.

65. Методы общей бактериологии : в 3 т. / ред. Ф. Герхардт [и др.] ; пер. с англ. Е. Н. Кондратьева, Л. В. Калакуцкий. – М. : Мир, 1983. – Т. 1. – 536 с.

66. Микробиологическая диагностика и выбор антимикробной терапии инфекции желчевыводящих путей / В. Г. Фирсова [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. – 2015. – Т. 20, № 1. – С. 124–131.

67. Микробиологические аспекты хирургической патологии билиарной системы / В. А. Черкасов [и др.] // Вестн. хирургии им. И.И. Грекова. – 2003. – № 2. – С. 109–113.

68. Минилапаротомные технологии при желчнокаменной болезни: системный подход или хирургическая эквilibристика / А. М. Шулутко [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. – 2012. – № 2. – С. 34–41.

69. Минимально инвазивные операции при холецистохоледохолитиазе / А. М. Шулутко [и др.] // Анналы хирургической гепатологии. – 2013. – № 1. – С. 38.

70. Минушкин, О. Н. Нарушение баланса микрофлоры и ее коррекция / О. Н. Минушкин, Г. А. Елизаветина, М. Д. Ардатская // Эффективная фармакотерапия. – 2013. – № 41. – С. 16–20.

71. Михайлова, Е. С. Микробиоценозы эзофагогастроудоденальной зоны у больных с патологией желчевыводящих путей : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 03.00.07 / Михайлова Елена Сергеевна. – М., 2009. – 24 с.

72. О роли инфекции *H. pylori* в диагностике и лечении желчнокаменной болезни (ЖКБ) / Х. Х. Мансуров [и др.] // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2006. – № 5. – С. 98.

73. Об изменении фармакологического действия некоторых

антибактериальных препаратов в присутствии желчи / Т. И. Карпунина [и др.] // Клинич. лаб. диагностика. – 1998. – № 9. – С. 36.

74. Образование биопленок *Listeria monocytogenes* при взаимодействии с растительными клетками / Г. В. Годова [и др.] // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. – 2013. – Т. 2, № 9 (13). – С. 62–69.

75. Определение микробной флоры пигментных желчных камней на основе анализа гена 16S рибосомальной РНК / А. К. Ларин [и др.] // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2009. – № 5. – С. 49–54.

76. Опыт лечения острого калькулезного холецистита у больных пожилого и старческого возраста / А. А. Чумаков [и др.] // Клинич. геронтология. – 2008. – № 4. – С. 67–70.

77. Осипов, Г. А. Мультиионный скрининг маркеров микроорганизмов в биологических жидкостях *in situ* при диагностике инфекции и дисбиозов методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии / Г. А. Осипов // Клинич. лаб. диагностика. – 2004. – № 9. – С. 67d–67.

78. Осипов, Г. А. Опыт применения масс-спектрометрии микробных маркеров в лабораторной диагностике / Г. А. Осипов, Н. Н. Зыбина, Г. Г. Родионов // Мед. алфавит. – 2013. – Т. 1, № 3. – С. 64–67.

79. Осипов, Г. А. Применение метода масс-спектрометрии микробных маркеров в клинической практике / Г. А. Осипов, Г. Г. Родионов // Поликлиника. Лаборатория ЛПУ. – 2013. – Спецвып. № 2. – С. 68–73.

80. Осипов, Г. А. Хромато-масс-спектрометрический анализ микроорганизмов и их сообществ в клинических пробах при инфекциях и дисбиозах / Г. А. Осипов // Проблемы аналитической химии / ред. Г. К. Будников. М. : Наука, 2010. – С. 284–357.

81. Показатели литогенности желчи у лиц с и без наследственной отягощенности по желчнокаменной болезни / И. Н. Григорьева [и др.] // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2006. – № 5. – С. 94.

82. Поспелова, С. В. К совершенствованию тактики лабораторного обследования больных с хроническим холециститом / С. В. Поспелова,

Т. И. Карпунина, Д. Ю. Соснин // Клиническая лабораторная диагностика. – 1999. – № 12. – С. 19.

83. Постхолецистэктомический синдром в хирургии острого холецистита у больных пожилого и старческого возраста / В. Н. Чернов [и др.] // Клинич. геронтология. – 2008. – № 4. – С. 26–29.

84. Применение и метрологическое обеспечение газовой хроматографии для целей здравоохранения / А. В. Астахов [и др.] // Поликлиника. Лаборатория ЛПУ. – 2014. – Спецвып. № 5. – С. 20–21.

85. Принципы консервативного лечения острого холецистита на ранних стадиях заболевания : пособие для врачей, клинических ординаторов, интернов, студентов старших курсов мед. вузов / сост. Ю. С. Винник, Л. В. Кочетова, Д. В. Черданцев ; Красноярский медицинский университет. – Красноярск : Новые компьютерные технологии, 2008. – 49 с.

86. Пробиотическая коррекция антибиотик-ассоциированного дисбактериоза кишечника у детей / С. В. Бельмер [и др.] // Вопр. соврем. педиатрии. – 2007. – № 3. – С. 89–93.

87. Прогностическое значение исследования метаболитов кишечной микрофлоры в различных биосубстратах у больных с калькулезным холециститом / М. Д. Ардатская [и др.] // Эксперим. и клин. гастроэнтерология. – 2008. – № 5. – С. 16–22.

88. Прозоркина, Н. В. Основы микробиологии, вирусологии, иммунологии : учеб. пособие / Н. В. Прозоркина, Л. А. Рубашкина. – Ростов н/Д : Феникс, 2012. – 378 с.

