

На правах рукописи

Андреев Роман Иванович

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

14.01.17 – хирургия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Винник Юрий Семёнович

Научный консультант:

доктор медицинских наук

Диденко Любовь Васильевна

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор

Лобанов Сергей Леонидович

(Читинская государственная медицинская академия, заведующий кафедрой факультетской хирургии с курсом урологии)

доктор медицинских наук, профессор

Баранов Андрей Игоревич

(Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей, заведующий кафедрой хирургии, урологии и эндоскопии)

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» (г. Москва)

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2016 г. в «_____» часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.03 на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, 52; тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Новосибирского государственного медицинского университета (630091, г. Новосибирск, Красный проспект, д. 52; <http://ngmu.ru/dissertation/385>)

Автореферат разослан «_____» _____ 2016 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

М. Н. Чеканов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Примерно четверть населения земного шара старше 60 лет и треть населения старше 70 лет имеют камни желчного пузыря (Серова Е. В., 2010; Tran M. et al., 2015).

В России частота желчнокаменной болезни (ЖКБ) составляет от 5 до 25 % (Скворцова Т. Э. и соавт., 2013). Больные острым калькулёзным холециститом (ОКХ) составляют от 10 до 50 % от общего числа больных с острой хирургической патологией (Винник Ю. С. и соавт., 2010). Количество холецистэктомий (ХЭ) в России превышает 120 000–150 000 в год (Куликов А. Г. и соавт., 2010).

Основополагающую роль в развитии воспаления в желчном пузыре отводят микроорганизмам, в литературе имеются сведения о выявлении микроорганизмов в различных биологических средах у больных ЖКБ, ОКХ (Черкасов В. А. и соавт., 2003; Ардатская М. Д. и соавт., 2008; Серова Е. В., 2010).

Рутинные методы микробиологической диагностики имеют ряд известных недостатков, в том числе сложность выявления анаэробных микроорганизмов, роль которых в развитии воспаления желчного пузыря несомненна (Донецкая Э. Г., 2011).

Метод газожидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС), применяется в клинической практике достаточно давно (Зеленин К. Н., 1996; Осипов Г. А. и соавт., 2013). Однако в литературе не встречается данных о его применении в выявлении микробного пейзажа гепатодуоденальной зоны у больных ЖКБ, калькулёзным холециститом.

В последние годы появляются данные о бактериальных биоплёнках, которые образуются на абиотических поверхностях, а также играют ключевую роль в развитии хронических заболеваний. Находясь в биоплёнке, бактерии более защищены от воздействия неблагоприятных факторов, в том числе антимикробных химиопрепаратов, чем планктонные формы микроорганизмов (Афиногенова А. Г. и соавт., 2011; Виноградов И. В. и соавт., 2014; Гостев В. В. и соавт., 2010; Фирсова В. Г. и соавт., 2015; Перепанова Т. С. и соавт., 2011; Zhang D. et al., 2014; Ivanova K. et al., 2015; Mühlhofer H. M. L. et al., 2015). 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 холедоха.

Применение эмпирической антимикробной химиотерапии в ряде случаев не даёт желаемого эффекта от лечения и не может гарантировать элиминацию патогенной флоры, однако в то же время может привести к дисбиотическим процессам (Гасилина Т. В. и соавт., 2014; Alam S. et al., 2009).

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 хроматографии-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 хроматографии-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 хроматографии-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.

Основные 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 хроматографии-масс-спектрометрии концентрация жирных кислот, альдегидов и стеридов 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 диссертации. Основные положения работы представлены на Всероссийских научных конференциях «Молодёжь и наука – третье

тысячелетие» (Красноярск, 2007, 2008); на Международной заочной научной конференции «Медицина: вызовы сегодняшнего дня» (Челябинск, 2012); на I Международной заочной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы медицины» (Москва, 2012); на II Всероссийской научной конференции молодых учёных «Проблемы биомедицинской науки третьего тысячелетия» (Санкт-Петербург, 2012); на IV Международном научно-практическом конгрессе студентов и молодых учёных «Актуальные проблемы современной медицины» (Киев, 2012); на VII 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 РФ (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).

