

ИЗДАНИЕ РОССИЙСКОЙ
АССОЦИАЦИИ СПЕЦИАЛИСТОВ
ПО ХИРУРГИЧЕСКИМ ИНФЕКЦИЯМ

ПРЕЗИДЕНТ РАСХИ
И ПРЕДСЕДАТЕЛЬ
РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА
ЖУРНАЛА

академик РАН и РАМН
В.С. Савельев



РОССИЙСКАЯ АССОЦИАЦИЯ СПЕЦИАЛИСТОВ
ПО ХИРУРГИЧЕСКИМ ИНФЕКЦИЯМ

Журнал входит в перечень
рецензируемых изданий,
рекомендованных ВАК
для опубликования основных научных
результатов диссертаций на соискание
ученой степени доктора и кандидата
наук (индекс в общероссийском
каталоге 29099)

**Издательство
«Эскулап»**

Почтовый адрес:
197110 Санкт-Петербург, а/я 328
телефон: +7 812 542 4045
E-mail: aesculap@mail.wplus.net

Зарегистрирован
в Государственном Комитете
Российской Федерации по печати.
Регистр. номер: ПИ №77-13526

Редакция не несет ответственности
за содержание рекламных материалов.
В статьях представлена точка зрения
авторов, которая может не совпадать
с мнением редакции журнала.

Полное или частичное воспроизведение
материалов, опубликованных
в журналах или на сайте издательства,
допускается только с письменного
разрешения редакции.

Все права защищены.
© «Эскулап», 2011



инфекции в хирургии

Том 9

№ 3, 2011

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главные редакторы:

И.А. Ерюхин
Б.Р. Гельфанд

Заместители главных редакторов:

Н.А. Ефименко, М.Д. Дибиров, С.А. Шляпников

М.С. Алексеев
С.Ф. Багненко
А.В. Бутров
С.Ю. Голубев (ответственный секретарь)
Е.Г. Григорьев
М.Д. Дибиров
Е.А. Евдокимов
А.А. Еременко
И.И. Затевахин
Р.С. Козлов
А.Л. Левит
Е.Б. Мазо
О.Д. Мишнев
В.А. Руднов
А.В. Сажин
А.И. Салтанов
Д.Н. Проценко (ответственный секретарь)
Л.Е. Цыпин
А.Е. Шестопалов
А.М. Шулутко
С.В. Яковлев
М.Б. Ярустовский

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Ю.А. Амирасланов (Москва)
В.Г. Абашин (Санкт-Петербург)
К.А. Апарцин (Иркутск)
А.Г. Бебуришили (Волгоград)
Н.В. Белобородова (Москва)
В.Б. Белобородов (Москва)
Rinaldo Bellomo (Австралия)
Л.И. Винницкий (Москва)
В.М. Волжанин (Санкт-Петербург)
Е.К. Гуманенко (Санкт-Петербург)
А.А. Звягин (Москва)
А.Б. Земляной (Москва)
Л.П. Зуева (Санкт-Петербург)
Н.Н. Климко (Санкт-Петербург)
О.Б. Лоран (Москва)
Ю.С. Полушкин (Санкт-Петербург)
В.П. Сажин (Рязань)
С.В. Свиридов (Москва)
Я.Н. Шойхет (Барнаул)
А.И. Ярошецкий (Москва)

СОДЕРЖАНИЕ

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Профилактика инфекционных осложнений у пострадавших с политравмой при многоэтапном лечении переломов длинных костей конечностей

И. М. Самохвалов, В. Н. Ганин, М. Б. Борисов, В. В. Розбицкий, А. Р. Гребнев, В. В. Денисенко

3

Мониторинг штаммов и лекарственной чувствительности микроорганизмов Гомельского областного центра термической травмы, ран, раневой инфекции и реконструктивной хирургии

Ю. И. Ярец, Н. И. Шевченко, Л. Н. Рубанов

8

Иммунологические аспекты абдоминального сепсиса

В. Н. Чернов, Д. В. Мареев

12

Ранозаживляющая эффективность коллаген-хитозановых губок серии «Хитоскин»

Б. А. Парамонов, С. Ф. Антонов, Т. Ш. Нузаев, Н. Н. Золина, К. А. Некрасова, Д. Ю. Андреев, Я. Г. Свиридов, В. В. Панов, А. Г. Карнович

17

Инфекции кровотока, вызванные *Staphylococcus aureus*, в отделении реанимации для пострадавших с тяжелой термической травмой

Н. В. Сатосова, Л. П. Зуева, К. М. Крылов, А. Е. Гончаров, В. А. Савина

19

Применение CNP-терапии в лечении пациентов с локальными глубокими ожогами, страдающих сахарным диабетом

Л. Н. Рубанов, И. А. Славников, Ю. И. Ярец

23

Мальтиплексная ПЦР-диагностика интегронов резистентности возбудителей нозокомиальной инфекции

А. П. Соломенный, Н. А. Зубарева, А. Е. Гончаров, Н. В. Сатосова, К. М. Крылов

26

MLVA-генотипирование метициллинрезистентных штаммов золотистого стафилококка, циркулирующих в специализированных стационарах географически удаленных регионов России

А. Е. Гончаров, В. В. Колоджиева, Т. Н. Суборова, Н. В. Сатосова, В. Ю. Хорошилов, К. А. Азапов, Л. П. Зуева

28

Микробиологические аспекты антибактериальной терапии парапротезной инфекции, вызванной грамположительными возбудителями

С. А. Божкова, Р. М. Тихилов, В. Л. Разоренов, В. Г. Чутрис, Т. М. Петрова

31

Антибактериальная активность хитозановых гидрогелей с нанокластерами серебра

С. Ф. Антонов, И. В. Ларионов, Т. Ш. Нузаев, Е. В. Черняева, В. А. Бландова, И. Л. Потокин, К. А. Некрасова, Б. А. Парамонов, Д. Ю. Андреев, Д. А. Козулин

37

Профилактика инфекционных осложнений у пострадавших с политравмой при многоэтапном лечении переломов длинных костей конечностей

И. М. Самохвалов, В. Н. Ганин, М. Б. Борисов, В. В. Розбицкий, А. Р. Гребнев, В. В. Денисенко

Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург

Повреждения конечностей при политравме наблюдаются в 60–80% случаев — как в последних вооруженных конфликтах, так и в мирных условиях [1].

Тактика лечения переломов длинных костей при политравмах до сих пор остается предметом споров. Принцип однократной окончательной фиксации всех переломов при поступлении («early total care») в группе пациентов с наиболее тяжелыми травмами (политравмами) не может считаться оптимальным [2]. Исходя из современных данных о патофизиологии политравмы, агрессивное хирургическое лечение приводит к гиперактивации иммунной системы и развитию ранней полиорганной недостаточности [3, 4].

Для уменьшения вероятности неблагоприятного исхода хирургическое лечение повреждений конечностей разделяют на этапы. При поступлении используют минимально-травматичный внеочаговый остеосинтез аппаратами в упрощенной комплектации (АО, КСТ, Илизарова, гибрид). После стабилизации состояния пострадавшего осуществляют окончательную фиксацию погружными конструкциями — многоэтапная хирургическая тактика (МХЛ), или «damage control orthopedic» (DCO) [4–6].

Вопрос о риске инфекционных осложнений в ходе многоэтапного хирургического лечения при политравме остается предметом дискуссий. Так, R. Harwood и соавт. [7] сообщили об отсутствии различий в частоте инфекционных осложнений при DCO и первичном интрамедуллярном остеосинтезе, несмотря на более тяжелые повреждения в группе DCO. Однако при этом

отмечено, что контаминация медуллярного канала в ходе многоэтапного лечения наблюдалась в 4 раза чаще, а при стоянии аппарата внешней фиксации более 14 сут или наличии открытого перелома (3-го типа) возрастала еще больше. При боевых повреждениях инфекционные осложнения в ходе многоэтапного лечения встречались в 40% случаев [8]. Необходимость пребывания пострадавших во время второго этапа хирургического лечения в отделении интенсивной терапии повышает риск инфицирования раны открытого перелома и спицестержневых ран полирезистентными микробами. Высоким в этих условиях представляется риск колонизации и медуллярного канала [9].

Особенностью третьего этапа оперативного лечения повреждений конечностей у пострадавших с политравмой является имплантация металлоконструкций. Наличие массивных инородных тел является дополнительным фактором риска и в несколько раз повышает вероятность инфекционных осложнений в связи с формированием бактериальной биопленки на поверхности импланта.

В нашей стране относительно новым способом профилактики и лечения инфекционных осложнений в травматологии и ортопедии является использование смеси костного цемента и одного или нескольких антибактериальных препаратов. Однако мировой опыт применения цементно-антибактериальных имплантов (в виде «бус») насчитывает более 30 лет. С 90-х гг. прошлого века антибиотик-импрегнированный цемент начали наносить на интрамедуллярные конструкции.

Эффективность локального использования цементно-антибактериальных смесей для профилактики и лечения инфекций в области хирургического вмешательства (ИОНВ) в травматологии и ортопедии показана в ряде работ [10–12]. Сегодня антибиотик-импрегнированный цемент используется западно-европейскими специалистами при 95% всех ревизионных эндопротезирований [13]. Безопасность локальной антибиотикотерапии подтверждена как экспериментальными, так и клиническими исследованиями [14]. Стержни с цементно-антибактериальным покрытием могут изготавливаться как фабрично, так и интраоперационно, и те и другие показывают хорошую клиническую эффективность. Стержни, изготовленные интраоперационно, более распространены, а в нашей стране пока им нет альтернативы.

Цель исследования — оценка эффективности применения стержней с цементно-антибактериальным покрытием для профилактики инфекционных осложнений в ходе многоэтапного лечения переломов длинных костей конечностей.

Материалы и методы

В исследование были включены пострадавшие, доставленные в клинику в период с 2006 по 2010 г. Критерии включения: тяжелая и крайне тяжелая множественная и сочетанная травма с индексом оценки тяжести повреждений по шкале ВПХ-П (МТ) более 6 баллов ($\text{ISS} \geq 18$); повреждения конечностей (ВПХ-П более 2 баллов) с закрытыми и открытыми (1-го, 2-го, 3-го А типа по классификации Густило—Андерсена) переломами длинных костей; применение тактики МХЛ повреждений

конечностей; на третьем этапе МХЛ всем поступившим выполняли интрамедулярный остеосинтез с блокированием. Срок наблюдения за пациентами составил от 3 до 6 мес.

Истории болезни 194 пациентов были разделены на две группы в зависимости от способа профилактики инфекционных осложнений: контрольная группа — 126 пострадавших, которым проводили многоэтапное хирургическое лечение повреждений конечностей с профилактикой инфекционных осложнений парентеральным введением антибактериальных препаратов по стандартным схемам; основная группа — 68 пациентов, которым в ходе лечения (помимо парентерального введения антибиотиков) для профилактики инфекционных осложнений применяли интрамедулярные стержни с антибактериальным покрытием. При этом пострадавшим контрольной группы выполнено 140 операций, основной группы — 76.

Всем пострадавшим при поступлении в клинику после выполнения операций по поводу жизнеугрожающих последствий травмы проводили стабилизацию переломов костей конечностей аппаратами внешней фиксации как первый этап МХЛ. Для этого использовали аппараты КСТ, Илизарова в упрощенной комплектации или их комбинации.

На втором этапе лечения проводили интенсивную терапию до стабилизации состояния. У большинства пострадавших обеих групп длительность второго этапа превышала 10 сут ($20,0 \pm 2,3$ сут в контрольной группе и $12,0 \pm 4,3$ сут — в основной). При этом инфекционные осложнения в области введения чрескостных элементов наблюдали

в 63,4% случаев. В этих условиях в контрольной группе перед интрамедулярным остеосинтезом аппарат внешней фиксации демонтировали, выполняли иммобилизацию гипсовыми лонгетами или скелетным вытяжением до купирования воспалительного процесса и заживления спице-стержневых ран. Это сопровождалось удлинением второго этапа лечения, усилением болевого синдрома, потерей репозиции в той или иной степени, ограничением мер раннего реабилитационного периода, увеличением риска венозных тромбоэмболических осложнений. Использование стержней с цементно-антибактериальным покрытием позволяло осуществлять погружной остеосинтез сразу после демонтажа аппарата, не взирая на развившиеся инфекционные осложнения.

Помимо осложнений в области введения чрескостных элементов, нами выделены дополнительные факторы риска развития инфекционных осложнений, которые также являлись показанием к использованию стержней с цементно-антибактериальным покрытием у пациентов основной группы (табл. 1).

На этапе планирования производили посевы отделяемого спице-стержневых ран и ран при открытых переломах. *S. aureus* высеивался в 50,3% случаев, при этом метициллинрезистентные колонии получены в 10,8%, *Pseudomonas aeruginosa* — в 9,4%, *Acinetobacter* — в 4,6%, два и более микроорганизма высеяно в 22,7%. В зависимости от чувствительности микроорганизмов использовали Ванкомицин, Тиенам, Гентамицин, Амикацин. Количество препарата составляло 2–6 г на дозу цемента.

Следует отметить, что при бактериологическом исследовании

отделяемого из медуллярного канала, получаемого при его рассверливании, *S. aureus* высевали в 25% случаев, из них метициллинрезистентные колонии получены в 10%.

Для приготовления стержней с цементно-антибактериальным покрытием нами был использован способ, предложенный зарубежными коллегами [14] и успешно апробированный в нашей стране [10].

Для этого необходимы трубка, на 2–3 мм превышающая размер используемого стержня, шприц объемом 50–60 мл, зажимы, чашка для приготовления цементно-антибактериальной смеси, костный цемент, антибактериальный препарат(-ы). В силиконовую трубку вводят стержень с накрученным болтом для фиксации направляющего устройства для исключения засорения внутренней резьбовой части стержня. В порошок цемента вносят необходимое количество антибактериального препарата(-ов). Массу тщательно гомогенизируют. Далее отдельными порциями добавляют растворитель до получения вязкой смеси. Смесь переливают в шприц, с помощью которого под давлением вводят в трубку до равномерного распределения цементно-антибактериальной массы.