89. Рамазанов, Р. М. Опыт 1000 лапароскопических холецистэктомий в условиях районной больницы / Р. М. Рамазанов // Хирургия. – 2000. – № 10. – С. 28–30.

90. Результаты использования различных вариантов холецистэктомии у больных старших возрастных групп / С. Р. Добровольский [и др.] // Хирургия. – 2011. – № 9. – С. 11–14.

91. Результаты лечения дисбиоза при синдроме нарушенного

пищеварения после холецистэктомии / М. С. Магомедов [и др.] // *Анналы хирургии.* – 2007. – № 5. – С. 38–45.

92. Результаты лечения синдрома нарушенного пищеварения после холецистэктомии / М. С. Магомедов [и др.] // *Анналы хирургии.* – 2007. – № 4. – С. 49–56.

93. Роль сальмонелл в билиарном литогенезе / Л. В. Диденко [и др.] // *Эксперим. и клинич. гастроэнтерология.* – 2009. – № 3. – С. 44–47.

94. Роль уреазопродукции и способности к биопленкообразованию уропатогенов в генезе камней почек / Т. С. Перепанова [и др.] // *Рациональная фармакотерапия в урологии : материалы VII Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием.* – М., 2013. – С. 10–11.

95. Руководство по хирургии печени и желчевыводящих путей / А. Е. Борисов [и др.]. – СПб. : Предприятие ЭФА, 2002. – Т. 1. – 448 с.

96. Рыбачков, В. В. Острый холецистит у больных старческого возраста / В. В. Рыбачков, Е. Н. Кабанов, М. И. Лимица // *Клинич. геронтология.* – 2008. – № 4. – С. 57–61.

97. Серова, Е. В. Профилактика постхолецистэктомического синдрома у больных острым калькулезным холециститом : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.01.17 / Серова Екатерина Валерьевна. – Красноярск, 2010. – 25 с.

98. Скворцова, Т. Э. Комплексный подход к лечению больных желчнокаменной болезнью / Т. Э. Скворцова, С. И. Ситкин, П. В. Селиверстов // *Врач.* – 2011. – № 4. – С. 2–6.

99. Скворцова, Т. Э. Литолитическая терапия препаратом «Урсофальк» у больных с желчнокаменной болезнью и его влияние на состояние гепатобилиарной системы и микробиоценоз кишечника / Т. Э. Скворцова // *Гастроэнтерология Санкт-Петербурга.* – 2009. – № 4. – С. 11–13.

100. Современные аспекты диагностики и хирургического лечения больных с механической желтухой неопухолевого генеза / Р. Б. Мумладзе [и др.] // *Анналы хирургии.* – 2004. – № 4. – С. 41–45.

101. Современные подходы к литолитической терапии и профилактике

желчнокаменной болезни / С. А. Алексеенко [и др.] // Тихоокеанский мед. журн. – 2006. – № 1. – С. 14–17.

102. Тальман, И. М. Хирургия желчного пузыря и желчных протоков / И. М. Тальман. – Л. : Гос. изд-во мед. литературы, 1963. – 217 с.

103. Теслюк, И. И. Оценка липидного комплекса сыворотки крови и желчи больных желчно-каменной болезнью / И. И. Теслюк, В. Г. Мишалов, Т. С. Брюзгина // Клинич. лаб. диагностика. – 2004. – № 6. – С. 13–15.

104. Тимошин, А. Д. Непосредственные и отдаленные результаты лапароскопической холецистэктомии / А. Д. Тимошин, А. Л. Шестаков, А. Л. Барнаев // Анналы хирургии. – 2006. – №1. – С. 45–48.

105. Тонких, Ю. Л. *Helicobacter pylori* и заболевания желчевыводящих путей: существует ли взаимосвязь? / Ю. Л. Тонких, В. В. Цуканов // Врач. – 2013. – № 8. – С. 66–68.

106. Тотиков, В. З. Хирургическая тактика при деструктивном холецистите у больных пожилого и старческого возраста / В. З. Тотиков, В. Д. Слепушкин, А. Э. Кибизова // Хирургия. – 2005. – № 6. – С. 20–23.

107. Тупицын, М. В. Диагностика дисбиоза билиарного тракта у пациентов после холецистэктомии / М. В. Тупицын // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2006. – № 5. – С. 101.

108. Ускоренный способ идентификации возбудителей бактериемий с применением метода газовой хромато-масс-спектрометрии / Д. А. Попов [и др.] // Клини. лабораторная диагностика. – 2013. – № 5. – С. 54–58.

109. Формирование биопленок уропатогенами на мочевых камнях / Т. С. Перепанова [и др.] // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011. – Т. 7, № 2. – С. s212.

110. Формирование биопленок *Listeria monocytogenes* при взаимодействии с клетками овощных культур / Г. В. Годова [и др.] // Известия ТСХА. – 2013. – № 5. – С. 50–59.

111. Харитонова, Л. А. Желчнокаменная болезнь у детей / Л. А. Харитонова // Рос. журн. гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.

– 2006. – №1. – С. 61–71.

112. Хирургия печени и желчевыводящих путей / А. А. Шалимов [и др.]. – Киев : Здоров'я. – 1993. – 378 с.

113. Хирургия печени и желчных путей / Б. И. Альперович [и др.]. – Томск : Сиб. гос. мед. ун-т, 1997. – 608 с.