Внедрение. Методы диагностики и лечения внедрены в работу Красноярской межрайонной клинической больницы № 4, Красноярской межрайонной клинической больницы № 7, Дорожной клинической больницы на ст. Красноярск, Научно-исследовательского института медицинских проблем Севера (г. Красноярск).

Отдельные фундаментальные и прикладные положения работы включены в учебную программу кафедры общей хирургии им. проф. М. И. Гульмана Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого. Изданы методические рекомендации «Микробиологическое обоснование оптимизации лечебно-диагностических мероприятий при калькулёзном холецистите».

Публикации. По теме диссертации опубликованы 17 научных работ, в том числе 6 статей в журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов для публикаций основных результатов материалов диссертации.

Структура и объём работы. 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 дизайна исследования, в непосредственном участии на всех этапах работы, в 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, кафедре микробиологии им. доц. Б. М. Зельмановича, на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого, на базе лаборатории анатомии микроорганизмов Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Всего обследовано 145 пациентов обоего пола с ЖКБ, хроническим и острым калькулёзным холециститом и 30 здоровых человек в возрасте от 20 до 75 лет. Средний возраст составил $49,7 \pm 2$ года. В исследование вошли 121 (69,1 %) женщина и 54 (30,9 %) мужчины.

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

1-я группа – здоровые люди. У людей этой группы выполнялось исследование крови методом ГХ-МС, клинический анализ крови и мочи, биохимический анализ крови, ультрасонография брюшной полости, фиброэзофагогастродуоденоскопия.

Всем больным со 2-й по 6 группу выполнялась ХЭ (традиционным способом, лапароскопическая или из мини-доступа), с последующим исследованием пузырной желчи, биоптата стенки желчного пузыря, желчного конкремента методом ГХ-МС.

2-я группа ($n = 23$) – больные ЖКБ, хроническим калькулёзным холециститом (ХКХ), которым была выполнена ХЭ, перед этим проводилась антибиотикопрофилактика.

3-я группа ($n = 21$) – больные ЖКБ, острым катаральным калькулёзным

холециститом (ОККХ). Перед операцией больным проводилась антибиотикопрофилактика, после операции – эмпирическая антибактериальная химиотерапия.

4-я группа (n = 23) – больные ЖКБ, ОККХ. Перед операцией больным проводилась антибиотикопрофилактика, после операции – целевая антибактериальная химиотерапия.

5-я группа (n = 38) – больные ЖКБ, острым деструктивным калькулёзным холециститом. Перед и после операции больным проводилась эмпирическая антибактериальная химиотерапия.

6-я группа (n = 40) – больные ЖКБ, острым деструктивным калькулёзным холециститом. Перед и после операции больным проводилась целевая антибактериальная химиотерапия.

При необходимости у больных 2–6-й групп 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 обрабатывалась раствором диклофенака натрия 3 мл (75 мг).

Исследование биоматериалов методом ГХ-МС на хроматографе с масс-спектрометрическим детектором Agilent Technologies 6890N, Agilent Technologies 5975C (США, 2007 г.). Результат был представлен на хроматограмме.

Исследование образцов биоптатов стенки желчного пузыря, желчных конкрементов, забранных интраоперационно, а также фрагментов общего желчного протока, забранных на аутопсии, больных ЖКБ проводилось на сканирующем электронно-ионном микроскопе Quanta 200 3D (FEI Company USA) в режиме высокого вакуума под увеличением до 16 000 раз.

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).

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью программы SPSS Statistics 17.0.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Микробиологическое исследование биологических материалов показало высокий процент положительных результатов посевов при ФКХ – 89,1 % и ГКХ – 81,3 %. При ОККХ высеваемость микроорганизмов составила всего 18,2 %, при ХКХ – 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 %

Исследование крови методом газожидкостной хроматографии-масс-спектрометрии для детектирования микробных маркеров у здоровых лиц. 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. У 5 (16,7 %)

человек группы контроля дисбиоза выявлено не было. Таким образом, всего из 25 обследуемых у 3 установлена вторая степень дисбиоза кишечника (12 %), у 22 (88 %) – первая степень.

Поскольку эквивалентное количество метаболитов микробных тел, обнаруживаемое в крови, в первую очередь является отражением микробного фона кишечника, учитывая выявленный дисбиоз даже у клинически здоровых людей, необходимым является исследование испражнений методом ГХ-МС для верификации результатов идентификации микроорганизмов и их количества.