Во время полимеризации цемента трубку раскатывают по ровной поверхности для равномерного распределения цемента. На заключительной стадии затвердевания можно, при необходимости, смоделировать дистальный конец стержня с необходимым направлением скоса, девиации. После полного затвердевания цемента трубку разрезают и удаляют, рашпилем моделируют края. Мы предпочитаем рассверливать блокирующие отверстия перед введени-

Таблица 1. Распределение пациентов по факторам риска развития инфекционных осложнений (ИО) в ходе МХЛ

Группа	Открытые переломы		Применение АВФ более 10 сут		Перенесенные генерализованные ИО		ИО в области введения чрескостных элементов		Сочетание факторов	
	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
Контрольная, n=140	21	15,0	18	12,9	16	11,4	62	44,3	23	16,4
Основная, n=76	13	17,1	14	18,4	6	7,9	24	31,6	19	25
Всего, n=216	34	15,7	32	14,8	22	10,2	86	39,8	42	19,5

Примечание. АВФ — аппарат внешней фиксации

Таблица 2. Сравнительная характеристика заживления ран после проведения интрамедуллярного остеосинтеза в обеих группах

Группа	Неосложненное заживление		Поверхностные ИОХВ		Глубокие ИОХВ		Глубокие ИОХВ, потребовавшие удаления стержня	
	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%	абс. число	%
Контрольная, n=140	106	75,7 (67,8÷82,6%)	18	12,9 (7,8÷19,6%)	16	11,4 (7,6÷17,9%)	10	7,1 (3,5÷12,7%)
Основная, n=76	72	94,7 (87,1÷98,6)	3	4 (0,8÷11,1%)	1	1,3 (0,03÷7,1%)	1	1,3 (0,03÷7,1%)

Примечание. Различия между группами статистически значимы, $p<0,05$; в скобках указаны границы доверительного интервала

ем стержня. Следует помнить, что чем выше температура в операционной, тем быстрее происходит полимеризация цементной смеси. В период освоения методики для устранения временного ограничения порошок и растворитель охлаждали в течение нескольких часов в холодильнике. После демонтажа аппарата внешней фиксации, репозиции и рассверливания костномозгового канала подготовленный имплант устанавливали по стандартной методике.

Результаты и обсуждение

Инфекционные осложнения после интрамедуллярного остеосинтеза развились в контрольной группе в 34 случаях (24,3%), в основной — в 4 (5,3%), табл. 2.

В группе с использованием цемента у 3 пациентов развились поверхностные инфекционные осложнения, у 1 — глубокое в виде остеомиелита большеберцовой кости после открытого перелома 3-го А типа. Поверхностные инфекционные осложнения были купированы без удаления металлоконструкций. 11 пострадавшим (10 — из контрольной группы и 1 — из основной) в связи с развитием свищевой формы остеомиелита потребовалась повторная операция, заключавшаяся в удалении стержня, санационном рассверливании костномозгового канала с последующим реостеосинтезом стержнем с антибактериальным покрытием по результатам посевов либо в наложении аппарата внешней фиксации. После этого удалось достигнуть купирования воспалительного процесса и заживления ран. Сравнительная характеристика групп представлена в табл. 3.

Эффективность применения стержней с цементно-антибактериальным покрытием можно

Таблица 3. Сравнительная характеристика ряда показателей МХЛ у пострадавших

Показатель	Контрольная группа, n=140	Основная группа, n=76
Длительность применения аппаратов внешней фиксации, сут	16,0±4,8	12,0±4,3
Срок до окончательного остеосинтеза, сут	20,0±2,3	12,0±4,3*
Необходимость повторных операций, %	7,9	1,3*
Длительность стационарного лечения, сут	39,0±3,4	30,0±2,9*

* Различия статистически значимы

продемонстрировать следующим клиническим примером.

Пострадавший Н., 28 лет, доставлен в клинику спустя 1,5 ч после

Рис. 1. Фиксация перелома левой плечевой кости при поступлении

Рис. 2. 7-е сутки — инфекция в области применения стержней аппарата (*S. aureus* с титром 10⁵)



Рис. 3. Рентгенограмма после остеосинтеза интрамедуллярным стержнем с антибактериальным покрытием



получения травмы, полученной на производстве. При обследовании установлен диагноз: тяжелая

сочетанная травма головы, груди, конечностей. Открытая черепно-мозговая травма, ушиб головного

мозга средней степени. Рваная рана затылочной области слева. Закрытая травма груди с множественными переломами ребер слева, повреждением левого легкого. Ушиб легких. Левосторонний напряженный пневмоторакс. Множественная травма конечностей. Закрытый оскольчатый перелом хирургической шейки правой плечевой кости с повреждением правого лучевого нерва. Рваная рана задней поверхности правого плеча в нижней трети. Открытый (1-го типа по Густило) фрагментарный перелом диафиза левой плечевой кости с повреждением левого лучевого нерва. Ограниченная отслойка кожи в правой ягодичной области. Множественные ушибы и ссадины тела. Острая кровопотеря. Травматический шок II степени. Тяжесть повреждений по шкале ВПХ-П (МТ) 6,5 балла (ISS 19).

При поступлении пациенту выполнены операции: торакоцентез, дренирование левой плевральной полости по Бюлау; ушивание раны головы; закрытая репозиция, фиксация перелома левой плечевой кости в аппарате КСТ (рис. 1); вскрытие, дренирование ограниченной отслойки кожи.

На 7-е сутки отмечено поступление серозно-гнойного отделяемого из стержневых ран левого плеча. Отделяемое взято для бактериологического исследования, по результатам которого выделены колонии *S. aureus* с титром 10⁵. Аппарат демонтирован, произведена временная иммобилизация в гипсовой повязке (рис. 2). Сутки спустя произведена операция: закрытая репозиция, остеосинтез перелома левой плечевой кости интрамедуллярным стержнем с антибактериальным покрытием (костный цемент, Ванкомицин), рис. 3. Раны в области доступа зажили первичным натяжением, стержневые раны — вторичным (рис. 4). На 12-е сутки произведен остеосинтез перелома правой плечевой кости интрамедуллярным стержнем с блокированием. Пациент выписан на амбулаторное лечение на 42-е сутки. При контрольных осмотрах отмечено восстановление функции правого и левого лучевых нервов.

Рис. 4. 10-е сутки после операции — заживление ран

Выводы

Инфекционные осложнения в области применения чрескостных элементов в ходе многоэтапного хирургического лечения у пострадавших с политечникой составляют 63,4% (55,6–69,9%) и приводят к инфицированию медуллярного канала в 25% (15,8–36,3%) случаев.

Применение стержней с цементно-антибактериальным покрытием при многоэтапном хирургическом лечении снижает риск развития инфекционных осложнений в 4,5 раза.

Методика легко воспроизводима, безопасна, не требует дополнительного оборудования и значительных экономических вложений.

Литература

1. Быков И.Ю. Военно-полевая хирургия: Национальное руководство. М.: Гэотар-Медиа, 2009.
2. Pape H., Rixen D., Morley J. et al. Impact of the Method of Initial Stabilization for Femoral Shaft Fractures in Patients With Multiple Injuries at Risk for Complications (Borderline Patients) // Ann. Surg. 2007. Vol. 246. № 3. P. 491–501.
3. Keel M., Trentz O. Pathophysiology of polytrauma // Injury. 2005. № 36. P. 691–709.
4. Schmidt A., Anglen J., Nana D., Varecka T. Adult trauma: Getting Through the Night // J. Bone Jt Surg. Amer. 2010. № 92. P. 490–505.
5. Гуманенко Е.К. Политечника: травматическая болезнь, дисфункция иммунной системы, современная стратегия лечения. М.: Гэотар-Медиа, 2008.
6. Соколов В.А. Практическое применение концепции «DAMAGE CONTROL» при лечении переломов длинных костей конечностей у пострадавших с политечникой // Вестн. травматол. и ортопед. 2005. № 1. С. 3–6.
7. Harwood P., Giannoudis P., Probst C. et al. The risk of local infective complications after damage control procedures for femoral shaft fracture // J. Orthop. Trauma. 2006. № 20 (3). P. 181–189.
8. Mody R., Zapor M., Hartzell J. et al. Infectious Complications of Damage Control Orthopedics in War Trauma // J. Trauma. 2009. Vol. 67. Iss. 4. P. 758–761.
9. Bhadra A., Roberts C. Indications for Antibiotic Cement Nails // J. Orthop. Trauma. 2009. Vol. 23. № 5 (Suppl.) P. 26–30.
10. Иванов П.А., Соколов В.А., Бялик Е.И. и др. Применение интрамедуллярных блокируемых штифтов с активным антибактериальным покрытием при лечении тяжелых открытых переломов и их осложнений // Вестн. травматол. и ортопед. 2009. № 1. С. 13–18.
11. Куропаткин Г.В. Костный цемент в травматологии и ортопедии. Самара, 2008.
12. Meun E., Romano C., Crosby L., Hofmann G. (Eds.). Infection and Local Treatment in Orthopedic Surgery. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.
13. Ефименко Н.А., Грицок А.А., Середа А.П. и др. Профилактика инфекций области хирургического вмешательства в травматологии и ортопедии: использование антибиотиков в костном цементе // Инфекции в хир. 2009. № 2. С. 15–26.
14. Thonse R., Conway J. Antibiotic Cement-Coated Nails for the Treatment of Infected Nonunions and Segmental Bone Defects // J. Bone Jt Surg. Amer. 2008. № 90. P. 163–174.

Мониторинг штаммов и лекарственной чувствительности микроорганизмов Гомельского областного центра термической травмы, ран, раневой инфекции и реконструктивной хирургии

Ю. И. Ярец¹, Н. И. Шевченко², Л. Н. Рубанов³

¹ Гомельский государственный медицинский университет; ² Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека (Беларусь); ³ Гомельская городская клиническая больница № 1

По данным российских исследователей, гнойные инфекции ран составляют 12,5–38% в общей структуре нозокомиальных гнойно-септических инфекций [1]. Чрезвычайно актуальна проблема реинфицирования раневых поверхностей госпитальными штаммами с рук медицинского персонала, постельного белья, шовного и перевязочного материала в группах больных ожоговых отделений [1]. Длительное существование инфекции ран приводит к задержке процесса заживления и образования грануляционной ткани, осложнениям послеоперационного периода [2]. Появление высокорезистентных к применяемым антибактериальным препаратам штаммов микроорганизмов — возбудителей раневой инфекции диктует необходимость правильно подбора и рационального использования эффективных антибактериальных препаратов в каждом лечебном учреждении с учетом контингента больных и особенностей возбудителей внутрибольничной инфекции — как в стационаре в целом, так и в его конкретных отделениях [2, 3].

Цель исследования — изучение спектра микроорганизмов, выделенных из инфицированных локальных ран, и определение лекарственной чувствительности.

Материалы и методы

В исследование включены 58 пациентов (35 мужчин и 23 женщины от 20 до 65 лет) с локальными ранами разных сроков давности с признаками воспаления, находившихся на стационарном

лечении в Гомельском областном центре термической травмы, ран, раневой инфекции и реконструктивной хирургии. Все пациенты были переведены из хирургических стационаров районного уровня, где в большинстве случаев проводилась безуспешная местная санационная и эмпирическая антибактериальная терапия.

Этиология раневых повреждений была представлена следующим образом: локальные ожоги ($n=24$, площадь глубокого и пограничного ожога, степень IIIA, B–IV — от 0,1 до 4%); посттравматические (неожоговые) раны, вызванные механической травмой ($n=22$, площадь раны от 0,5 до 2%); недиабетические трофические язвы ($n=12$). В план предоперационного лечения ран включали традиционные методы с использованием перевязок с антисептическими растворами, мазями на полиэтиленгликолевой основе, а также применяли современные раневые покрытия, аппаратные методы лечения.

Материалом для исследования служило раневое отделяемое, сбор которого осуществляли стерильными туфферами и помещали в транспортную среду Amies. В течение 24 ч материал доставляли в клинико-диагностическую лабораторию Республиканского научно-практического центра радиационной медицины и экологии человека (Республика Беларусь). Посев раневого отделяемого выполняли методом секторов с использованием плотных питательных сред. Идентификация и определение лекарственной чувствительности выделенных

штаммов выполнена на полуавтоматическом анализаторе miniApi («BioMerieux», Франция). Из исследования исключали штаммы одного вида, выделенные повторно от одного и того же пациента.

Результаты исследований обработаны с применением программы Statistica 6.0 (USA). Для статистического анализа использован непараметрический критерий Крамера (V^2). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При анализе состава возбудителей, выделенных из раневого отделяемого, установлено, что микроорганизмы представлены в виде монокультуры (у 40 пациентов, 69%) и микробной ассоциации (у 18 пациентов, 31%).

Этиологическая структура микрофлоры раневого отделяемого в виде монокультуры микроорганизмов изображена на рис. 1.

Как видно из рис. 1, при обследовании пациентов с инфицированными ранами среди выделенных штаммов в этиологически значимом титре преобладали *Staphylococcus spp.* (67,5%), большинство которых было представлено коагулазо-позитивными *S. aureus* (95%). У 3 пациентов были получены коагулазо-негативные *S. simulans*, *S. haemolyticus*. Доминирующую роль стафилококков как этиологического агента гнойного воспаления обусловлена тем, что эти микроорганизмы являются представителями нормальной микрофлоры кожи и слизистой оболочки. При этом наличие раневой поверхности является «входными воротами» для *Staphylococcus spp.*,

вследствие чего вероятность инфицирования ран именно этими микроорганизмами возрастает. Ранее показано, что стабилизация очага инфекции в ране связана с тем, что эти бактерии вызывают слабый иммунный ответ, который не обеспечивает образование опсонически активных антител. Кроме того, стафилококки способны скрываться от антител в сгустках фибринова и внутри самих фагоцитов, избегая активного иммунного ответа, а также действия антибиотиков [4, 5].

Вторую по частоте встречаемости отмечали группу неферментирующих грамотрицательных бактерий (17,5% случаев): у 6 пациентов — *Pseudomonas aeruginosa*, у 1 — *Acinetobacter baumannii*. Как известно, неферментирующие грамотрицательные бактерии являются типичными микробами-оппортунистами, которые колонизируют разные участки тела, что может объяснить высокую частоту встречаемости этих бактерий в ране. При этом для инвазии и стабилизации очага инфекции требуется снижение колонизационной резистентности, что и связано с наличием длительно существующей раневой поверхности [4].

Несколько реже этиологическими агентами инфицированных ран являлись бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (7,5%). При этом у 3 пациентов получены монокультуры *E. coli* и *K. pneumoniae* (10^8 КОЕ). Энтеробактерии, как правило, обладают чувствительностью к антибактериальным препаратам, которые используют в качестве стартовой терапии инфицированных ран. Последующие врачебные манипуляции способствуют колонизации раны этой группой микроорганизмов, что ведет к возникновению воспаления, вызванного энтеробактериями [4, 5].