114. Хмельницкий, Р. А. Хромато-масс-спектрометрия / Р. А. Хмельницкий, Е. С. Бродский. – М. : Химия, 1984. – 216 с.

115. Ходаковская, С. П. Газохроматографический анализ высших жирных кислот липидов желчи / С. П. Ходаковская Т. С. Брюзгина, С. Н. Рева // Клинич. лаб. диагностика. – 1998. – № 6. – С. 17–18.

116. Холецистэктомия из минидоступа у больных калькулезным холециститом / Ю. Г. Алиев [и др.] // Хирургия. – 2013. – № 11. – С. 32–34.

117. Чахмахчев, С. Р. Эндовидеохирургические технологии лечения больных острым деструктивным холециститом и его осложнениями : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.27 / Чахмахчев Спартак Русланович. – Великий Новгород, 2009. – 24 с.

118. Черкасов, В. А. Антибиотики в хирургии желчных путей / В. А. Черкасов, Н. А. Зубарева, Э. С. Горовиц // Вестн. хирургии им. И.И. Грекова. – 2002. – № 2. – С. 111–114.

119. Чернеховская, Н. Е. Комбинированное лечение больных с острым холециститом, осложненным холедохолитиазом и механической желтухой / Н. Е. Чернеховская, И. В. Ярема, В. А. Кулиш // Вестн. хирургии им. И.И. Грекова. – 2001. – № 3. – С. 90–92.

120. Чернов, В. Н. Диагностика и лечение острого холецистита у больных пожилого и старческого возраста / В. Н. Чернов, И. В. Суздальцев. – Ростов н/Д : Изд-во РГМУ, 2002. – 280 с.

121. Шаповалова, Е. Н. Хроматографические методы анализа : метод. пособие для спец. курса / Е. Н. Шаповалова, А. В. Пирогов ; отв. ред. О. А. Шпигун. – М. : [Б. и.], 2007. – 109 с.

122. Шевела, А. И. Идеальный доступ для холецистэктомии: NOTES, SILS

или все-таки классическая лапароскопия? / А. И. Шевела, В. В. Анищенко, С. В. Гмыза // Эндоскоп. хирургия. – 2012. – № 4. – С. 15–18.

123. Шевела, А. И. Пути оптимизации малоинвазивной холецистэктомии / А. И. Шевела, В. В. Анищенко, С. В. Гмыза // Медицина и образование в Сибири. – 2012. – № 6. – С. 61–67.

124. Шевченко, Б. Ф. Органосохраняющие операции при одиночном камне в желчном пузыре / Б. Ф. Шевченко, А. М. Бабий // Здоровье Украины. – 2010. – № 2. – С. 18–19.

125. Шпак, А. В. Использование жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием в лабораторной медицине / А. В. Шпак, О. А. Шпигун // Клинич. лаб. диагностика. – 2005. – № 9. – С. 77а.

126. Шуб, Г. М. Современные технологии лабораторной экспресс-диагностики в клинической микробиологии / Г. М. Шуб, В. В. Зырянов, В. С. Липский // Клинич. лаб. диагностика. – 2000. – № 9. – С. 11.

127. Шулутко А. М. Минилапаротомия с элементами открытой лапароскопии в хирургическом лечении желчнокаменной болезни / А. М. Шулутко, М. И. Прудков, А. Г. Бебуришвили // Анналы хирургической гепатологии. – 1996. – № 1. – С. 132–135.

128. Щербинина, М. Б. Современная классификация желчнокаменной болезни / М. Б. Щербинина // Здоровье Украины. – 2011. – № 4. – С. 22–23.

129. Эндоскопия желчных протоков / Р. Б. Мумладзе, Ю. Ш. Розиков, А. П. Сельцовский [и др.] // Анналы хирургии. – 1999. – № 2. – С. 46–50.

130. Яковлев, В. П. Антибиотикотерапия бактериальных инфекций / В. П. Яковлев // Анналы хирургической гепатологии. – 2008. – № 1. – С. 12–15.

131. Aerobic bacterial isolates from choledochal bile at a tertiary hospital: Indian / S. Shivaprakasha [et al.] // Indian J. Pathol. Microbiol. – 2006. – Vol. 49, № 3. – P. 464–467.

132. Agrawal, R. M. Gallbladder Disease / R. M. Agrawal, S. Morrissey, S. Thakkar // Geriatric Gastroenterology / eds. C. S. Pitchumoni, T. S. Dharmarajan. – Verlag-Berlin-Heidelberg : Springer, 2012. – P. 421–428.