По результатам ГХ-МС крови и испражнений был установлен коэффициент, позволяющий верифицировать источник метаболитов микрофлоры в крови. Коэффициент был получен посредством вычисления отношения нормального количества экв. клеток / $г \times 10^5$ 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.

Исследование микрофлоры желчного пузыря методом ГХ-МС у больных калькулёзным холециститом. По результатам исследования были идентифицированы представители грамположительных аэробных и факультативно анаэробных споро- и неспорообразующих микроорганизмов, грамотрицательных аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных неспорообразующих микроорганизмов, грамположительных анаэробных споро- и неспорообразующих микроорганизмов, грамотрицательных анаэробных неспорообразующих микроорганизмов, а также дрожжеподобных грибов.

При ФКХ большее количество бактерий выявляются в пузырьной желчи ($172'859/г \times 10^5$) и биоптате стенки желчного пузыря ($870'621/г \times 10^5$). При этом стоит отметить значительно большее количество микроорганизмов в биоптате. Количество выявляемых микроорганизмов в желчном конкременте ($31'974/г \times 10^5$) приближается к показателям крови ($44'673/г \times 10^5$). При этом выявлены значимые различия в показателях пузырьной желчи и биоптата по

сравнению с кровью. Это, вероятно, также объясняется развитием острого гнойного воспаления уже с большей давностью начала заболевания по сравнению с ООКХ, 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. 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 ГКХ 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 топочности 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.

С развитием инфекционно-воспалительного процесса в желчном пузыре от ОКХ (54,3 %), ФКХ (59,9 %) и к ГКХ (65,3 %) прослеживается явная тенденция к увеличению количества ассоциаций микробных культур. Это позволяет сделать вывод о возрастающей роли микст-инфекций в развитии острого калькулёзного холецистита (таблица 4).

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.

Таблица 4 – 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 $> 2,31$)
Примечания: 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.			

У пациентов с ФКХ 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 %). При этом необходимо отметить, что в подавляющем большинстве случаев (87,7 %) при местном и распространённом перитоните обнаруживался перивезикальный инфильтрат разной степени выраженности.

Наиболее частыми возбудителями при формировании перивезикального инфильтрата были *Bacillus spp.* и *Actinomyces spp.* ($p \leq 0,01$ при $U \leq U_{кр.}$).

При развитии местного перитонита наиболее частыми возбудителями были представители *Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.* ($p \leq 0,01$ при $U \leq U_{кр.}$).

При развитии перивезикального абсцесса и распространённого перитонита значимых различий по аэробным и факультативно анаэробным микроорганизмам получено не было.

У пациентов с ГКХ 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 %). При этом

необходимо отметить, что в подавляющем большинстве случаев (91,2 %) при местном и распространённом перитоните обнаруживался перивезикальный инфильтрат разной степени выраженности.

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 ГХ-МС 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 ОКХ и его осложнения (таблица 5).

Таблица 5 – 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 %)
** $p < 0,01$ (при критерии Фишера $> 2,31$).					

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 ГХ-МС в качестве метода с достаточно высокой диагностической ценностью.

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

К ВОПРОСУ О РОЛИ МИКРОБНЫХ БИОПЛЁНОК В ЭТИОПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРОГО КАЛЬКУЛЁЗНОГО ХОЛЕЦИСТИТА

Посредством электронно-микроскопического исследования на 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.

Детальное изучение пористой наружной поверхности и внутренней поверхности камня показало, что она состоит из совокупности кристаллоподобных структур. Последние имели правильную геометрическую форму в виде параллелипипедов, между ними просматривались свободные пространства. Во всех образцах, как на внешней поверхности конкремента, так и на поверхности его скола, были выявлены бактериальные биоплёнки, которые состояли из плотного экзоклеточного матрикса, под которым визуализировались контуры бактерий. Следует отметить наличие тесной анатомической связи биоплёнок с соединительнотканными волокнами.