В 5% случаев из раневого отделяемого были выделены *Enterococcus faecalis*. Как известно, энтерококки относятся к условно-патогенным бактериям, которые могут вызывать аутоинфекции. В то же время, энтерококки обладают достаточно высокой устойчивостью к воздействиям окружающей среды стационара и при достаточном накоплении могут приводить к экзогенному

Рис. 1. Этиология инфицированных локальных ран, представленных монокультурой бактерий

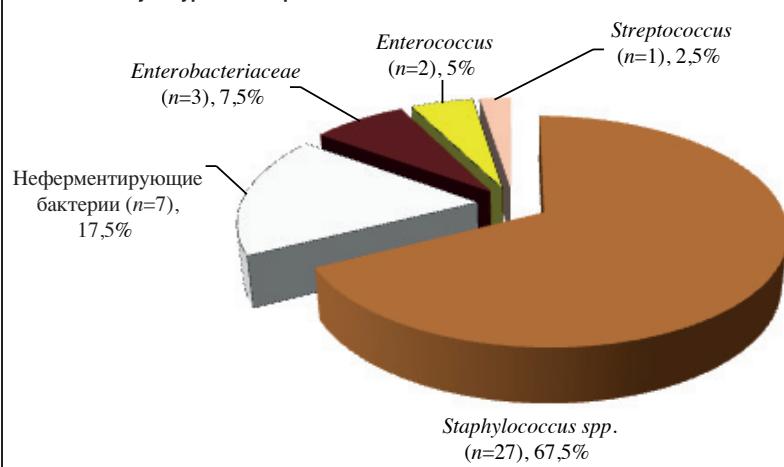
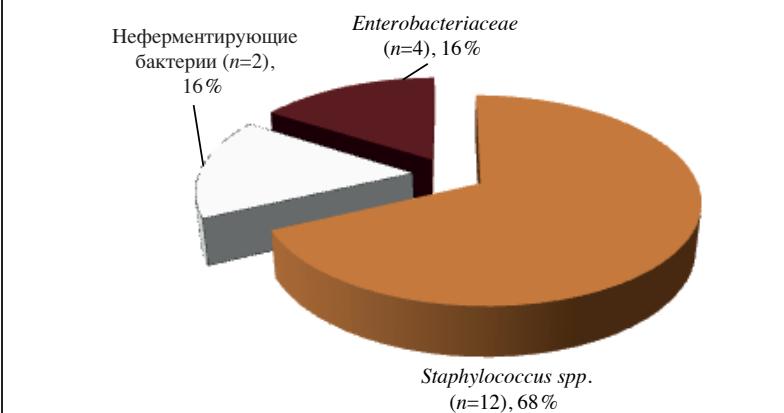


Рис. 2. Этиология инфицированных ран, представленных микробными ассоциациями



инфицированию. Этому также способствует наличие раны, которая и является «входными воротами» инфекции [4].

В качестве этиологического агента инфицированных ран реже всего выделялись представители группы *Str. viridans* (2,5%), см. рис. 1.

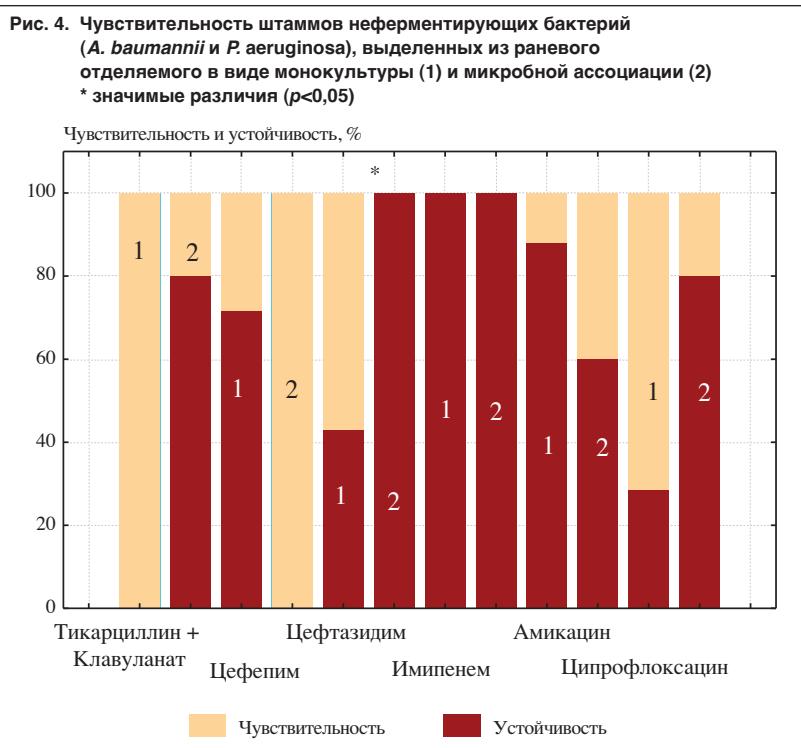
У 18 обследованных пациентов было выявлено наличие микробных ассоциаций. При этом в большинстве наблюдений преобладающим микроорганизмом был *S. aureus* (68%), количество которого в ассоциации составляло более 10^6 КОЕ/мл. В остальных случаях в ассоциациях в большем титре встречались неферментирующие бактерии (16%) и представители семейства *Enterobacteriaceae* (16%), рис. 2.

Наличие ассоциаций микроорганизмов в ранах свидетельствует, по-видимому, о неэффективности предшествующей местной санационной и эмпирической антибактериальной терапии. Это

приводит к активной инвазии микроорганизмами более глубоких тканей.

Проанализирована чувствительность выделенных штаммов к антибактериальным препаратам. При этом выявлено, что у микроорганизмов в виде монокультуры и у представителей микробных ассоциаций чувствительность к антибиотикам различается.

Так, у 70% *S. aureus*, выделенного в виде монокультуры, отмечалась устойчивость к пенициллину и оксациллину, являющимися маркерами продукции β -лактамаз и пенициллинсвязывающего белка 2a, обуславливающих устойчивость ко всем β -лактамным антибиотикам (цефалоспоринам, карбапенемам) [5]. В то же время, у *S. aureus*, представленного в составе микробной ассоциации, устойчивость к указанным антибиотикам составила 100% ($V^2=4,5$; $p=0,03$). Возможно, увеличение резистентности связано



с длительным существованием раны, не поддающейся местным санационным мерам, а также с активным использованием цефалоспоринов 3-го поколения на предшествующем этапе лечения, что следует из изученных историй болезни обследованных пациентов.

Результаты анализа чувствительности *S. aureus*, выделенного в виде монокультуры и микроб-

ной ассоциации, представлены на рис. 3.

Как видно из рис. 3, чувствительность выделенных штаммов *S. aureus* в виде монокультуры и микробной ассоциации к другим антибактериальным препаратам не различалась. Так, *in vitro* у *S. aureus* полная чувствительность отмечена к Ванкомицину (100%) и Рифампицину (до 100%), несколько меньшее количество выделено чувствительных

штаммов к Левофлоксацину (до 80%). *S. aureus* в 50–70% случаев был чувствителен к Эритромицину и Гентамицину. Такая высокая чувствительность к вышеуказанным препаратам связана с их более редким использованием для стартовой антибактериальной терапии.

Получены различия в чувствительности выделенных штаммов из группы неферментирующих бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*), представленных в виде монокультуры и микробной ассоциации. Так, при получении из раневого отделяемого этих микроорганизмов в 40% случаев наблюдали устойчивость к Цефтазидиму. В то же время, при выделении неферментирующих микроорганизмов в составе ассоциации бактерий установлена 100% чувствительность к Цефтазидиму ($V^2=4,0$; $p=0,043$). Различий в чувствительности к другим антибактериальным препаратам получено не было. Так, неферментирующие грамотрицательные палочки (*A. baumannii* и *P. aeruginosa*) в 100% были чувствительны к Имипенему. К ингибиторизацищенным пенициллинам (Тикарциллин+Клавуланат) отмечалась 100% (для монокультуры) и 80% (для бактериальной ассоциации) устойчивость. В 90% случаев выделенных в виде монокультуры *A. baumannii* и *P. aeruginosa* резистентны к Амикацину, при выделении их в виде микробной ассоциации устойчивость проявлялась в 60% случаев. Высокая устойчивость у неферментирующих микроорганизмов выявлена к Цефепиму (70 и 100% для монокультуры и микробных ассоциаций, соответственно). У 70% изолятов *A. baumannii* и *P. aeruginosa* установлена чувствительность к Ципрофлоксацину, а при выделении в составе ассоциаций в 80% случаев получена устойчивость микроорганизмов к данному препарату (рис. 4).

Полученные различия в чувствительности выделенных микроорганизмов в монокультуре и в ассоциации могут быть обусловлены тем, что существование микроорганизма в монокультуре свидетельствует об активном размножении бактериальных клеток. Как известно, общим для

всех антибиотиков является то, что они влияют на бактерии в фазе активного роста и размножения, в метаболизме которых вмешиваются антибактериальные препараты. Вероятно, этим и обусловлена более высокая чувствительность *S. aureus* в монокультуре. В длительно существующих ранах в ассоциациях также доминирует *S. aureus*, но применение β-лактамных антибиотиков усиливает механизмы резистентности этих микроорганизмов, что приводит к появлению 100% устойчивости к указанным препаратам. Неферментирующие микроорганизмы встречаются в ассоциации в более низком титре, что говорит об их менее активном размножении. Вследствие этого β-лактамные антибиотики (Цефтазидим) слабо влияют на эти микроорганизмы в монокультурных ассоциациях, чем обусловлена более высокая чувствительность к этому препарату. В то же время, при наличии этих микробов в монокультуре чувствительность к Цефтазидиму снижается, что говорит о появлении механизмов резистентности. Возможно, это связано также с предыдущей антибактериальной терапией β-лактамными антибиотиками, которая селективно привела к преобладанию неферментирующих микроорганизмов и возникновению устойчивости к Цефтазидиму (и Цефепиму), который относится к этой же группе препаратов.

При исследовании раневого отделяемого у части пациентов в

состав микробных ассоциаций входили бактерии, относящиеся к семейству *Enterobacteriaceae* (16%), см. рис. 2. При этом преобладающими микроорганизмами были *Proteus mirabilis* и *Enterobacter cloacae* в количестве 10^7 – 10^8 . Чувствительность выделенных штаммов представителей семейства *Enterobacteriaceae* в виде монокультуры и ассоциации с другими микроорганизмами не отличалась. Установлена высокая устойчивость выделенных штаммов к Цефтазидиму (90%), но полная чувствительность — к Имипенему (100%), в 60% случаев выявлена чувствительность к Амикациину, Цефепиму.

Выводы

Наиболее частым этиологическим агентом инфицированных локальных ран в ожоговом отделении является *Staphylococcus aureus*, представленный монокультурой, а также в виде преобладающей составляющей в ассоциации с другими микроорганизмами.

Чувствительность выделенных микроорганизмов в виде монокультуры и микробной ассоциации различается. У *S. aureus*, выделенного в виде монокультуры, устойчивость к β-лактамным антибиотикам ниже, чем у *S. aureus*, входящего в состав микробной ассоциации, устойчивость которого к указанным препаратам составляет 100%. У представителей неферментирующих бактерий в составе ассоциаций выявлено увеличение чувствительности к Цефтазидиму (до 100%) относи-

тельно выделенных в виде монокультуры штаммов.

Исходя из полученных данных, с учетом лекарственной чувствительности выделенных штаммов для стартовой терапии локальных инфицированных ран, рекомендуется Левофлоксацин и Имипенем с последующей коррекцией антибактериальной терапии после получения результатов микробиологического анализа.

Литература

- Домнкова Н.П., Комисарова Т.В., Ильина В.Н. Характеристика гнойно-септических госпитальных инфекций в многопрофильном стационаре// В сб.: Современные проблемы эпидемиологии, диагностики и профилактики внутрибольничных инфекций: Материалы III Рос. науч.-практич. конф. с междунар. участием. СПб., 2003. С. 73–75.
- Polezhaev A.A. et al. Antibiotic prophylaxis of the inflammatory complications at patients with severe burn trauma// Pacific Med. J. 2006. № 1. Р. 57–61.
- Алексеев А.А. и др. Микробиологическая оценка эффективности современных антимикробных препаратов для местного лечения ожоговых ран// Комбустиология [электронный ресурс]. 2009. № 37. Режим доступа <http://www.burn.ru/all/number/show/id>. Дата доступа: 09.01.2011.
- Маянский А.Н. Патогенетическая микробиология: Рук. Н/Новгород: Нижегор. гос. мед. академия, 2006.
- Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Стражинского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. М., 2002.

Иммунологические аспекты абдоминального сепсиса

B. N. Чернов, D. V. Мареев

Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону

Известные определения сепсиса свидетельствуют об основных его проявлениях. Во-первых, не существует признаков или симптомов, характерных для сепсиса. Во-вторых, имеются ключевые слова, определяющие это тяжёлое заболевание: хирургическая инфекция, очаг внедрения инфекции, страдание всех органов и систем, падение защитных сил организма больного и иммунного статуса.

М. В. Гринёв [1], давая определение сепсису, пишет: «Сепсис — это неспецифическое инфекционное заболевание, характеризующееся синдромом системного ответа на воспаление... и приводящее к развитию инфекционной полиорганной недостаточности вследствие неспособности иммунных сил организма к локализации инфекции». В. С. Савельев [2] называет процессы дезрегуляции при сепсисе «медиаторный хаос». Также Ю. Г. Зайнутдинов [3] считает, что в основе иммунопатогенеза сепсиса лежит взаимоотношение про- и противовоспалительных медиаторов. Как показывают исследования [4–6], при распространённой хирургической инфекции страдает вся иммунная система: иммуноглобулины (*Ig*) классов *A*, *M*, *G*, секреторный *IgA*

(*sIgA*), макрофагальная система. Однако эти механизмы ещё недостаточно изучены [7, 8]. Для их решения нужны новые медицинские технологии [9].

Материалы и методы

В основу работы положены результаты комплексного обследования и лечения 129 больных 28–71 года с абдоминальным сепсисом в клинике общей хирургии Ростовского государственного медицинского университета в период 1996–2008 гг. Распределение больных по полу и возрасту представлено в табл. 1.