133. Alam, S. Antibiotic associated diarrhea in children / S. Alam, M. Mushtaq // *Indian Pediatrics*. – 2009. – Vol. 46, № 6. – P. 491–496.
134. Al-Salem, A. H. Cholelithiasis and choledocholithiasis / A. H. Al-Salem // *An Illustrated Guide to Pediatric Surgery* / A. H. Al-Salem. – Verlag-Berlin-Heidelberg : Springer, 2014. – P. 277–281.
135. Ambe, P. C. Is gallbladder inflammation more severe in male patients presenting with acute cholecystitis? [Electronic resource] / P. C. Ambe, S. A. Weber, D. Wassenberg // *BMC Surg.* – 2015. – Vol. 15. – URL : <http://www.biomedcentral.com/1471-2482/15/48>.
136. Biliary bacterial factors determine the path of gallstone formation / L. Stewart [et al.] // *Am. J. Surg.* – 2006. – Vol. 192, № 5. – P. 598–603.
137. Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains / E. Szczuka [et al.] // *Folia Microbiol.* – 2013. – Vol. 58, № 1. – P. 47–52.
138. Biofilms, infection, and antimicrobial therapy / eds. J. L. Pace, M. E. Pace, R. G. Finch. – Boca Raton : Taylor & Francis Group, 2006. – 495 p.
139. Biological features of biofilm-forming ability of *Acinetobacter baumannii* strains derived from 121 elderly patients with hospital-acquired pneumonia [Electronic resource] / D. Zhang [et al.] // *Clin. Exp. Med.* – 2014. – URL : <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10238-014-0333-2>.
140. Calvert, N. W. Laparoscopic cholecystectomy: a good by? A cost comparison with small-incision (mini) cholecystectomy / N. W. Calvert, G. P. Tory, A. G. Johnson // *Eur. J. Surg.* – 2000. – Vol. 166, № 10. – P. 782–786.
141. Carus, T. Single-port technique in laparoscopic surgery / T. Carus // *Chirurg.* – 2010. – Vol. 81, № 5. – P. 431–440.
142. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology / A. P. Tomaras [et. al.] // *Microbiology.* – 2008. – Vol. 154, Pt. 11. – P. 3398–3409.
143. ClpXP proteases positively regulate alginate overexpression and mucoid conversion in *Pseudomonas aeruginosa* / D. Qiu [et. al.] // *Microbiology.* – 2008. –

Vol. 154, Pt. 7. – P. 2119–2130.

144. Comparative analyses of proteins from *Haemophilus influenzae* biofilm and planktonic populations using metabolic labeling and mass spectrometry / D. M. Post [et al.] // BMC Microbiol. – 2014. – Vol. 14, № 1. – P. 329.

145. Detection of bacterial DNA in acute and chronic cholecystitis / R. Lemos [et al.] // Br. J. Surg. – 2010. – Vol. 97, № 4. – P. 532–536.

146. Detection of *Helicobacter hepaticus* in human bile samples of patients with biliary disease / T. Hamada [et al.] // Helicobacter. – 2009. – Vol. 14, № 6. – P. 545–551.

147. Does gender affect laparoscopic cholecystectomy? / S. Botaitis [et al.] // Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Tech. – 2008. – Vol. 18, № 2. – P. 157–161.

148. Donlan, R. M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R. M. Donlan, J. W. Costerton // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 15, № 2. – P. 167–193.

149. Dowling, R. H. Review: pathogenesis of gallstones / R. H. Dowling // Aliment. Pharmacol. Ther. – 2000. – Vol. 14, № 2. – P. 39–47.

150. Edlund, C. Effect on the human normal microflora of oral antibiotics for treatment of urinary tract infection / C. Edlund, C. E. Nord // J. Antimicrob. Chemoter. – 2000. – Vol. 46, Suppl. 1. – P. 41–48.

151. Enzyme multilayer coatings inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on urinary catheters / K. Ivanova [et al.] // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2015. – Vol. 99, № 10. – P. 4373–4385.

152. Flemming, H. C. The EPS matrix: the "house of biofilm cells" / H. C. Flemming, T. R. Neu, D. J. Wozniak // J. Bacteriol. – 2007. – Vol. 189, № 22. – P. 7945–7947.

153. Frequency of antibiotic-associated diarrhoea in 2462 antibiotic-treated hospitalized patients: a prospective study / J. Wiström [et al.] // J. Antimicrob. Chemoter. – 2001. – Vol. 47, № 1. – P. 43–50.

154. Fuller, R. Probiotics in man and animals / R. Fuller // J. Applied Bacteriology. – 1989. – Vol. 66. – P. 365–378.

155. Gallstones containing bacteria are biofilms: bacterial slime production and ability to form pigment solids determines infection severity and bacteremia / L. Stewart [et al.] // *J. Gastrointest Surg.* – 2007. – Vol. 11, № 8. – P. 977–983.

156. Gibson, G. R. Dietary modulation of the human colonic micro-biota: introducing the concept of prebiotics / G. R. Gibson, M. B. Roberfroid // *J. Nutr.* – 1995. – Vol. 125, № 6. – P. 1401–1412.

157. Giefer, M. J. Gallstone Disease in Children / M. J. Giefer, R. A. Kozarek // *Diseases of the Liver in Children* / eds. K. F. Murray, S. Horslen. – N.Y. : Springer, 2014. – P. 389–401.

158. Hall-Stoodley, L. Evolving concepts in biofilm infections / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // *Cell Microbiol.* – 2009. – Vol. 11, № 7. – P. 1034–1043.

159. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis / J. G. Fox [et al.] // *Gastroenterology.* – 1998. – Vol. 114, № 4. – P. 755–763.

160. Hrabe, J. E. Laparoscopic Cholecystectomy / J. E. Hrabe // *Operative Dictations in General and Vascular Surgery* / eds. J. J. Hoballah, C. E. H. Scott-Conner. – Verlag-Berlin-Heidelberg : Springer, 2012. – P. 357–361.

161. Incidence and risk factors of oral antibiotic-associated diarrhea in an outpatient pediatric population / D. Turke [et al.] // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* – 2003. – Vol. 37, № 1. – P. 22–26.

162. Intestinal microflora in early infancy: composition and development / S. Fanaro [et al.] // *Acta Paediatr. Suppl.* – 2003. – Vol. 91, № 441. – P. 48–55.