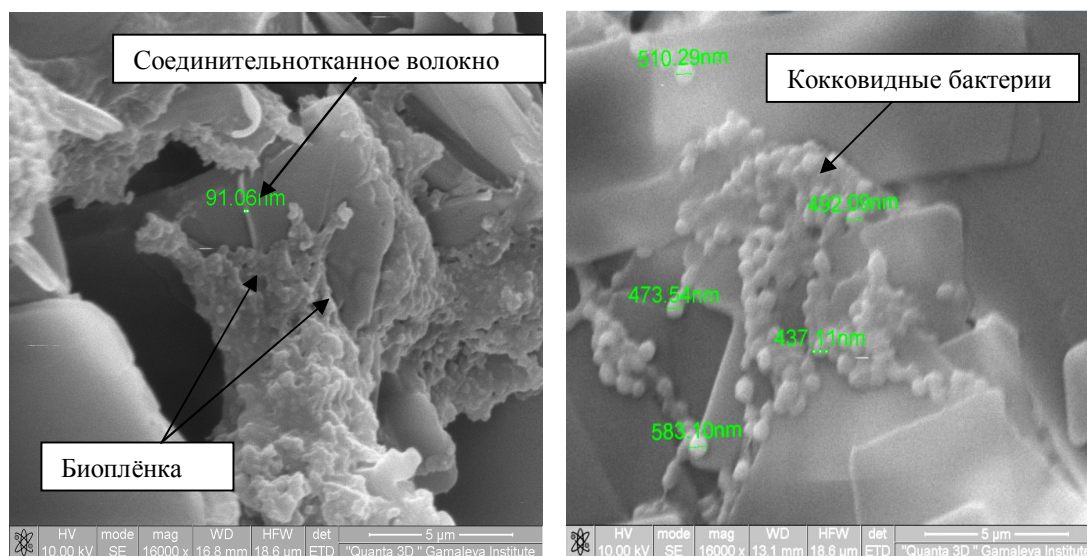


Рисунок 2 – Соединительнотканые волокна и биоплёнка с бактериями, а также вегетирующие микроорганизмы

Для исключения возможности инфекционных осложнений после ХЭ, особое внимание следует уделить антибиотикопрофилактике даже при ХКХ. Желательно, чтобы подбор антибактериального химиотерапевтического препарата осуществлялся не эмпирически, а с учётом данных, полученных при исследовании биоматериалов методом ГХ-МС.

Исследование эпителиальной выстилки желчного пузыря и общего желчного протока также показало наличие биоплёнок (рисунок 4).

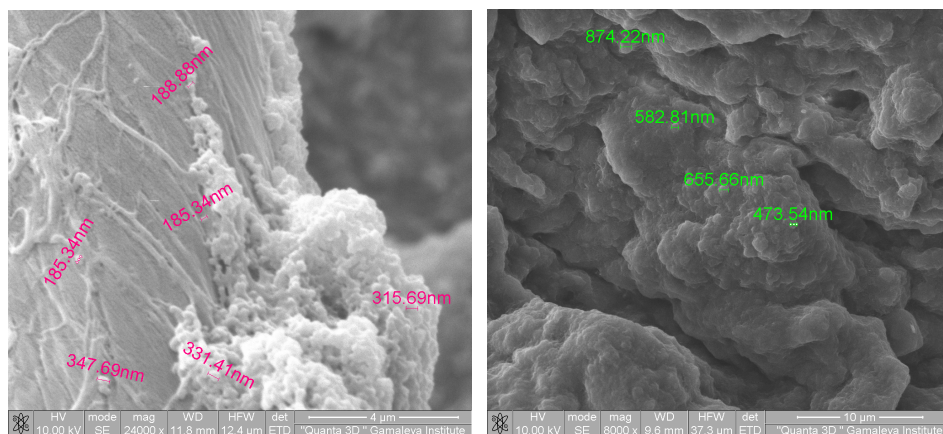


Рисунок 4 – Слизистая оболочка желчного пузыря (слева) и общего желчного протока (справа) с биоплёнкой

Таким образом, 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.

ОПТИМИЗАЦИЯ ЛЕЧЕБНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ ПРИ КАЛЬКУЛЁЗНОМ ХОЛЕЦИСТИТЕ

Повышение эффективности лечения больных калькулёзным холециститом. 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, линкозамины + аминогликозиды, линкозамины + фторхинолоны, линкозамины + 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.