Как видно из табл. 1, мужчин было 82 (63,3%), женщин — 47 (36,4%). Основную часть больных с абдоминальным сепсисом составили пациенты 50–69 лет (93 чел. — 72,1%). Мужчин было 58 (45,0%), женщин — 35 (27,1%).

Причинами абдоминального сепсиса у 53 больных (41,1%) был инфицированный панкреонекроз, у 29 (22,5%) — острая не-проходимость кишечника, у 16 (12,4%) — деструктивный холецистит, у 31 — другие заболевания, в том числе травмы органов брюшной полости (7%), ущемлённые грыжи (7%), гинекологические и онкологические заболевания — по 2,3%, соответственно.

У 129 больных с абдоминальным сепсисом было выявлено 177 сопутствующих заболеваний.

Оценку показателей иммунного статуса проводили в следующие сроки: при поступлении в стационар — на 1–3-и сутки, на 7–10-е сутки после поступления, при благоприятном исходе накануне выписки больного.

Определение содержания *T*- и *B*-лимфоцитов и их субпопуляционного состава в периферической крови осуществляли с помощью моноклональных антител. Относительное содержание клеток определяли по общепринятым формулам. Результат соответствовал процентному выражению относительного содержания лимфоцитов и их суб-

популяционному составу (*CD3*, *CD4*, *CD8*, *CD19*, *CD20*).

Неспецифические факторы защиты — лимфоциты и лейкоциты определяли по общепринятым методикам, комплемент (*CН 50*) — гемолитическим методом. Фагоцитоз, в том числе резервный и стимулированный, исследовали микроскопическим методом. Исследовали также тест спонтанный и индуцированный; миелопероксидазу и активность лизосомально-катионных белков нейтрофилов оценивали по стандартным тестам.

Клеточный состав определяли при помощи мечёных флюоресцентно моноклональных антител MONOBRYTE на проточном цитометре «BIORAD». Рассчитывали иммунорегуляторный индекс (ИРИ).

Показатели гуморального иммунитета, циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), *Ig* классов *A*, *G*, *M*, *sIgA* определяли методом иммунофереза в крови и в секвестрированной в просвете кишечника жидкости.

Состояние макрофагальной системы определяли с помощью световой и электронной микроскопии в биоптатах печени.

Результаты и обсуждение

Показатели иммунного статуса у больных контрольной и основной групп при поступлении представлены в табл. 2.

Проведенные нами иммунологические исследования показали, что как в контрольной, так и в основной группах больных с абдоминальным сепсисом в предоперационном периоде имеются одинакового уровня (сопоставимые) выраженные изменения в иммунном статусе. Это отчётливо наблюдалось у больных, находящихся в тяжёлом и крайне тяжёлом состоянии, что выражалось в наличии лейкоцитоза, лимфопении и низких показателях ИРИ. Фагоцитарная активность лейкоцитов была достоверна ниже

Таблица 1. Распределение больных с абдоминальным сепсисом по полу и возрасту, *n*=129

Возраст, лет	Количество больных, абр. число (%)	
	мужчины	женщины
20–29	1 (0,8)	0 (0)
30–39	7 (5,4)	3 (2,3)
40–49	10 (7,8)	8 (6,2)
50–59	28 (21,7)	18 (14)
60–69	30 (23,3)	17 (13,2)
70 и старше	6 (4,7)	1 (0,8)
Всего	82 (63,6)	47 (36,4)

Таблица 2. Показатели иммунного статуса у больных с абдоминальным сепсисом при поступлении

Показатель, норма	Группа	Состояние		
		средней тяжести, $n=12$, $n=14$	тяжёлое, $n=21$, $n=19$	крайне тяжёлое, $n=18$, $n=17$
Лейкоциты 4,5–9,0·10 ⁹ /л	контрольная	12,0–16,4*	10,1–13,4**	10,0–15,62**
	основная	12,2–16,52*	10,2–13,8**	10,1–13,4**
Лимфоциты 19–37 %	контрольная	19,5–26,4*	9,3–14,72**	12,8–22,1**
	основная	19,1–24,2*	9,2–14,8**	12,8–16,1*
Фагоцитоз, ст. 65–90	контрольная	52,1–54,2*	46,4–49,1*	38,4–46,2*
	основная	52,5–56,1*	45,9–50,8*	38,1–45,6*
CD3 ⁺ 55–80 %	контрольная	61–68*	52–61	55–58*
	основная	60–68*	53–60*	55–59*
CD19 ⁺ 5–25 %	контрольная	8,5–14,5	9,8–16,9	18,2–24,3*
	основная	8,4–13,9	7,9–16,0*	17,5–25,0
CD4 ⁺ 31–49 %	контрольная	29,2–30,4*	27,4–31*	25,6–29,2*
	основная	31–32,1*	27–36,2	25–36*
CD8 ⁺ 19–37 %	контрольная	21–37,4	29,9–38,1*	25,2–38,1
	основная	20–29,5	15–28	13,5–25,0
ИРИ 1,2–2,5	контрольная	1,2–1,7	0,9–1,2	0,96–1,28
	основная	1,2–1,6	1,5–2,0	0,98–1,24
ЦИК, 0–60 ЕД	контрольная	60–76	49–71*	60–80
	основная	59–76	48–70	61–80
IgA, мг/л 1,0–3,5	контрольная	2,2–2,8	2,2–2,8	0,6–2,8
	основная	2,10–2,8	2,2–2,7*	0,5–3,0*
IgM, мг/л 0,6–2, %	контрольная	0,9–2,2	0,9–2,3	0,6–2,3
	основная	0,9–2,3	1,0–2,4	0,6–2,2
IgG, мг/л 7,2–14,0	контрольная	9,4–13,0	9,4–11,4	9,0–11,0
	основная	9,1–11,8	9,1–11,5	9,9–11,1

* $p<0,05$; ** $p<0,01$

Примечание. Статистическая достоверность рассчитана с использованием критерия χ^2 , когда значение параметра <5 , применён точный критерий Фишера. Число n в дальнейшем менялось в зависимости от летальных исходов: n^* — число больных контрольной группы, n^o — число больных основной группы

нормы у всех пациентов с абдоминальным сепсисом. Эти изменения нарастили на 7–10-е сутки после операции с последующей медленной нормализацией — при благоприятном исходе лечения больных.

Показатели иммунного статуса при абдоминальном сепсисе у больных контрольной и основной групп на 7–10-е сутки после операции представлены в табл. 3.

Анализируя показатели иммунограмм у больных контрольной и основной групп, можно сделать следующие выводы. Через 7–10 дней от начала лечения у выживших больных лейкоцитарное и фагоцитарные звенья иммуногенеза работают адекватно. Количество CD3⁺ адекватно состоянию больных в обеих группах. Обращают внимание данные CD19⁺ основной группы.

Следуя логике, этот показатель у больных основной группы должен быть значительно выше нормы. Но не следует забывать, что абдоминальный сепсис — это очень тяжелое заболевание, которое сопровождается полиорганной недостаточностью, а иммунная система, как одна из систем гомеостаза, должна стремиться к средним значениям. Поэтому показатели CD19⁺ в пределах условной нормы. Это говорит о том, что лечение подобрано адекватно и организм благополучно справляется с кризисом.

Показатели иммуноглобулинов полностью отражают адекватную работу иммунной системы у больных основной группы.

IgA выше условной нормы — это признак того, что секреторный иммуноглобулин полностью включился в работу и его выработка далека до истощения. IgM в

пределах условной нормы — терапия подобрана адекватно. IgG выше условной нормы — это показатель того, что антителарабатываются в достаточном количестве. Коррелируя с числовыми показателями CD19⁺, можно сделать вывод, что в организме идет процесс адекватного иммунного ответа.

Показатели ЦИК у больных основной группы значительно превышают условную норму. Этому есть объяснение. Абдоминальный сепсис запускает в организме все механизмы защиты — гуморальный, клеточный, фагоцитарный, поэтому количество связанных микробных агентов должно быть значительно выше нормы.

Таким образом, можно сделать вывод, что лечение больных основной группы наиболее патогномонично и дает возможность организму избавиться от инфек-

Таблица 3. Показатели иммунного статуса у больных с абдоминальным сепсисом на 7–10-е сутки после операции в зависимости от степени тяжести

Показатель, норма	Группа	Состояние		
		крайне тяжёлое, n=19	тяжёлое, n=41	средней тяжести, n=8
Лейкоциты 4,5–9,0·10 ⁹ /л	контрольная	12,2–15,9**	16,1–20,5**	11,4–16,9**
	основная	10,5–12,0*	15,8–17,3**	9,65–11,79*
Лимфоциты 19–37%	контрольная	28–35**	22–28*	28–32*
	основная	20–24*	23–29**	26–30*
Фагоцитоз, ст. 65–90	контрольная	45–74**	59–68**	78–85*
	основная	59–69*	54–70**	76–88*
CD3 ⁺ 55–80%	контрольная	48–64**	65–74*	70–79*
	основная	64–83*	66–85*	69–81*
CD19 ⁺ 5–25 %	контрольная	26–30**	13–23**	14–19,6*
	основная	19–26*	20–25*	18–24*
CD4 ⁺ 31–49 %	контрольная	23–28*	28–40*	26–38*
	основная	44–58	42–56*	40–45*
CD8 ⁺ 19–37 %	контрольная	14–28**	30–44**	25–36*
	основная	20–25	24–29*	29–36*
ИРИ (CD4/CD8) 1,2–2,5	контрольная	0,78–1,26*	1,8–2,2*	1,9–2,5*
	основная	2,2–2,32	1,75–1,93*	1,37–1,25*
ЦИК 0–60 ЕД	контрольная	128–168***	124–144***	80–110***
	основная	200–240**	180–200**	160–180**
IgA, мг/л 1,0–3,5	контрольная	0,3–2,6	3,2–3,5	2,2–3,1
	основная	3,6–4,0*	3,0–4,0*	2,8–3,7*
IgM, мг/л 0,6–2, %	контрольная	0,88–1,8*	1,8–2,3**	0,86–1,7*
	основная	0,95–1,7	0,87–1,9*	0,7–1,8
IgG, мг/л 7,2–14,0	контрольная	7,6–13,4	11,1–17,9	11–15,8
	основная	16,7–21,0*	13,8–16,4*	15,6–17,0*

* p<0,05; ** p<0,01, *** p<0,001

Примечание. Статистическая достоверность рассчитана с использованием критерия χ^2 , когда значение параметра <5, применён точный критерий Фишера. Число больных основной группы (n) в дальнейшем менялось в зависимости от летальных исходов

ционного агента и восстановить работу всех систем и органов.

Анализ иммунного статуса с учётом деления больных на три подгруппы по тяжести состояния позволил дифференцированно оценить изменения иммунитета и использовать их как критерий эффективности лечения.

У больных обеих групп при морфологическом исследовании биоптатов печени участки зональных некрозов гепатоцитов становились сливными, приобретая характер мостовидных и центрально-центриальных.

Участки некрозов инфильтрированы лимфоцитами, сегментоядерными лейкоцитами и макрофагами. Синусоиды неравномерно расширены, в их просвете также определяются сегментоядерные лейкоциты и единичные слущенные клетки Купфера с признаками деструкции (рис. 1).

При электронной микроскопии биоптатов печени больных с абдоминальным сепсисом отмечали разнообразные проявления ишемического повреждения гепатоцитов в виде набухания митохондрий, исчезновения и фрагментации в них крипто-, разрыва их наружных оболочек, просветления или, реже, уплотнения митохондриального матрикса, вакуолизации цистерн шероховатого эндоплазматического ретикулума, исчезновения гранул гликогена.

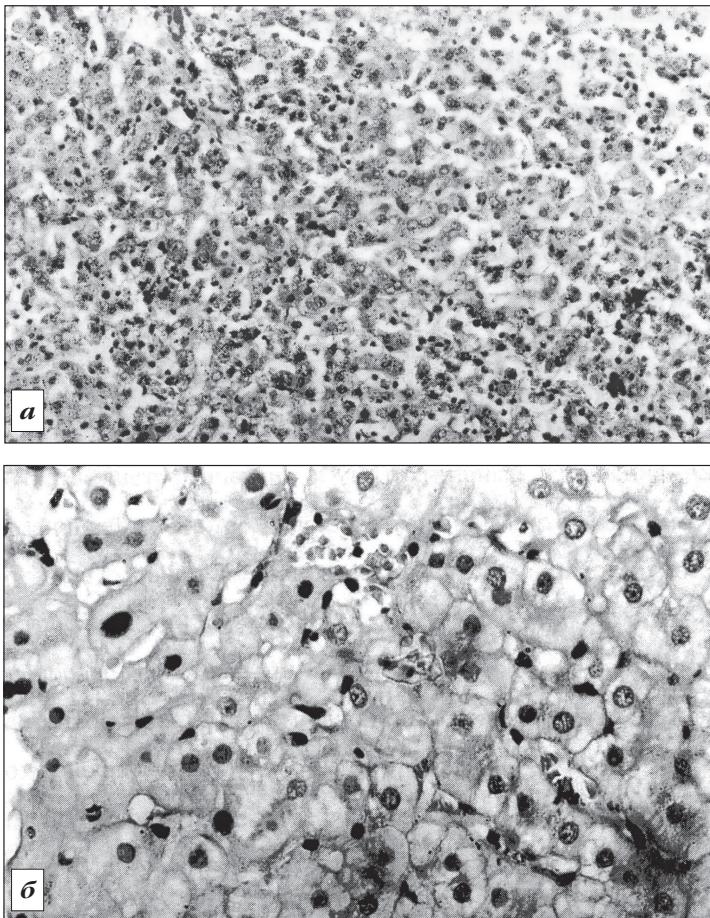
Морфологически в печени и почках развивается отёк и набухание с функциональными нарушениями деятельности. В зависимости от длительности и тяжести интоксикации изменяются биохимические функциональные пробы печени (в связи с нарастающим поражением гепатоцитов). Поражение гепатоцитов определяется снижением белка

крови, протромбинового индекса; изменением функциональных проб печени, указывающих на поражение самих гепатоцитов. Характерной особенностью является переход в гепатоцитах кислородного обмена на перекисное аминирование, в результате чего у больного изменяется цвет кожного покрова, который приобретает цвет грязного загара.

Установлено, что наиболее выраженными были изменения со стороны звёздчатых ретикулоэндотелиоцитов. При этом какой-либо зональности поражения макрофагов не отмечалось.