163. Investigation of cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 gene polymorphism in symptomatic gallstone disease / S. C. Shih [et al.] // *Hum. Immunol.* – 2011. – Vol. 72, № 4. – P. 355–358.

164. Isolation and characterization of cholic acid 7- α -dehydroxylating fecal bacteria from cholesterol gallstone patients / J. T. Wells [et al.] // *J. Hepatol.* – 2000. – Vol. 32. – P. 4–10.

165. *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in

- children / J. A. Vanderhoof [et al.] // *J. Pediatr.* – 1999. – Vol. 135, № 5. – P. 564–568.
166. Langwieler, T. E. Singleport access in laparoscopic cholecystectomy / T. E. Langwieler, T. Nimmesgern, M. Back // *Surg. Endosc.* – 2009. – Vol. 23, № 5. – P. 1138–1141.
167. Laparoscopic CBD exploration using a V-shaped choledochotomy [Electronic resource] / E. Y. Kim [et al.] // *BMC Surg.* – 2015. – Vol. 15. – URL : <http://www.biomedcentral.com/1471-2482/15/62>.
168. Laparoscopic cholecystectomy: consensus conference-based guidelines / F. Agresta [et al.] // *Langenbecks Arch. Surg.* – 2015. – Vol. 400, Iss. 4. – P. 429–453.
169. Lenzen, H. Cholelithiasis / H. Lenzen, T. Lankisch // *Springer Reference Innere Medizin* / eds. H. Lehnert. – Berlin-Heidelberg : Springer, 2015. – P. 1–8.
170. Ma, H. Non-invasive determination of conjugative transfer of plasmids bearing antibiotic-resistance genes in biofilm-bound bacteria: effects of substrate loading and antibiotic selection / H. Ma, J. D. Bryers // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – Vol. 97, № 1. – P. 317–328.
171. Magnetic resonance imaging of the solitary hepatic mass: direct correlation with pathology and computed tomography / D. A. Robinson [et al.] // *Clin. Radiol.* – 1987. – Vol. 38, № 6. – P. 559–568.
172. Mahe, E. Laparoscopic cholecystectomy follow up / E. Mahe // *Endoscopy.* – 1992. – Vol. 24. – P. 754–758.
173. McFarland, L.V. Risk factor for antibiotic-associated diarrhea / L. V. McFarland // *Ann. Med. Intern. (Paris).* – 1998. – Vol. 149, № 5. – P. 261–266.
174. McKay, A. Short- and long-term outcomes following percutaneous cholecystostomy for acute cholecystitis in high-risk patients / A. McKay, M. Abulfaraj, J. Lipschitz // *Surg. Endosc.* – 2012. – Vol. 26, № 5. – P. 1343–1351.
175. Medicinal treatments of cholesterol gallstones: old, current and new perspectives / P. Portincasa [et al.] // *Curr. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 16, №12. – P. 1531–1542.
176. *Microbial Biofilms. Methods and Protocols* / ed. G. Donelli. – N.Y. : Springer, 2014. – 380 p.

177. New insights in *Staphylococcus pseudintermedius* pathogenicity: antibiotic-resistant biofilm formation by a human wound-associated strain [Electronic resource] / A. Pompilio [et al.] // BMC Microbiol. – 2015. – URL : <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/15/109>.
178. Olsen, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance / I. Olsen // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2015. – Vol. 34, № 5. – P. 877–886.
179. Open, small-incision, or laparoscopic cholecystectomy for patients with symptomatic cholelithiasis. An overview of Cochrane Hepato-Biliary Group reviews / F. Keus [et al.] // Cochrane Database Syst. Rev. – 2010. – № 1. – CD008318.
180. Pascual, A. Pathogenesis of catheter-related infections: lessons for new designs / A. Pascual // Clin. Microbiol. Infect. – 2002. – Vol. 8, № 5. – P. 256–264.
181. Percutaneous cholecystostomy in acute cholecystitis; a retrospective analysis of a large series of 104 patients [Electronic resource] / A. Viste [et al.] // BMC Surg. – 2015. – Vol. 15. – URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2482/15/17>.
182. Periprothetischer Infekt des Hüftgelenks / H. M. L. Mühlhofer [et al.] // Der Orthopäde. – 2015. – Vol. 44, № 5. – P. 357–365.
183. Pigment gallstone pathogenesis: Slime production by biliary bacteria is more important than beta-glucuronidase production / L. Stewart, R. Ponce, A. L. Oesterk [et al.] // J. Gastrointest. Surg. – 2000. – Vol. 4, № 5. – P. 547–553.
184. Prasad, A. Sils without frills / A. Prasad, M. Kaur // Indian J. Surg. – 2012. – Vol. 74, № 3. – P. 270–273.
185. Reśliński, A. The impact of diclofenac and ibuprofen on biofilm formation on the surface of polypropylene mesh / A. Reśliński, S. Dąbrowiecki, K. Głowacka // Hernia. – 2015. – Vol. 19, № 2. – P. 179–185.
186. Sex differences in laparoscopic cholecystectomy / S. E. Thesbjerg [et al.] // Surg. Endosc. – 2010. – Vol. 24, № 12. – P. 3068–3072.
187. Single-incision Laparoscopic cholecystectomy versus laparoscopic cholecystectomy: a prospective randomized study / H. Sinan [et al.] // Surg. Laparosc. Endosc. Percutan. Techn. – 2012. – Vol. 22, № 1. – P. 12–16.
188. Single-port cholecystectomy in a patient with *situs inversus totalis*

presenting with cholelithiasis: a case report [Electronic resource] / M. V. de Campos Martins [et al.] // *J. Med. Case Rep.* – 2012. – Vol. 6. – URL : <http://www.jmedicalcasereports.com/content/6/1/96>.