На рисунках 6 и 7 отражена динамика среднего количества экв. клеток / $\text{г} \times 10^5$ грамположительных анаэробных спорообразующих микроорганизмов (*Clostridium spp.*, *Ruminicoccus spp.*) и грамотрицательных анаэробных микроорганизмов (*Eubacterium spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides fragilis*) в 5–6-й группах.

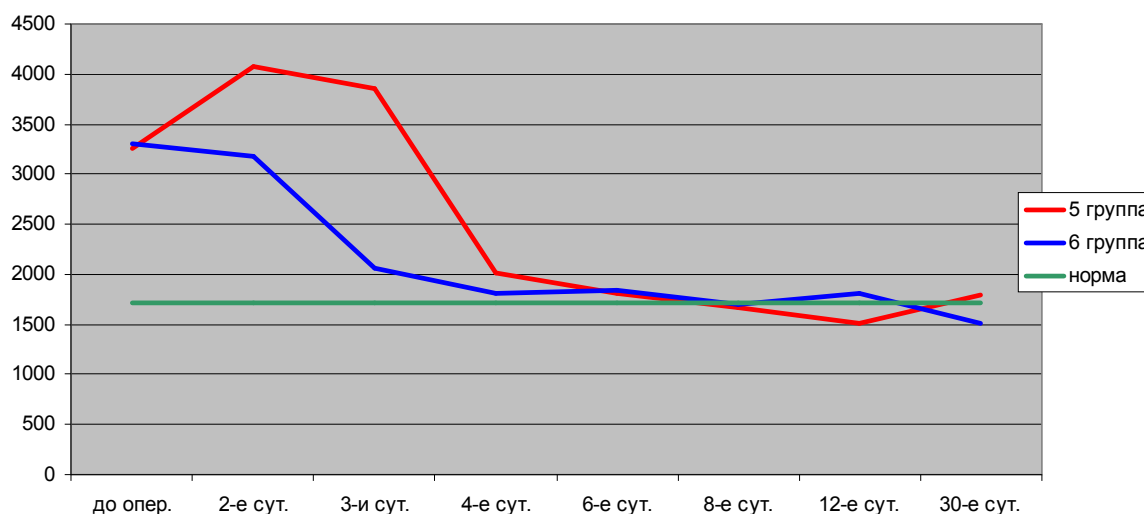


Рисунок 6 – Динамика среднего количества экв. клеток / $\text{г} \times 10^5$ грамположительных анаэробных спорообразующих микроорганизмов у больных 5-й и 6-й групп

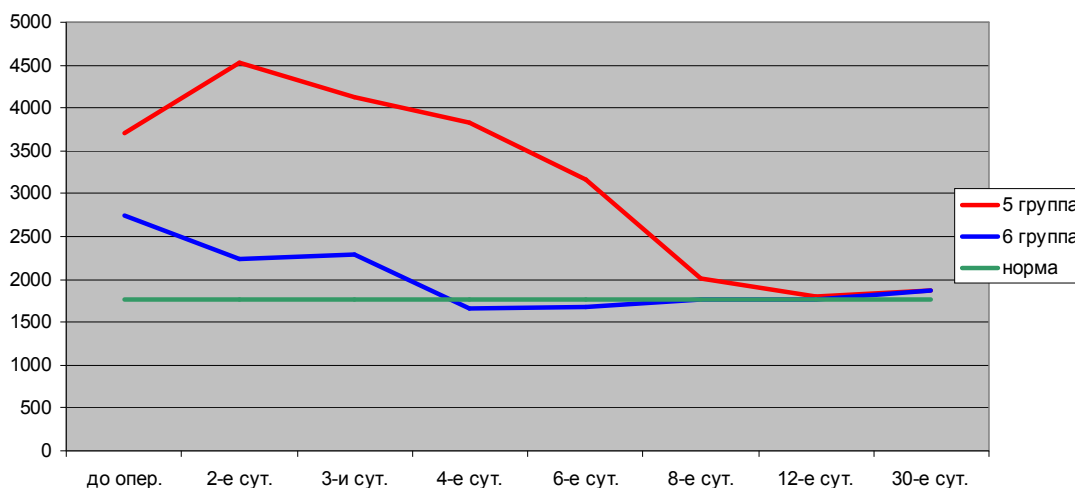


Рисунок 7 – Динамика среднего количества экв. клеток / г $\times 10^5$ грамотрицательных анаэробных микроорганизмов у больных 5-й и 6-й групп