Изменения со стороны клеток Купфера при электронной микроскопии характеризовались, прежде всего, резким увеличением их десквамации в просвет синусоидов. Просвет синусоид был обтурирован клеточным детритом, в котором различали фрагменты цитоплазмы звёздча-

Рис. 1. Морфологические изменения печени больных с абдоминальным сепсисом: а — слияные зональные некрозы гепатоцитов с обильной инфильтрацией участков некроза лимфоцитами, сегментоядерными лейкоцитами, макрофагами; в просвете синусоидов единичные гиперхромные, комковатого вида звёздчатые ретикулоэндотелиоциты; окраска гематоксилином и эозином; ув. 100; б — балочная структура печёночных долек резко нарушена, вакуольная и гидропическая дистрофия гепатоцитов вплоть до некроза отдельных клеток и их групп, отмечаются большие с крупными гиперхромными ядрами гепатоциты, просветы синусоидов неравномерно эктазированы, в просвете их сегментоядерные лейкоциты и единичные слущенные звёздчатые ретикулоэндотелиоциты, преимущественно крупные, неправильной формы, комковатого вида; окраска гематоксилином и эозином; ув. 400



тых ретикулоэндотелиоцитов с фагосомами, «обломками» бактерий, сегментоядерные лейкоциты и единичные эритроциты (рис. 2, 3).

Таким образом, выполненные исследования позволяют говорить о двух формах печёночной недостаточности при абдоминальном сепсисе: печёночно-клеточной (гепатоцитарной) и макрофагальной, которая имеет важное значение, так как сопровождается нарушением барьера функции печени, а вследствие этого — прорывом инфекционно-токсических веществ в общий кровоток и системной бактериемией.

Выполненные исследования на содержание иммуноглобулинов показали, что в секвестри-

рованном в просвет кишки содержимом обнаруживаются гуморальные и пристеночные иммуноглобулины, защищающие проникновение микробов и токсинов из просвета кишки в среды человека (рис. 4).

Исследование содержимого кишечника показало наличие иммуноглобулинов класса A, M, G, причём чем выше эндотоксикоз, тем их больше в секвестрируемой жидкости. Отмечается наличие и IgA, который синтезируется в стенке кишки, при этом количество его уменьшается в связи с ишемией стенки и снижением его синтеза. Энтеральная недостаточность сопровождается секвестрацией жидкости в просвет кишечной трубки; в результате, происходит повышение внутри-

Рис. 2. Ультраструктура синусоида, содержащего остатки разрушенной клетки Купфера (Г — гепатоциты; Пс — просвет синусоида). Ув. 7 000

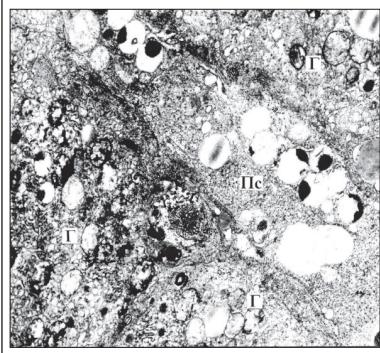
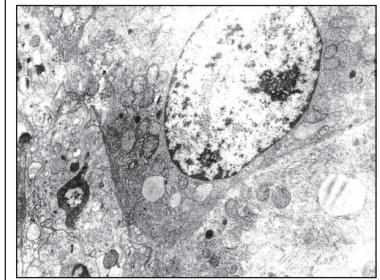


Рис. 3. Просвет синусоида, содержащий клеточный детрит, бактериальные клетки. Ув. 11 000



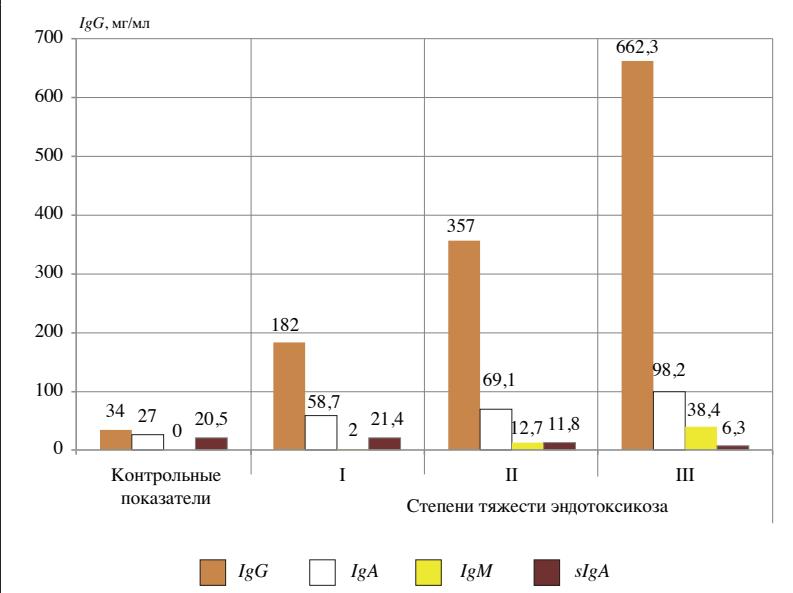
кишечного давления, нарушение барьерной функции слизистой оболочки кишечника. Это, в свою очередь, ведёт к повышению проницаемости кишечной стенки и транслокации симбионтной кишечной флоры в брюшинную полость, портальную систему и общий кровоток.

Хирургическую тактику и объём комплексного лечебно-деконтоксикационного пособия выбирали дифференцированно в зависимости от иммунного статуса больного.

Всем больным обеих групп в послеоперационном периоде проводили общепринятую инфузционно-дезинтоксикационную терапию и форсированный диурез. Вместе с тем, в основной группе лечение дополнялось назоинтестинальной интубацией с интраоперационной декомпрессией и кишечным лаважем, а также канюлированием пупочной вены с проведением интрапортальной инфузационной терапии. При этом, по пупочной вене вводили вещества, оказывающие гепатопротекторное действие, антиоксиданты, белковые препараты, аминокислоты, УФО аутокровь. Из иммуномодуляторов

Таблица 4. Показатели летальности от абдоминального сепсиса

Причина абдоминального сепсиса	Количество умерших			
	основная группа, n=61		контрольная группа, n=68	
	абс. число	%	абс. число	%
Инфицированный панкреонекроз	4	15,3	10	37,0
	n=26		n=27	
Острая кишечная непроходимость	2	14,3	4	26,7
	n=14		n=15	
Деструктивный холецистит, осложнённый распространённым перитонитом	1	14,2	2	22,2
	n=7		n=9	
Язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки (перфорация, несостоятельность швов анастомоза)	1	33,3	1	25
	n=3		n=4	
Ущемлённая грыжа	1	25	1	20
	n=4		n=5	
Травмы органов брюшной полости	1	20	1	25
	n=5		n=4	
Гинекологические заболевания	0	0	0	0
	n=1		n=2	
Онкологические заболевания	0	0	0	0
	n=1		n=2	
Всего	10	16,3	19	27,9

Рис. 4. Концентрация иммуноглобулинов (Ig, мг/мл) в содержимом тонкой кишки у больных с абдоминальным сепсисом в зависимости от степени тяжести эндотоксикоза

положительный эффект получен от Ронколейкина, Дерината, Галавита.

Летальность больных с абдоминальным сепсисом в контрольной и основной группах представлена в табл. 4.

Из табл. 4 видно, что послеоперационная летальность при абдоминальном сепсисе в основной группе ниже на 11,6% по сравнению с контрольной. Предложенная нами и внедренная в клиническую практику схема лечения тяжелых форм абдоминальной

хирургической инфекции позволила снизить в целом послеоперационную летальность у этой категории больных с 27,9 до 16,3%, то есть на 11,6%.

Выходы

Одной из основных задач лечения абдоминального сепсиса является восстановление гуморального и клеточного иммунитета.

Эффективным методом повышения иммунного статуса больных с абдоминальным сепсисом являются интрапортальные инфузии антибактериальных препаратов, гепатопротекторов, антиоксидантов, УФО аутокрови, белковых препаратов.

В лечении больных с абдоминальным сепсисом следует применять также иммуномодуляторы Ронколейкин, Деринат, Галавит, которые способствуют восстановлению гуморальных и клеточных структур иммунитета.

Литература

- Гринёв М.В., Громов М.И., Комраков В.Е. *Хирургический сепсис*. СПб.-М.: Эклипс, 2001.
- Савельев В.С., Гельфанд Б.Р., Проценко Д.Н., Гельфанд Е.Б. *Абдоминальный сепсис: стратегия интенсивной терапии*//Пробл. клин. мед. 2007. № 1. С. 10–16.
- Зайнутдинов Ю.Г., Лепнина О.Ю., Черных Е.Р., Останин А.А. *Эффективность плазмафереза в коррекции синдрома системного воспаления при сепсисе*//В сб.: *Новые технологии в хирургии: Междунар. хир. конгр. Ростов н/Д, 2005*. С. 67.
- Ерюхин И.А., Шляпников С.А., Ефимова И.С. *Перитонит и абдоминальный сепсис*// *Инфекция в хир. 2004. № 2 (1)*. С. 2–8.
- Чернов В. Н. *Неотложная хирургия. Диагностика и лечение острой хирургической патологии*. М.: Феникс, 2007.
- Чернов В. Н., Белик Б.М. *Острая непроходимость кишечника: патогенез, клиническая картина, диагностика и лечение*: Рук. для врачей. М.: Медицина, 2008.
- Гельфанд Б.Р., Филимонов М.И., Бурневич С.З. *Абдоминальный сепсис*// Рус. мед. журн. 1998. Т. 6. № 11. С. 23–29.
- Keller G. A. et al. *Macrophago-mediated modulation of hepatic function in multiple-system failure*// J. Surg. Res. 1985 (6). Vol. 39, № 6. P. 555–563.
- Багненко С.Ф., Шляпников С.А., Корольков А.Ю., Ефимова И.С. *Абдоминальный хирургический сепсис*// В сб.: *Новые технологии в хирургии: Междунар. хир. конгр. Ростов н/Д, 2005. С. 48.*

Ранозаживляющая эффективность коллаген-хитозановых губок серии «Хитоскин»

Б. А. Парамонов, С. Ф. Антонов, Т. Ш. Нураев, Н. Н. Золина, К. А. Некрасова,
Д. Ю. Андреев, Я. Г. Свиридов, В. В. Панов, А. Г. Карнович

Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

Среди разных форм препараторов для местного лечения ран заметное место занимают губки, выполненные из синтетических или природных полимеров [1]. Из последних чаще всего используют коллаген [2, 3]. В настоящее время известно большое количество образцов коллагеновых губок, которые применяют либо в качестве гемостатических препаратов, либо для ускорения заживления ран. Гемостатический эффект обеспечивается главным образом благодаря высокой удельной поверхности губки, имеющей много центров сорбции форменных элементов крови и плазменных белков [4]. Гемостатический эффект может быть усилен за счет дополнительного введения в губку веществ, обладающих кровоостанавливающей эффективностью. Способность коллагена стимулировать репартивные процессы является широко известным фактом. Другим полимером, пригодным для изготовления губок, является хитозан — полисахарид, имеющий химическое сходство с полиаминоглюканами, к которым относятся гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат (хондроитинсерная кислота) и другие аминогликозиды тканей человеческого организма [5]. Хитозан сам по себе обладает антибактериальной активностью [6] и, кроме того, благоприятно влияет на течение репартивных процессов.

В ГНИИ особо чистых биопрепаратов (Санкт-Петербург) разработаны губки серии «Хитоскин» на основе коллагена и хитозана, взятых в соотношении 50:50, в состав которых введен хлоргексидин и антиоксиданты.

Целью работы является проведение сравнительной оценки ранозаживляющей эффективности коллаген-хитозановых губок се-

рии «Хитоскин» и хитозан-желатиновых губок.

Исследование выполнено на базе клиники экспериментальных животных № 2 Военно-медицинской академии (Санкт-Петербург).

Материалы и методы

Опыты выполнены на 55 белых беспородных крысах-самцах с массой тела 200–220 г. Животных получили из питомника «Рапполово» (Санкт-Петербург) и выдержали в карантине в течение 2 нед после их получения. Наркоз осуществляли внутримышечным введением смеси Калипсола и Дроперидола (70 и 1 мг/кг массы тела, соответственно). Предварительно на спине у животных ножницами срезали шерсть и выбирали остатки волос бритвой.

В первой серии опытов проводили сравнительное испытание лечебной эффективности раневых губок разного типа. У животных моделировали по три полнослойные кожные раны прямоугольной формы размером 1,5×1,5 см. В каждой группе было по 10 животных. На раны накладывали следующие препараты: коммерческие коллагеновые губки (К); коллаген-хитозановые губки (КХГ) и желатин-хитозановые губки (ЖХГ). В данной серии опытов использовали губки без пропитки антиоксидантами и антисептиками. Смену повязок осуществляли на 3-е, 6-е, 9-е, 12-е, 15-е, 18-е и 21-е сутки. Определяли динамику заживления ран планиметрическим методом.

Во второй серии опытов моделировали по две полнослойные кожные раны прямоугольной формы размером 1,5×1,5 см. В каждой группе было по пять животных. На раны накладывали следующие препараты: коммерческие коллагеновые губки, кол-

лаген-хитозановые губки серии «Хитоскин» без и с пропиткой хлоргексидина биглюконатом (КХГ-ХГБ), β-каротином (КХГ-β-К) и супероксиддисмутазой (КХГ-СОД). Смену губок делали один раз в три дня, а также по мере необходимости осуществляли замену губок и измеряли площадь ран. Определяли динамику заживления ран, регистрировали сроки их эпителизации.

Планиметрические исследования. Для определения площади ран на нее накладывали простерилизованный в автоклаве лист целлофана, на котором чернилами обрисовывали ее контуры. Затем целлофан с полученным контуром накладывали на миллиметровую бумагу и определяли площадь раны, подсчитывая количество кв. см. Такого рода исследования осуществляли ежедневно. Долю уменьшения площади раны за сутки определяли по формуле:

$$\frac{(S-Sn)}{S \cdot t} \times 100,$$

где S — площадь раны при предыдущем измерении; Sn — площадь раны при данном измерении; t — число суток между измерениями. Проводили статистическую обработку полученных результатов.

Результаты и обсуждение

Анализ результатов первой серии опытов показал, что динамика заживления ран при использовании разных коллаген-хитозановых и желатин-хитозановых губок примерно одинаковая и существенно лучше, чем у коммерческой коллагеновой губки (табл. 1).

Во второй серии опытов установили, что в результате введения в состав губок антиоксидантов раны стали заживать быстрее (табл. 2).