189. Sullivan, A. Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora / A. Sullivan, C. Edlund, C. E. Nord // *Lancet Infect. Dis.* – 2001. – Vol. 1, № 2. – P. 101–114.

190. Surgery without scars: a report of transluminal cholecystectomy in a human being / J. Marescaux [et al.] // *Arch. Surg.* – 2007. – Vol. 142, № 9. – P. 823–826.

191. Synergistic effect and antibiofilm activity between the antimicrobial peptide coprisin and conventional antibiotics against opportunistic bacteria / I. S. Hwang [et al.] // *Curr. Microbiol.* – 2013. – Vol. 66, № 1. – P. 56–60.

192. Szabo, K. Laparoscopic cholecystectomy – review over 20 years with attention on acute cholecystitis and conversion / K. Szabo, A. Rothe, A. Shamiyeh // *Eur. Surg.* – 2012. – Vol. 44, № 1. – P. 28–32.

193. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections / J. W. Costerton [et al.] // *J. Clin Invest.* – 2003. – Vol. 112, № 10. – P. 1466–1477.

194. The identification of elusive microorganisms in the urothelium in woman with refractory lower urinary tract symptoms / A. U. Singh [et al.] // *Int. Urogynecol. J.* – 2015. – Vol. 26, Suppl. 1. – P. 162–163.

195. The lipopeptides pseudofactin II and surfactin effectively decrease *Candida albicans* adhesion and hydrophobicity / P. Biniarz [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 2015 – Vol. 108, № 2. – P. 343–353.

196. The pathophysiological role of bacterial biofilms in chronic sinusitis [Electronic resource] / J. Długaszewska [et al.] // *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* – 2015. – URL:<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00405-015-3650-5>.

197. Tonolini, M. Cross-sectional imaging of common and unusual complications after endoscopic retrograde cholangiopancreatography / M. Tonolini, A. Pagani, R. Bianco // *Insights Imaging.* – 2015. – Vol. 6, № 3. – P. 323–338.

198. Tran, M. Cholelithiasis / M. Tran, D. J. Deziel // *Common Surgical*

Diseases / eds. T. J. Saclarides, J. A. Myers, K. W. Millikan. – N.Y. : Springer, 2015. – P. 209–211.

199. Transcriptome analyses and biofilm-forming characteristics of a clonal *Pseudomonas aeruginosa* from the cystic fibrosis lung / J. Manos [et. al.] // *J. Med. Microbiol.* – 2008. – Vol. 57, Pt. 12. – P. 1454–1465.

200. Woodworth, B. A. Biofilms / B. A. Woodworth, J. N. Palmer // Nasal polyposis. Pathogenesis, medical and surgical treatment / eds. T. M. Önerci, B. J. Ferguson. – Verlag-Berlin-Heidelberg : Springer, 2010. – P. 75–81.

201. Yuran, B. D. Is the FXR the Fix for cholesterol gallstone disease? / B. D. Yuran, K. N. Lasaridis // *Hepatology.* – 2005. – Vol. 42, № 1. – P. 218–221.

СПИСОК ИЛЛЮСТРАТИВНОГО МАТЕРИАЛА

1	Рисунок 1 – Количество пациентов 2-й группы, оперированных в плановом порядке с применением трёх вариантов оперативного доступа.....	С. 56
2	Рисунок 2 – Количество пациентов и длительность камненосительства во 2-й группе.....	С. 57
3	Рисунок 3 – Количество пациентов и давность начала заболевания в 3–6-й группах.....	С. 59
4	Рисунок 4 – Количество пациентов 3–6-й групп, оперированных в экстренном и отсроченном порядке с применением трёх вариантов оперативного доступа.....	С. 60
5	Рисунок 5 – Количество пациентов и длительность камненосительства в 3–6-й группах.....	С. 61
6	Рисунок 6 – Напылительная установка SPI-Module Sputter/Carbon Coater System (SPI Inc., USA).....	С. 83
7	Рисунок 7 – Сканирующий электронно-ионный микроскоп Quanta 200 3D (FEI Company USA).....	С. 84
8	Рисунок 8 – Распределение пациентов 2–6-й групп в зависимости от предоперационного диагноза.....	С. 87
9	Рисунок 9 – Частота встречаемости различных гистологических форм калькулёзного холецистита.....	С. 88
10	Рисунок 10 – Высеваемость микроорганизмов при различных гистологических формах острого калькулёзного холецистита.....	С. 89
11	Рисунок 11 – Рост <i>Escherichia coli</i> на питательной среде при ООКХ при исследовании пузырной желчи.....	С. 89
12	Рисунок 12 – Рост <i>Enterococcus faecalis</i> на питательной среде при ООКХ при исследовании пузырной желчи.....	С. 90
13	Рисунок 13 – Рост колоний <i>Staphylococcus epidermidis</i> у пациента с ООКХ при исследовании пузырной желчи.....	С. 90