Проведён анализ результатов детекции микрофлоры отделяемого по дренажам из брюшной полости после ХЭ на фоне установки в ложе желчного пузыря гемостатической губки, пропитанной раствором диклофенака натрия, у больных ОКХ, представленный в таблице 6. После ХЭ из лапаротомного доступа в 5-й группе осложнения (серома послеоперационного рубца, абсцесс послеоперационного рубца, серома ложа желчного пузыря) составили 4 случая (10,5 %), во 6-й группе (серома послеоперационного рубца, серома ложа желчного пузыря) – 2 случая (5 %).

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

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

Таким образом, у больных 6-й группы на фоне рационального применения антимикробных химиопрепаратов по сравнению с 5-й группой 23,7 % был отмечен меньший процент осложнений – 10 % ($\varphi < 0,05$ (при критерии Фишера $> 1,64$)).

Таблица 6 – 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 $\times 10^5$	Сред. к-во экв. кл./г $\times 10^5$	Крит. значимости	Сред. к-во экв. кл./г $\times 10^5$		Крит. значимости	Сред. к-во экв. кл./г $\times 10^5$		Критерий значимости
			2-я гр.		3-я гр.	4-я гр.		5-я гр.	6-я гр.	
Кровь	до опер	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 $T \leq T_{кр.}$	

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 хроматографии-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 хроматографии-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 хроматографии-масс-спектрометрии, позволяющей в первые часы поступления больного в стационар назначить целевую антибактериальную химиотерапию.

2. Определение отношения полученных результатов газожидкостной хроматографии-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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. ПЦР-диагностика анаэробной микробиоты при остром калькулёзном холецистите / Ю. С. Винник, Е. В. Серова, О. В. Перьянова, Т. В. Рукоосуева, А. В. Лейман, Р. И. Андреев // **Проблемы медицинской микологии**. – 2012. – Т 14, № 2. – С. 74.

2. Значение микробиологической диагностики и антимикробной химиотерапии при хирургической патологии гепатодуоденальной зоны / Ю. С. Винник, Е. В. Серова, О. В. Перьянова, Т. В. Рукоосуева, А. В. Лейман, Р. И. Андреев // **Врач**. – 2012. – № 10. – С. 24–26.

3. Консервативное и оперативное лечение желчнокаменной болезни / Ю. С. Винник, Е. В. Серова, Р. И. Андреев, А. В. Лейман, А. С. Струзик // **Фундаментальные исследования**. – 2013. – № 9. – С. 954–958.

4. Патогенез гнойно-септических осложнений при калькулёзном холецистите / Р. И. Андреев, Ю. С. Винник, Е. В. Серова, Л. В. Диденко, Н. В. Шевлягина, И. А. Прусов, А. О. Широбоков, Д. Э. Здзитовецкий, С. Г. Маслов, П. В. Базарин, А. В. Ковалев // **Врач**. – 2015. – № 7. – С. 75–78.

5. Результаты оперативного лечения пациентов с синдромом механической желтухи / Ю. С. Винник, Р. А. Пахомова, Е. В. Серова, А. В. Лейман, Р. И. Андреев // **Современные проблемы науки и образования**. – 2012. – № 5. – С. 1–8.

6. Особенности формирования микробных биопленок на различных субстратах. Возможность изучения биопленок на желчных конкрементах / Ю. С. Винник, Е. В. Серова, Р. И. Андреев, О. В. Перьянова, Т. В. Рукосуева, А. В. Лейман, Е. И. Мичуров // **Современные проблемы науки и образования**. – 2013. – № 5. – С. 1–8.

7. Хирургическая коррекция синдрома механической желтухи / Ю. С. Винник, Р. А. Пахомова, Е. В. Серова, А. В. Лейман, Р. И. Андреев // Сибирский медицинский журнал (г. Томск). – 2012. – Т. 27, № 3. – С. 116–119.