Таблица 1. Изменение площади гранулирующих ран в процессе лечения (1-я серия опытов)

Губка	Площадь ран в разные сроки лечения, мм ²							
	исходная	3-е сутки	6-е сутки	9-е сутки	12-е сутки	15-е сутки	18-е сутки	21-е сутки
КХГ, n=10	225,0±10,0	188,2±14,1	145,3±14,9	101±13,1	60,0±13,1	30,0±10,0	12,00±5,0	4,0±0,5
ЖХГ, n=10	225,0±10,0	178,1±10,3	130,3±11,1	96,0±12,0	50,1±10,2	23,0±9,1	9,0±2,1	2,0±0,5
К, n=10	225,0±10,0	201,1±13,2*	175,7±13,7**	153,1±16,1**	120,7±13,7**	100,0±12,0**	50,0±15,0**	34,0±8,1**

* Различия достоверны ($p<0,05$) по сравнению с группами КХГ и ЖХГ

** Различия достоверны ($p<0,01$) по сравнению группами КХГ и ЖХГ

Таблица 2. Изменение площади гранулирующих ран в процессе лечения (2-я серия опытов)

Губка	Площадь ран в разные сроки лечения, мм ²							
	исходная	3-е сутки	6-е сутки	9-е сутки	12-е сутки	15-е сутки	18-е сутки	21-е сутки
КХГ, n=5	225,0±10,0	188,2±14,1	145,3±14,9	101±13,1	60,0±13,1	30,0±10,0	12,00±5,0	4,0
КХГ-ХГБ, n=5	225,0±10,0	178,1±10,3	130,3±11,1	96,0±12,0	50,1±10,2	13,0±9,1	4,0±2,1	0
КХГ-β-К, n=5	225,0±10,0	178,3±11,2	132,3±12,2	98,0±14,0	51,0±9,8	12,4±9,4	0	0
КХГ-СОД, n=5	225,0±10,0	170,3±13,1	126,0±12,7	95,0±13,0	55,0±10,7	15,0±9,8	0	0
Комбутек-2, n=5	225,0±10,0	201,1±16,2	175,7±13,7	153,1±16,1	120,7±13,7	100,0±12,0	50,0±15,0	14,0±8,1

Таким образом, использование всех разновидностей коллаген-хитозановых губок способствует благоприятному течению раневого процесса и быстрому заживлению ран. Лучшие результаты были достигнуты при использовании препаратов с пропиткой антиоксидантами. Медленнее всего заживление происходило при использовании коммерческих коллагеновых губок. Вероятно, это связано с тем, что в них очень высокая степень сшивки белка, из-за чего он теряет свои лечебные свойства.

Губки серии «Хитоскин» являются перспективным перевязочным материалом при лечении ран.

Литература

- Назаренко Г.И., Сугутова И.Ю., Глянцев С.П. Рана. Повязка. Больной. М.: Медицина, 2002.
- Shaw N. Textured collagen, a hemostatic agent: A pilot study // Oral Surg. Oral Med. Oral Path. Vol. 72. Iss. 6. December 1991. P. 642–645.
- Kabiri M., Emami S.H., Rafinia M., Tabrizi M. Preparation and characterization of absorbable hemostat crosslinked gelatin sponges for surgical applications // Curr. Appl. Physics. Vol. 11. Iss. 3. May 2011. P. 457–461.
- Jackson M.R. Topical Hemostatic Agents for Localized Bleeding // Consultative Hemostasis and Thrombosis (Second Ed.). 2007. P. 503–508.
- Gu R., Sun W., Zhou H. et al. The performance of a fly-larva shell-derived chitosan sponges as an absorbable surgical hemostatic agent // Biomaterials. 2010. Vol. 31. Iss. 6. February. P. 1270–1277.
- Бондаренко В.М., Рыбальченко О.В., Вербицкая Н.Б., Антонов С.Ф. Воздействие хитозана на ультраструктуру клеток патогенных и условно-патогенных микроорганизмов // В сб.: Материалы VIII Междунар. конф. «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана». Казань, 13–17 июня, 2006. С. 175–179.

Инфекции кровотока, вызванные *Staphylococcus aureus*, в отделении реанимации для пациентов с тяжелой термической травмой

H. B. Сатосова¹, Л. П. Зуева¹, К. М. Крылов², А. Е. Гончаров¹, В. А. Савина³

¹ Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И. И. Мечникова;

² Научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург;

³ Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного образования

Основной причиной летальности среди пациентов с обширными глубокими ожогами является формирование инфекционно-воспалительного процесса в ожоговой ране, его генерализация и, как следствие, развитие инфекции кровотока (ИК). Чаще всего встречающимся возбудителем разных форм внутрибольничной инфекции у тяжелообожженных является *S. aureus* [Панова О.В. и др., 2000; Hadjiiski O.G., 1996; Vrankova I. et al., 1998].

Доля нозокомиальных инфекций, вызванных метициллинрезистентными стафилококками (*MRSA*), ежегодно увеличивается в несколько раз. По данным NNIS, доля *MRSA* в США составила 2,4% в 1975 г., 30% в 1989 г., 36% в 1996 г. и возросла до 40% в 1997 г. [1]. Европейскими исследованиями установлено, что *MRSA* является возбудителем 30–50% внутрибольничных инфекций у больных ОРИТ [2].

Важной особенностью *MRSA* является высокая частота ассоциированной устойчивости к антибактериальным препаратам разных групп. В настоящее время имеются данные о том, что около 60% штаммов золотистого стафилококка, выделенных в ОРИТ разного типа в нашей стране, устойчивы не только к метициллину, но и к некоторым другим группам antimикробных препаратов, таким как аминогликозиды, макролиды, тетрациклины [3].

Цель исследования — выявление эпидемиологических и микробиологических особенностей штаммов *S. aureus* как ведущего возбудителя инфекции

кровотока в ОРИТ для пациентов с тяжелой термической травмой.

Материалы и методы

Проспективное эпидемиологическое наблюдение проводили в течение 27 календарных месяцев — с 4 февраля 2008 г. по 4 мая 2010 г. В исследование были включены пациенты, находившиеся в реанимации более 24 ч и имевшие установленный центральный сосудистый катетер. Единый подход к диагностике обеспечивали использованием адаптированного стандартного определения случая инфекции кровотока (ИК) на основе руководства NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance System CDC, National Public Health Institute (Finland) и the Australian Infection Control Association) [4]. ИК регистрировали в тех случаях, когда у пациента с установленным устройством сосудистого доступа (то есть центральным венозным или артериальным катетером) наблюдали положительную культуру крови из периферической вены и два или более признака синдрома системного воспалительного ответа (температура >38 °C или <36 °C; сердцебиение >90 в мин; частота дыхания >20 в мин или PaCO₂ <32 mmHg; лейкоциты >12·10⁹/л, <4·10⁹/л, или >10% незрелых форм).

Для изучения этиологической структуры ИК у пациентов с глубокими и обширными ожогами проводили обязательное бактериологическое исследование крови. Исследования проводили при поступлении (в первые 24 ч) и еще двукратно через каждые 24 ч. Далее не реже одного раза в

неделю и при появлении признаков синдрома системного воспалительного ответа.

Микроорганизмы идентифицировали общепринятым методом. Чувствительность выделенных штаммов микроорганизмов к антибактериальным препаратам определяли диск-диффузионным методом [5]. Анализ результатов внутривидового типирования штаммов *Staphylococcus aureus* проводили с использованием компьютерной программы Whonet 5.4 [6].

Для подтверждения видовой принадлежности изучаемых штаммов и, одновременно, для выявления наличия гена лейкоцидина Пантоне—Валлентайна применяли мультиплексную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием праймеров, специфичных к участкам гена внеклеточной термонуклеазы *tec* (ген «домашнего хозяйства», обнаружение которого использовалось в качестве внутреннего контроля амплификации) и гена *rul* [7]. Метициллинрезистентный генотип подтверждал ПЦР на наличие гена *tec* [8].

В качестве основного метода генетического типирования *S. aureus* использовали мультилокусное VNTR-генотипирование (MLVA) по пяти локусам с использованием праймеров, предложенных A. Sabat и соавт. (2003) [9].

Дополнительно была проведена ПЦР для идентификации генов следующих факторов патогенности (суперантагенов): энtero-токсины *A*, *B*, *C* (*sea*, *seb*, *sec*), белок токсического шока (*tst*).

ПЦР-амплификацию проводили по методике [8].

Результаты и обсуждение

За 27 мес были обследованы 330 пациентов, которые имели центральный сосудистый катетер. По результатам наблюдения, используя стандартное определение случая, диагноз вторичной бактериологически подтвержденной ИК был поставлен в 107 случаях (31,85 на 100 случаев вторичной ИК). Всего за указанный период было выделено 138 культур микроорганизмов из крови. Этиология вторичной бактериологически подтвержденной ИК представлена в табл. 1.

Ведущим возбудителем вторичной ИК был *S. aureus*, удельный вес которого составил 49,28 % от всех выделенных культур, вторым по частоте встречаемости — *P. aeruginosa* (19,57%), третьим — *A. baumannii* (11,59%).

Для изучения чувствительности выделенных штаммов *S. aureus* к антимикробным препаратам были отобраны 11 препаратов разных групп, чаще всего используемых в стационарах: Бен-

зилпенициллин, Оксациллин, Гентамицин, Левофлоксацин, Офлоксацин, Эритромицин, Доксициклин, Клиндамицин, Ванкомицин, Рифампицин, Фузидиевая кислота.

Все штаммы *S. aureus*, выделенные в гемокультуре, были чувствительны к Ванкомицину и Фузидиевой кислоте. Ни один из выделенных штаммов не был чувствителен ко всем тестируемым антимикробным препаратам. Все 68 штаммов были резистентны к Пенициллину, 56 штаммов (82,4%) — к Гентамицину, 54 штамма (79,4%) — к Рифампицину. Высокая доля устойчивых штаммов наблюдалась также к Эритромицину (47,0%) и Клиндамицину (33,8%). Приблизительно каждый четвертый штамм *S. aureus* был резистентен к Доксициклину (27,9%), а каждый пятый — к Левофлоксацину (20,6%). Доля клинически значимых *S. aureus* — метициллинрезистентных штаммов *S. aureus* (*MRSA*) — составила 97,06% (66 штаммов). Данные о чувствитель-

ности штаммов *S. aureus* представлены на рисунке.

Все выделенные штаммы *S. aureus* сформировали 23 группы по профилю резистентности. Самые многочисленные из них — это штаммы, резистентные к пяти, шести и семи антибиотикам, в которые вошли 22 (32,3%), 16 (23,5%) и 11 (16,2%) штаммов, соответственно. Только 5 (7,4%) штаммов из 68 выделенных из крови культур *S. aureus* были чувствительны к 3 из 11 тестируемых препаратов: все были чувствительны к Ванкомицину и Фузидиевой кислоте, 3 — к Клиндамицину, 1 — к Рифампицину, 1 — к Гентамицину).

В настоящее время существует острыя необходимость наблюдения за распространением *MRSA* как в глобальном масштабе, так и на локальном уровне.

В течение 2000–2001 гг. на базе микробиологической лаборатории Смоленского НИИ антибиотикой химиотерапии было проведено проспективное многоцентровое исследование, целью которого стало изучение активности антимикробных препаратов в отношении госпитальных штаммов *S. aureus* [10]. В исследование включили 879 штаммов, выделенных от пациентов из 17 стационаров разных регионов России. Из 879 включенных в исследование штаммов 294 (33,5%) были резистентны к метициллину (*MRSA*). Доля *MRSA* варьировалась в разных центрах от 0 до 89,5% и зависела не от географического расположения стационара, а от локальных особенностей применения антибиотиков и нозологического профиля пациентов. Наиболее высока была доля *MRSA* в ожоговых (77,5%), ортопедических/травматологических (42,1%) и реанимационных отделениях (54,8%). В то же время, в терапевтических и хирургических стационарах метициллинрезистентные штаммы выделяли редко (7,7 и 10,9%, соответственно). Данные об устойчивости штаммов *S. aureus*, выделенных из разных биотопов пациентов ожоговых отделений в стационарах России и крови пациентов в ОРИТ для пострадавших с тяжелой термической травмой, представлены в табл. 2.

Обращают на себя внимание незначительные отличия доли устойчивых штаммов *S. aureus*,

Таблица 1. Культуры, выделенные из крови пациентов ОРИТ с диагнозом вторичная инфекция кровотока

Вид	Количество культур	
	абс. число	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	68	49,28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27	19,57
<i>Acinetobacter baumannii</i>	16	11,59
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	2,17
<i>Candida albicans</i>	3	2,17
<i>Enterococcus spp.</i>	3	2,17
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3	2,17
<i>Corynebacterium sp.</i>	2	1,45
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	1,45
<i>Micrococcus spp.</i>	2	1,45
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0,72
<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	1	0,72
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0,72
<i>Providencia rettgeri</i>	1	0,72
<i>Proteus vulgaris</i>	1	0,72
Коагулазоотрицательный стафилококк	1	0,72
<i>Streptococcus haemolyticus</i>	1	0,72
<i>Streptococcus beta-haemolyticus</i>	1	0,72
<i>Streptococcus viridans</i>	1	0,72
Всего	138	100

выделенных в ходе нашего исследования и в описанном многоцентровом исследовании. Отличие в устойчивости к Рифампицину объясняется тем, что этот препарат активно использовался в ОРИТ для лечения пострадавших с термической травмой на протяжении пяти лет (с 2002 по 2007 г.).

Для установления эпидемиологических связей между штаммами, выделенными в гемокультуре от разных пациентов, нами было использовано мультилокусное VNTR-генотипирование (MLVA), на основании которого 36 выделенных из крови культур *S. aureus* были разделены на три MLVA-типа. Результаты представлены в табл. 3.

Ведущим MLVA-типом *S. aureus*, вызвавшим связанные между собой случаи заболевания, стал тип ВТ-2008, который был выделен в 86,1% случаев вторичной бактериологически подтвержденной ИК. Два других MLVA-типа составили незначительную долю.

Исследования по идентификации генов факторов патогенности (суперантителенов) — энтеротоксинов A, B, C (*sea*, *seb*, *sec*), белка токсического шока (*tsf*), гена лейкоцидина Пантона—Валлентайна (*pvl*) — показали, что все тестированные штаммы содержали ген, кодирующий выработку *SEA* (энтеротоксина A), у 27,8% обнаружен ген, кодирующий выработку *SEC* (энтеротоксина C), табл. 4.