- 14 Рисунок 14 – Рост колоний *Staphylococcus epidermidis* у пациента с ООКХ на среде Ольницкого при исследовании пузырной желчи..... С. 90
- 15 Рисунок 15 – Рост *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* на питательных средах при различных гистологических формах ФКХ при исследовании пузырной желчи..... С. 91
- 16 Рисунок 16 – Рост колоний *Staphylococcus saprophyticus* при ФКХ при исследовании пузырной желчи..... С. 91
- 17 Рисунок 17 – Рост колоний *Acinetobacter calcoaceticus* у пациента с ГКХ при исследовании пузырной желчи..... С. 92
- 18 Рисунок 18 – Рост культур *Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli* при ФКХ при исследовании биоптата стенки желчного пузыря..... С. 93
- 19 Рисунок 19 – Спектр микроорганизмов, выделенных из желчи, биоптата стенки желчного пузыря и желчных конкрементов у больных калькулёзным холециститом..... С. 94
- 20 Рисунок 20 – Результат определения чувствительности аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов к основным антимикробным химиопрепаратам диско-диффузионным методом..... С. 140
- 21 Рисунок 21 – Результат определения чувствительности культуры *Streptococcus faecalis* к гентамицину, ампициллину и ципрофлоксацину диско-диффузионным методом..... С. 141
- 22 Рисунок 22 – Результат определения чувствительности культуры *Staphylococcus epidermidis* к ципрофлоксацину, левофлоксацину, эритромицину и амикацину диско-диффузионным методом..... С. 142
- 23 Рисунок 23 – Результат определения чувствительности культуры *Staphylococcus saprophyticus* к оксациллину, линкомицину, ципрофлоксацину и гентамицину диско-диффузионным методом..... С. 142
- 24 Рисунок 24 – Результат определения чувствительности культуры *Escherichia coli* к цефтазидиму, цефотаксиму, левофлоксацину, ампициллину, сульбактаму, пefлоксацину и амикацину

- диско-диффузионным методом..... С. 143
- 25 Рисунок 25 – Результат определения чувствительности культуры *Acinetobacter baumannii* к амикацину, пefфлоксацину левофлоксацину, цефотаксиму, цефтазидиму и ампициллин сульбактаму диско-диффузионным методом..... С. 144
- 26 Рисунок 26 – Результат определения чувствительности культуры *Pseudomonas aeruginosa* к антимикробным химиопрепаратам диско-диффузионным методом..... С. 145
- 27 Рисунок 27 – Результаты рентгеновского микроанализа, иллюстрирующие увеличение содержания кальция от центра к периферии желчного конкремента..... С. 148
- 28 Рисунок 28 – Поверхность камня с участками гладкой и пористой поверхности, крошковидными наложениями, тяжами..... С. 149
- 29 Рисунок 29 – Наружная поверхность желчного конкремента..... С. 149
- 30 Рисунок 30 – Кристаллоподобные структуры ↑, СТВ – соединительнотканное волокно, ФБ – фибробласты..... С. 151
- 31 Рисунок 31 – Фибробласт, соединительнотканные волокна и биоплёнки с бактериальными клетками на внутренней поверхности конкремента..... С. 151
- 32 Рисунки 32 – Визуализация анатомической связи биоплёнки с соединительнотканными тяжами..... С. 152
- 33 Рисунок 33 – Соединительнотканные волокна и биоплёнка с бактериями..... С. 153
- 34 Рисунок 34 – Микробная биоплёнка на поверхности конкремента..... С. 154
- 35 Рисунок 35 – Визуализация фибробластов среди массива соединительной ткани и отверстий на наружной поверхности камня.. С. 154
- 36 Рисунок 36 – Визуализация вегетативных форм и биоплёнки на поверхности скола желчного конкремента..... С. 155
- 37 Рисунок 37 – Визуализация бактериальной биоплёнки внутри конкремента..... С. 156

- 38 Рисунок 38 – Визуализация соединительной ткани и биоплёнки с бактериями после дегидратации..... С. 158
- 39 Рисунки 39 – Поверхность конкремента после обработки спиртом.... С. 159
- 40 Рисунок 40 – Внутренняя поверхность желчного пузыря..... С. 160
- 41 Рисунок 41 – Слизистая оболочка желчного пузыря с фиксированными псевдокристаллами холестерина..... С. 160
- 42 Рисунок 42 – Внутренняя поверхность общего желчного протока..... С. 161
- 43 Рисунок 43 – На внутренней поверхности конкремента имеются пустоты-отпечатки, по форме и размеру соответствующие бактериям..... С. 164
- 44 Рисунок 44 – Динамика среднего количества экв. клеток / г $\times 10^5$ грамположительных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов у больных 3-й группы..... С. 166
- 45 Рисунок 45 – Динамика среднего количества экв. клеток / г $\times 10^5$ грамположительных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов у больных 4-й группы..... С. 167
- 46 Рисунок 46 – Динамика среднего количества экв. клеток / г $\times 10^5$ грамотрицательных аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов у больных 3-й группы..... С. 167
- 47 Рисунок 47 – Динамика среднего количества экв. клеток / г $\times 10^5$ грамотрицательных аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов у больных 4-й группы..... С. 168
- 48 Рисунок 48 – Динамика среднего количества экв. клеток / г $\times 10^5$ грамположительных анаэробных неспорообразующих микроорганизмов у больных 3-й группы..... С. 168
- 49 Рисунок 49 – Динамика среднего количества экв. клеток / г $\times 10^5$ грамположительных анаэробных неспорообразующих микроорганизмов у больных 4-й группы..... С. 169
- 50 Рисунок 50 – Динамика среднего количества экв. клеток / г $\times 10^5$ грамположительных анаэробных спорообразующих