8. The microflora diagnostics at cholelithiasis / Yu. S. Vinnik, E. V. Serova, O. V. Peryanova, T. V. Rukosueva, A. V. Leyman, R. I. Andreev, Yu. V. Kotlovsky, O. S. Kotlovskaya // *European journal of natural history*. – № 1 for 2013 year. – P. 11–14.

9. Выявление роли микроорганизмов в патогенезе и клинических проявлениях острого калькулезного холецистита / Е. В. Серова, Д. Д. Бледнова, Е. Б. Конева, М. А. Черепнин, Р. И. Андреев, В. В. Карпухин // 71-я Международная итоговая студенческая научно-практическая конференция, посвященная 130-летию со дня рождения профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого и 65-летию КрасГМА. – Красноярск, Версо, 2007. – С. 500–501.

10. Микрофлора биотопов гепатодуоденальной системы при желчнокаменной болезни и постхолецистэктомическом синдроме / Е. В. Серова, Л. Е. Розова, В. В. Карпухин, М. А. Черепнин, Р. И. Андреев // Молодежь и наука – третье тысячелетие. Часть I. : Всероссийская научная конференция. – Красноярск, ГУЦМиЗ КРО НС Интеграция, 2008. – С. 393–396.

11. Особенности микрофлоры гепатодуоденальной системы у больных с желчнокаменной болезнью и ее значение в развитии постхолецистэктомического синдрома / Е. В. Серова, Л. Е. Розова, В. В. Карпухин, М. А. Черепнин, Р. И. Андреев // Сборник материалов 72-й итоговой студенческой научно-практической конференции с международным участием имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого, посвященной 100-летию со дня рождения профессора П. Г. Подзолкова. – Красноярск, Версо, 2008. – С. 499–502.

12. Микробиологический аспект желчнокаменной болезни / Ю. С. Винник, Е. В. Серова, О. В. Перьянова, Т. В. Рукосуева, А. В. Лейман, Р. И. Андреев, Р. А. Пахомова, Д. В. Трухин // Медицина: вызовы сегодняшнего

дня : материалы Международной заочной научной конференции. – Челябинск, Два комсомольца, 2012. – С. 70–75.

13. Значение микробиологической диагностики при калькулёзном холецистите / Р. И. Андреев, Е. В. Серова, А. В. Лейман, Р. А. Пахомова, О. С. Котловская // Актуальные проблемы современной медицины : материалы IV (66) Международного научно-практического конгресса студентов и молодых учёных // Украинский научно-медицинский молодёжный журнал. Спец. выпуск. – 2012. – № 3. – XXX. – 2012. – С. 8.

14. Идентификация анаэробных микроорганизмов методом полимеразной цепной реакции у больных желчнокаменной болезнью / Ю. С. Винник, Е. В. Серова, О. В. Перьянова, Т. В. Рукосуева, А. В. Лейман, Р. И. Андреев, Р. А. Пахомова, Ю. В. Котловский, О. С. Котловская // Всероссийская конференция хирургов, посвящённая 10-летию медицинского центра им. Р. П. Аскерханова : сборник научных трудов. – Махачкала, ДагПресс Медиа, 2012. – С. 52–53.

15. Андреев, Р. И. Социально-экономическая эффективность использования микробиологических методов диагностики у больных калькулёзным холециститом / Р. И. Андреев, Е. В. Серова // Молодой организатор здравоохранения : сборник научных статей студентов и молодых учёных, посвящённый памяти профессора В. К. Сологуба. – Красноярск, Версо, 2012. – С. 22–26.

16. Лечение желчнокаменной болезни (обзор литературы) / Ю. С. Винник, Е. В. Серова, Р. И. Андреев, А. В. Лейман, Д. В. Трухин // Актуальные вопросы современной хирургии : Сборник научных работ, посвященный 65-летию почетного профессора Красноярского государственного медицинского университета Ю. С. Винника. – Красноярск, Версо, 2013. – С. 51–54.

17. Андреев, Р. И. Микробиологические исследования при желчнокаменной болезни / Р. И. Андреев, Е. В. Серова // Сборник научных статей студентов и молодых учёных, посвящённый памяти профессора В. К. Сологуба Молодой организатор здравоохранения. – Красноярск, КрасГМУ, ООО Версо, 2013. – С. 15–19.