Широкое распространение генов энтеротоксинов в изучаемой популяции может иметь существенное клиническое значение, учитывая, что данные факторы патогенности стафилококков принимают участие в разных иммунопатологических реакциях.

Отмечено, в частности, что стафилококковые энтеротоксины, обладая свойствами суперантителенов, способны вызывать дисбаланс *Tb1/Tb2*-клеток. Стапилококки продуцируют 18 иммунобиологически разных типов энтеротоксинов — от A до V [11].

Стапилококковые энтеротоксины считаются факторами, которые приводят к значительной стимуляции выработки цитокинов и факторов воспаления (*IL-1*, *IL-2*, *IL-4*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-12*, *TNF- α* , *TNF- γ*). Также считается, что стапилококковые энтеротоксины в качестве суперантителенов могут

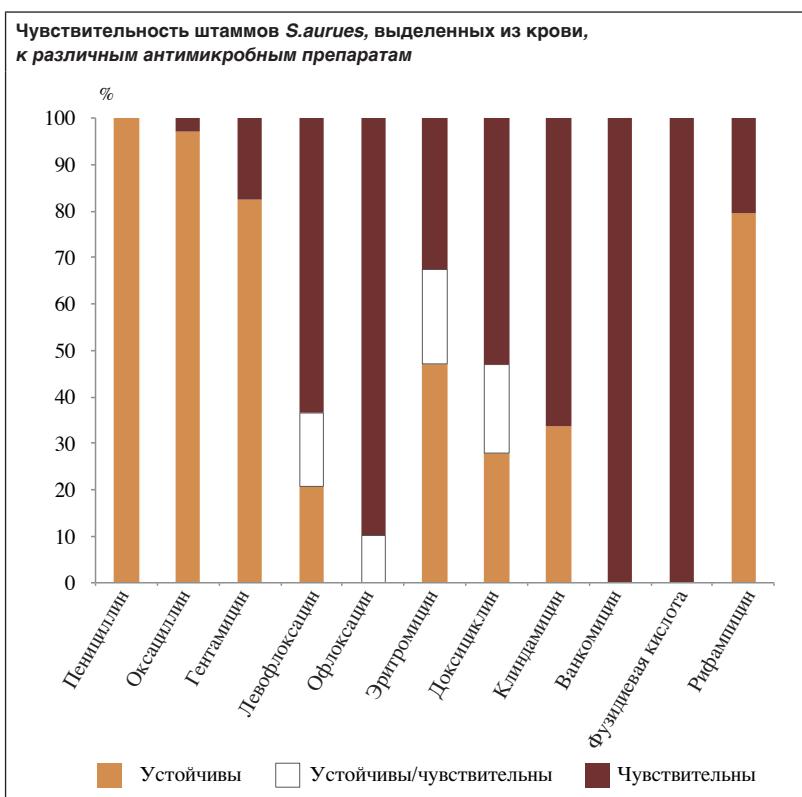


Таблица 2. Устойчивость к антибиотикам *S. aureus*, выделенных у пациентов ожоговых отделений, по данным Смоленского НИИ антибиотической химиотерапии [10] и по результатам настоящего исследования

Антимикробный препарат	Доля устойчивых штаммов <i>S. aureus</i> (данные собственных исследований, n=68)	Доля устойчивых штаммов <i>S. aureus</i> (данные [10], n=173)
Пенициллин	100	100
Оксациллин	97,1	77,5
Гентамицин	82,4	68,8
Левофлоксацин	20,6	22,0
Офлоксацин	0	Нет данных
Эритромицин	47,1	67,6
Доксициклин	27,9	Нет данных
Клиндамицин	33,8	57,8
Ванкомицин	0	0
Фузидиевая кислота	0	0
Рифампицин	79,4	19,1

воздействовать на интерферон-образующую функцию лейкоцитов, приводя к угнетению синтеза ИФН- γ [12].

Заключение

Таким образом, практически все случаи стафилококковых инфекций кровотока в изучаемом отделении были обусловлены внутрибольничным заражением метициллинрезистентными штаммами *S. aureus*, доля MRSA, выделенных из крови, состави-

ла 97,06%. Большинство из них были мультирезистентными, то есть устойчивыми к пяти и более антибактериальным препаратам.

Наличие связанных случаев заболевания было подтверждено при помощи VNTR-генотипирования (MLVA). Выявленная в настоящем исследовании высокая распространенность штаммов золотистого стафилококка, содержащих гены энтеротоксинов, отражает высокий патогенный потенциал госпи-

Таблица 3. MLVA-типы штаммов *S. aureus*, выделенных из крови

MLVA-тип	Абс. число	%
2-й	2	5,6
3-й	3	8,3
BT-2008	31	86,1
Всего	36	100

Таблица 4. Частота обнаружения инвазивных *S. aureus*, имеющих разные гены факторов патогенности (общее число изученных штаммов — 36)

Ген	Частота обнаружения, %
энтеротоксина A (<i>sea</i>)	100
энтеротоксина B (<i>seb</i>)	0
энтеротоксина C (<i>sec</i>)	27,8
белка токсического шока (<i>tsf</i>)	0
лейкоцидина Пантона—Валлентайна (<i>prv</i>)	0

тальных штаммов возбудителя, сформировавшихся в ожоговом стационаре. Циркуляция в стационаре таких высоковирулентных штаммов заставляет обратить особое внимание на обеспечение

противоэпидемического режима в отделении, в частности на проведение изоляционно-ограничительных мер в отношении пациентов, колонизированных *MRSA*.

Ванкомицин является препаратом выбора для терапии инфекции кровотока, вызванной *MRSA*.

Литература

1. Отчет National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) System Report, Data Summary from October 1986 — April 1998, issued June 1998, appendix D.
2. Harbarth S., Pittet D. *MRSA: a European currency of infection control* // *QJM*. 1998. Vol. 91. P. 519–521.
3. Гельфанд Б.Р., Белоцерковский Б.З., Гельфанд Е.Б. и др. Ванкомицин в лечении стафилококковых инфекций у хирургических больных // *Инфекции в хир.* 2006. № 8 (1).
4. CDC. *Staphylococcus aureus resistant to vancomycin United States, 2002* // *MMWR*. 2002. Vol. 51. P. 565–567.
5. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Метод. указания (МУК 4.2.1890-04) // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. 2004. Т. 6. № 4. С. 306–359.
6. Микробиологический мониторинг и эпидемиологический анализ антибиотикорезистентности микроорганизмов с использованием компьютерной программы WHONET: Метод. реком. / Под ред. Л.П. Зуева, М.С. Поляк. СПб., 2004.
7. Lima G., Piemont Y. et al. Involvement of Panton–Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia // *Clin. Infect. Dis.* 1999. Vol. 29. P. 1128–1132.
8. Mehrotra M., Wang G., Johnson W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance // *J. clin. Microbiol.* 2000. Vol. 38. № 3. P. 1032–1035.
9. Sabat A., Krzyszton-Russjan J., Strzalka W. et al. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates // *J. clin. Microbiol.* 2003. Vol. 41. P. 1801–1804.
10. Дехнич А.В., Эйдельштейн И.А., Нарезкина А.Д. и др. Эпидемиология антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в России: результаты многоцентрового исследования // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. 2002. № 4 (4). С. 325–336.
11. Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* // *Clin. microbiol. Rev.* 2000. Vol. 13 (1). P. 16–34.
12. Leung D.Y.M., Travers J.B., Noris D.A. The Role of Super antigens in Skin Disease // *J. invest Derm.* 1995. Vol. 105 (1). P. 37–42.

Применение CNP-терапии в лечении пациентов с локальными глубокими ожогами, страдающих сахарным диабетом

Л. Н. Рубанов¹, И. А. Славников¹, Ю. И. Ярец²

¹ Гомельская городская клиническая больница № 1, Областной центр термической травмы, ран, раневой инфекции и реконструктивной хирургии; ² Гомельский государственный медицинский университет, Республика Беларусь

Лечение пациентов с локальными глубокими ожогами, страдающих сахарным диабетом, представляет сложную задачу, которая усугубляется при поступлении этих больных в ожоговые центры в поздние сроки после получения травмы (спустя 21 день и более с момента получения травмы). На момент госпитализации в ожоговые стационары у таких пациентов в большинстве случаев отмечается наличие в ране значительного количества омертвевших тканей; сама рана инфицирована полирезистентной микрофлорой, что является результатом длительного нахождения в хирургических стационарах и широким применением эмпирической антибактериальной терапии [1].

Наличие клеточного детрита, некротических тканей и бактериальных токсинов ведет к пролонгации воспаления, что обуславливает более продолжительное течение раневого процесса, а также требует выполнения повторных оперативных вмешательств. Состояние хронической гипергликемии и гипоксии приводит к подавлению функциональной активности лейкоцитов, нарушению процессов reparации тканей и снижению выраженности воспалительной реакции, ухудшению микроциркуляции [1, 2].

В настоящее время спектр методик и препаратов, применяемых для предоперационной подготовки ожоговых ран у больных сахарным диабетом, достаточно широк [3]. Однако применение некоторых из них не дает достаточного эффекта, они лишены антибактериальной активности, неэкономичны. Так, отмечено, что заживление ожоговых ран у

больных сахарным диабетом на фоне применения традиционных методов идет крайне медленно [3–5]. При предоперационной подготовке ран у данной группы пациентов показана высокая эффективность специальной методики — терапии контролируемым отрицательным давлением (CNP-терапия), которая создает влажную среду в области раны, способствует эффективному отводу раневого отделяемого, элиминирует бактерии из раны, улучшает микроциркуляцию в окружающих рану тканях, улучшает миграцию клеток в области раны.

Цель — сравнительный анализ результатов разных подходов к предоперационной подготовке пациентов с локальными глубокими ожогами и сахарным диабетом, поступивших в стационар в поздние сроки после получения ожогов (спустя 21 день и более с момента получения травмы).

Материалы и методы

Проанализированы результаты лечения 34 пациентов (16 мужчин, 18 женщин от 42 до 78 лет) с локальными глубокими ожогами и сахарным диабетом, находившихся на стационарном лечении в Гомельском областном центре термической травмы, ран, раневой инфекции и реконструктивной хирургии в период 2009–2010 гг. От общего числа больных, пролеченных за этот период, данные пациенты составляли около 1,8%. Все пациенты поступили в стационар в сроки от 21 до 32 сут после получения ожоговой травмы. При этом сахарный диабет 1-го типа был выявлен у 9 больных (26,4%), 2-го типа — у 25 пациентов (73,5%).

Большую часть пациентов (22 человека, 64,7%) составили больные от 61 до 78 лет, остальные пациенты (12 человек, 35,2%) были трудоспособного возраста. Этиология термических повреждений в данной группе пациентов была представлена следующим образом: ожоги горячей жидкостью — 16 человек (47,0%), контактные ожоги — 10 (29,4%), ожоги пламенем — 8 (23,5%).

Предоперационное обследование пациентов с локальными глубокими ожогами, страдающих сахарным диабетом, включало консультацию эндокринолога, мониторинг глюкозы крови в течение дня, исследование мочи на сахар и ацетон, уровня гликозилированного гемоглобина крови (*Hb A1*), консультации узкопрофильных специалистов при необходимости. Также всем пациентам проводили бактериологическое исследование раневого отделяемого и определение чувствительности выделенной микрофлоры к антибиотикам. Количество микробиологическое исследование проводили методом секторных посевов с использованием плотных питательных сред. Идентификацию и определение лекарственной чувствительности выделенных штаммов выполняли на полуавтоматическом анализаторе miniApi (BioMerieux, Франция). Забор биологического материала для бактериологического исследования осуществляли до проводимого предоперационного лечения и в день планируемого хирургического вмешательства.

Всем пациентам проводили общее и местное предоперационное лечение. Общее лечение включало гипоглуклеводную

диету; продолжение инсулинотерапии пациентов, страдающим сахарным диабетом 1-го типа; временную инсулинотерапию пациентов, страдающих сахарным диабетом 2-го типа.

В зависимости от проводимого местного лечения, пациенты были разделены на две группы. В основную группу (18 человек) были включены больные, у которых хирургическое лечение сочеталось с использованием CNP-терапии; контрольную группу (16 человек) составили пациенты, у которых хирургическое лечение совмещалось с перевязками с растворами антисептиков и мазями на гидрофильной основе («Левомеколь», «Повидон-йод»). Обе группы были сопоставимы между собой по срокам госпитализации, возрасту, полу, типу сахарного диабета, этиологии ожогов.

Всем пациентам было проведено оперативное лечение в два этапа: 1-й — некрэктомия; 2-й — после подготовки ран к пластическому закрытию была выполнена аутодермопластика.

У пациентов основной группы методикой местной терапии, применяемой после первого этапа оперативного лечения, являлась CNP-терапия. Первичными покрытиями раны при CNP-терапии являлись повязки на основе кальция альгината, импрегнированные ионами серебра «Suprasorb A+Ag», вторичным покрытием — полупроницаемое пленочное покрытие «Suprasorb F». В качестве аппарата для CNP-терапии использовали отсасыватель медицинский модели «В 40 А» производства НПО «Висма-Планар» (Республика Беларусь). Смену покрытий и обработку емкостей аппарата производили через день.

У пациентов контрольной группы методикой местной терапии, применяемой после первого этапа оперативного лечения, являлись ежедневные перевязки с антибактериальными мазями на гидрофильной основе («Меколь-Боримед», «Повидон-йод»).

Во время всего периода лечения все пациенты находились на гипоуглеводной диете; всем пациентам продолжали инсулинотерапию.

В послеоперационном периоде пациенты с наличием ран на конечностях соблюдали режим,

обеспечивающий разгрузку пораженной конечности (ходьба на костылях).

После проведения хирургического лечения пациентам обеих групп выполняли мониторинг глюкозы крови, в том числе на тощак; больные были повторно проконсультированы эндокринологом. Рекомендации при выписке включали наблюдение эндокринолога поликлиники по месту жительства с назначением сахароснижающей терапии, продолжение диетотерапии.

Результаты исследований обработаны с применением программы Statistica 6.0 (USA). Для определения отличия от нормы использовали непараметрические статистические критерии: для сравнения независимых групп — критерий Манна—Уитни, для частотного анализа — критерий Крамера (V^2). Результаты выражали в виде показателей: медиана (25; 75 квартили). Различия считали значимыми при $p<0,05$.