	микроорганизмов у больных 3-й группы.....	С. 169
51	Рисунок 51 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10 ⁵ грамположительных анаэробных спорообразующих микроорганизмов у больных 4-й группы.....	С. 170
52	Рисунок 52 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10 ⁵ грамотрицательных анаэробных микроорганизмов у больных 3-й группы.....	С. 170
53	Рисунок 53 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10 ⁵ грамотрицательных анаэробных микроорганизмов у больных 4-й группы.....	С. 171
54	Рисунок 54 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10 ⁵ грамположительных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов у больных 5-й группы.....	С. 171
55	Рисунок 55 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10 ⁵ грамположительных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов у больных 6-й группы.....	С. 172
56	Рисунок 56 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10 ⁵ грамотрицательных аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов у больных 5-й группы.....	С. 172
57	Рисунок 57 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10 ⁵ грамотрицательных аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов у больных 6-й группы.....	С. 173
58	Рисунок 58 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10 ⁵ грамположительных анаэробных неспорообразующих микроорганизмов у больных 5-й группы.....	С. 173
59	Рисунок 59 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10 ⁵ грамположительных анаэробных неспорообразующих микроорганизмов у больных 6-й группы.....	С. 174
60	Рисунок 60 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10 ⁵ грамположительных анаэробных спорообразующих	

	микроорганизмов у больных 5-й группы.....	С. 174
61	Рисунок 61 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10 ⁵ грамположительных анаэробных спорообразующих микроорганизмов у больных 6-й группы.....	С. 175
62	Рисунок 62 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10 ⁵ грамотрицательных анаэробных микроорганизмов у больных 5-й группы.....	С. 175
63	Рисунок 63 – Динамика среднего количества экв. клеток / г × 10 ⁵ грамотрицательных анаэробных микроорганизмов у больных 6-й группы.....	С. 176
64	Таблица 1 – Нормальные показатели количества микроорганизмов в разных отделах кишечника здорового человека.....	С. 40
65	Таблица 2 – Схемы назначения эмпирической антибактериальной химиотерапии у пациентов 3-й и 5-й групп.....	С. 62
66	Таблица 3 – Схемы назначения целевой антибактериальной химиотерапии у пациентов 4-й и 6-й групп.....	С. 62
67	Таблица 4 – Дополнительные методы исследования у пациентов 1–6-й групп.....	С. 66
68	Таблица 5 – Количественный и качественный состав нормофлоры кишечника.....	С. 74
69	Таблица 6 – Критерии интерпретации результатов определения чувствительности микроорганизмов: пограничные значения диаметров зон подавления роста и минимальные подавляющие концентрации (согласно МУК 4.2.1890-04).....	С. 77
70	Таблица 7 – Допустимые диапазоны значений диаметров зон подавления роста и минимальных подавляющих концентраций для контрольных штаммов микроорганизмов с обычными питательными потребностями МУК 4.2.1890-04.....	С. 79
71	Таблица 8 – Допустимые концентрации антибактериального препарата тест-системы АТВ АНА (BioMerieux, Франция) для	

	анаэробных микроорганизмов.....	C. 81
72	Таблица 9 – Количественный и качественный состав микрофлоры кишечника людей группы сравнения.....	C. 97
73	Таблица 10 – Результаты газожидкостной хромато-масс-спектрометрии крови и испражнений у здоровых лиц.....	C. 98
74	Таблица 11 – Результаты газожидкостной хромато-масс-спектрометрии у пациентов с хроническим калькулёзным холециститом.....	C. 102
75	Таблица 12 – Результаты газожидкостной хромато-масс-спектрометрии у пациентов с острым катаральным калькулёзным холециститом.....	C. 104
76	Таблица 13 – Результаты газожидкостной хромато-масс-спектрометрии у пациентов с острым флегмонозным калькулёзным холециститом.....	C. 106
77	Таблица 14 – Результаты газожидкостной хромато-масс-спектрометрии у пациентов с острым гангренозным калькулёзным холециститом.....	C. 108
78	Таблица 15 – Идентифицированные монокультуры анаэробных микроорганизмов в различных биологических материалах (анализ по идентифицированным монокультурам у конкретного человека)...	C. 120
79	Таблица 16 – Идентифицированные монокультуры анаэробных микроорганизмов в различных биологических материалах (анализ по идентифицированным монокультурам в различных средах).....	C. 122
80	Таблица 17 – Идентифицированные микробные ассоциации анаэробов в различных биологических материалах при калькулёзном холецистите.....	C. 124
81	Таблица 18 – Обратная пропорциональная взаимосвязь между формами калькулёзного холецистита и количеством идентифицированных монокультур и микробных ассоциаций.....	C. 128

82	Таблица 19 – Спектр ассоциаций аэробных и анаэробных микроорганизмов, идентифицированных при осложнениях острого флегмонозного калькулёзного холецистита.....	С. 129
83	Таблица 20 – Спектр ассоциаций аэробных и анаэробных микроорганизмов, идентифицированных при осложнениях острого гангренозного калькулёзного холецистита.....	С. 134
84	Таблица 21 – Идентификация возбудителей инфекции при осложнённых формах острого калькулёзного холецистита.....	С. 138
85	Таблица 22 – Результаты детекции микрофлоры отделяемого по дренажам из брюшной полости после холецистэктомии на фоне установки в ложе желчного пузыря гемостатической губки, пропитанной раствором диклофенака натрия.....	С. 177
86	Таблица 23 – Послеоперационные осложнения у больных 5-й и 6-й групп.....	С. 178