Результаты и обсуждение

Срок проведения первой операции (некрэктомии) у больных обеих групп не различался и составил 2,62 (1,5; 3,8) сут. В то же время, выявлены отличия в длительности предоперационной подготовки пациентов перед выполнением второго этапа оперативного лечения (аутодермопластики). Так, у пациентов основной группы этот срок составил 9,25 (7,0; 11,5) сут. Однако у пациентов, которым применяли повязки с мазями на гидрофильной основе, длительность дооперационной подготовки была выше и составила 13,1 (11,0; 15,8) сут ($p=0,012$). Можно предположить, что за счет более быстрого очищения ран от некротических тканей и ускорения роста грануляций у пациентов основной группы, относительно пациентов

контрольной, наблюдали сокращение сроков подготовки ран к пластическому закрытию.

Результаты проведенного оперативного вмешательства у пациентов обеих групп также различались (таблица).

Как видно из таблицы, у пациентов, раны которых готовили к пластическому закрытию путем проведения CNP-терапии (основная группа), необходимость в выполнении повторной кожной пластики возникла у 2 больных (11%). При этом сроки пребывания в стационаре пациентов этой группы составили 20,9 (19; 22) сут. В то же время, у пациентов, раны которых готовили к пластическому закрытию путем перевязок с антибактериальными мазями на гидрофильной основе (контрольная группа), повторная кожная пластика была выполнена 7 больным (43%, $V^2=4,5$; $p=0,03$). Поэтому сроки пребывания в стационаре данных пациентов были значимо выше, чем в основной группе, и составили 27,3 (23; 32) сут ($p<0,01$), см. таблицу. Можно утверждать, что сокращение длительности пребывания в стационаре пациентов основной группы относительно пациентов контрольной происходило за счет лучшего приживления свободных кожных лоскутов и меньшего количества повторных операций по восстановлению кожного покрова.

Выделенные при первичном бактериологическом исследовании микроорганизмы характеризовались разнообразием. Преобладали *Staphylococcus* spp. (65%) в этиологически значимом титре ($>10^5$ КОЕ), большинство которых было представлено коагулазопозитивными *S. aureus* (90%). У 10% пациентов были получены коагулазонегативные *S. simulans*, *S. haemolyticus*. Кроме *Staphylococcus* spp., из раневого

Результаты 1-го этапа лечения пациентов обеих групп

Характеристика лечения	Основная группа, $n=18$ M (25; 75%)	Контрольная группа, $n=16$ M (25; 75%)
Длительность дооперационной подготовки, сут	9,25 (7,0; 11,5)	13,1 (11,0; 15,8)*
Частота выполнения повторной аутодермопластики, %	11	43*
Срок пребывания в стационаре, сут	20,9 (19; 22)	27,3 (23; 32)*

* Значимые различия между основной и контрольной группами ($p<0,01$)

отделяемого пациентов выделены штаммы из группы неферментирующих бактерий (14% случаев): *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*. В остальных случаях этиологическими агентами инфицированных ран являлись *Enterococcus faecalis* (10%), бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (9%) и представители группы *Str. viridans* (2%). При изучении микробного состава ран у всех пациентов в большинстве случаев были выявлены микробные ассоциации: стафилококки с грамотрицательными и грамположительными микроорганизмами, реже встречались ассоциации с участием только грамотрицательных микроорганизмов. Изучение чувствительности микрофлоры к антибиотикам показало, что у 70% штаммов *S. aureus* отмечалась устойчивость к Пенициллину и Оксациллину. Наибольшая чувствительность у *S. aureus* отмечена к Банкомицину (100%), Рифампицину (до 100%), Левофлоксацину (до 90%). Неферментирующие палочки (*A. baumannii* и *P. aeruginosa*), а также выделенные представители семейства *Enterobacteriaceae*, были наиболее чувствительны к Имипенему (100%). К ингибиторзащищен-

ным пенициллинам (Тикарциллин-+Клавуланат) отмечалась 100% устойчивость.

В основной и контрольной группах количество микроорганизмов при первом посеве составило 10^6 КОЕ/г и более. После проведения предоперационной подготовки у пациентов основной группы к моменту выполнения аутодермопластики уровень контаминации ран у 90% пациентов уменьшился до 10^2 – 10^4 КОЕ. Это свидетельствовало о снижении микробной обсемененности раны и возможности выполнения операции по ее закрытию. У пациентов контрольной группы положительный результат бактериологического анализа (10^6 – 10^8 КОЕ) имелся у 70% больных ($V^2=10,5; p<0,001$).

Выводы

При проведении предоперационной подготовки у пациентов с локальными глубокими ожогами и сахарным диабетом, поступившими в стационар в поздние сроки с момента получения травмы, использование CNP-терапии позволяет снизить продолжительность подготовки ран к пластическому закрытию, уменьшить число повторных операций по восстановлению кожного покрова, сократить сроки госпи-

тализации по сравнению с применением для подготовки раны только перевязок с мазями на гидрофильной основе.

Использование CNP-терапии в предоперационной подготовке больных с локальными глубокими ожогами, страдающих сахарным диабетом, позволяет снизить микробную обсемененность раны, в то время как при использовании только традиционного подхода (перевязки) в большинстве случаев на момент оперативного вмешательства микроорганизмы выделяются в этиологически значимом титре.

Литература

1. Greenhalgh D.G. Wound healing and diabetes mellitus // J. clin. Plast. Surg. 2003. Vol. 30. № 1. P. 37–45.
2. Абаев Ю.К. Раневое заживление и сахарный диабет // Мед. новости. 2005. № 5. С. 5–10.
3. Гурьева И.В. Возможности местного лечения диабетических поражений стоп // Рос. мед. журн. 2002. № 11. С. 12–16.
4. Брискин Б.С. и др. Ультразвуковая кавитация в лечении гнойно-некротических осложнений синдрома диабетической стопы // Инфекции в хир. 2007. № 3. С. 33–39.
5. Шаповалов С.Г. Современные раневые покрытия в комбустиологии // ФАРМиндекс-Практик. 2005. Вып. 8. С. 38–46.

Мультиплексная ПЦР-диагностика интегронов резистентности возбудителей нозокомиальной инфекции

А. П. Соломенны¹, Н. А. Зубарева², А. Е. Гончаров³, Н. В. Самосова³, К. М. Крылов⁴

¹ Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения РАН, Пермь;

² Пермская государственная медицинская академия им. акад. Е. А. Вагнера, Пермь;

³ Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И. И. Мечникова;

⁴ Научно-исследовательский институт скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, Санкт-Петербург

Резистентные интегроны широко представлены в геноме условно-патогенных бактерий, включают мобильные гены лекарственной устойчивости к разным видам антимикробных препаратов и подразделяются в зависимости от первичной структуры гена интегразы. Недавно показано, что интегроны 1-го класса могут составлять существенную часть «геномного острова патогенности» в составе хромосомы возбудителя нозокомиальной инфекции *Acinetobacter baumannii* [1]. Для молекулярно-эпидемиологического анализа интегронов используют, главным образом, метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Хотя ген *intI1*, кодирующий интегронную интегразу, консервативен, проблемы с его качественной детекцией могут возникать при выборе сайтов связывания праймеров, используемых в ПЦР [2]. Присутствие в составе интегрона 1-го класса гена *sul1* определяет устойчивость к сульфамидам, причем у клинических штаммов чаще всего выявляют именно *sul*-тип интегрона [3]. Для обнаружения соответствующей последовательности предложен набор амплифицирующих праймеров [4].

Ранее нами показано [5], что в отделениях ожоговой реанимации больниц Санкт-Петербурга выделяют интегрон-позитивные штаммы *sul*-типа, в том числе идентифицированные как *A. baumannii*. Использование сульфадиазина серебра для обработки ожоговых ран могло способствовать укоренению и селекции таких штаммов по

приобретению множественной лекарственной устойчивости.

Апробация высокоспецифичного, воспроизводимого и удобного на практике метода ПЦР-диагностики интегронов стала целью представленного исследования. Основная задача связана с разработкой мультиплексной ПЦР, где «в одной пробирке» могут быть амплифицированы характерные для *sul*-типа интегрона последовательности.

В исследование включены 54 изолята *A. baumannii*, выделенных от пациентов отделений экстренной помощи больниц Санкт-Петербурга и Перми в 2007–2010 гг. 12 изолятов были выделены от больных с ожогами, поступивших в НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе (Санкт-Петербург).

Бактериальную ДНК получали методом «горячего лизиса» (при 95 °C) клеточной супензии в виде биомассы 2–3 колоний, выросших на LB агаре (объем пробы 100 мкл, время обработки 15 мин), с очисткой центрифугированием. Для последующей амплификации вносили 8 мкл ДНК-содержащей пробы.

ПЦР проводили в термоциклире «MyCycler Personal Thermal Cycler» (BioRad, США) в объеме 50 мкл при внесении 5 мкл каждого из двух пар праймеров (из 5 мкМ раствора): 5'-ATGCCCTCGACTTC-GCTGCT и 5'-ACTTTGTTAGGGC-GACTGC (комплементарны «интегразной» последовательности интегрона 1-го класса, [6]) и 5'-ATCGCAATAGTTGGCGAAGT и 5'-GCAAGGCGGAAACCCGCGCC (комплементарны последовательности, содержащей ген *sul1*). Реакционная смесь включала так-

же 5 мкл десятикратного буфера, 5 мкл смеси dNTPs (0,5 мМ) и 1,5 единицы *Taq* ДНК-полимеразы. Режим реакции состоял из начального шага 1,5 мин при 94 °C; 30 последующих циклов (94 °C – 60 с, 60 °C – 45 с, 72 °C – 90 с) и последнего трехминутного шага при 72 °C. Электрофоретическое разделение выполняли в аппарате «BioRad mini-subcell GT» (США) при использовании 1% геля агарозы (нагрузка 10 мкл на гелевую лунку). Все определения включали постановку контроля на отсутствие неспецифической амплификации, первичная структура амплифицированных фрагментов ДНК подтверждена секвенированием. Реактивы и расходные материалы были поставлены отечественными компаниями «ЕвроГенРу» (Москва) и «СибЭнзим» (Москва–Новосибирск).

ПЦР-амплификация показала, что 6 из 12 (50%) изолятов *A. baumannii*, выделенных в НИИ скорой помощи им. И. И. Джанелидзе, имели в геноме интегрон 1-го класса. В то же время, в числе 18 изолятов из больницы Петра Великого (Санкт-Петербург) интегроны обнаружены только у 2 (11%). В отделении экстренной хирургии (Пермь) интегрон-позитивными оказались 16 (67%) изолятов из общего числа 24 *A. baumannii*.

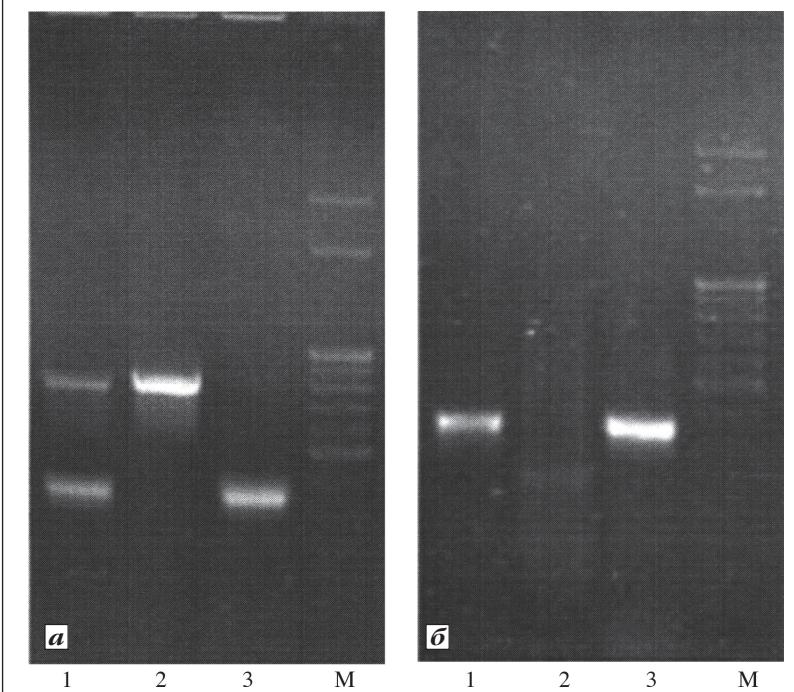
В предложенном нами варианте ПЦР амплифицируются два фрагмента ДНК: размером 327–346 пар нуклеотидов (участок, соответствующий гену интегразы) и 800 пар нуклеотидов (включающий участок гена *sul1*), хорошо различимые на электрофорограмме. Сама ПЦР и визуализация результата могут

быть выполнены в течение одного рабочего дня (в пределах 5 ч). Мультиплексная ПЦР позволяет четко разделить типы интегронов 1-го класса у клинически значимых штаммов на *sul*-негативные и позитивные (рисунок). Показано, что у госпитальных *A. baumannii*, выделенных в больницах Санкт-Петербурга, представлены исключительно интегроны, относящиеся к *sul*-типу. В то же время, в Перми преобладает (96%) *Acinetobacter*, в интегронах которого ген устойчивости к сульфамидам отсутствует.

Нозокомиальная инфекция является причиной смерти более 40% пострадавших от обширных глубоких ожогов III–IV степени. Согласно пятилетним данным отдела термических поражений Института хирургии им. А. В. Вишневского РАМН, у 11% пострадавших течение ожоговой болезни осложнилось развитием сепсиса, и показатель летальности среди больных с сепсисом составил 69% [7]. Ранее нами показано, что интегрон-позитивный штамм *A. baumannii* способен длительное время циркулировать в ожоговом ОРИТ больницы (Санкт-Петербург), оставаясь чувствительным лишь к Имипенему и Полимиксину В [8]. На сегодняшний день доказана исключительно важная роль интегронов 1-го класса (особенно *sul*-типа) в распространении детерминант устойчивости и в отношении карбапенемов [9]. В целом, интегроны 1-го класса в виде устойчивых элементов генома могут служить эпидемиологически ценными маркерами, отличая экстремально лекарственно устойчивые и/или вирулентные штаммы [5]. Поэтому генотипический мониторинг госпитальных популяций микроорганизмов в ожоговом стационаре особенно актуален как способ оценки эффективности мер инфекционного контроля [10].

Таким образом, воспроизведенная в практических лабораториях методика мультиплексной ПЦР является одним из способов широкого динамического слежения

ПЦР-амплификация интегронов 1-го класса в геноме *A. baumannii*:
а — интегрон *sul*-типа, б — *sul*-негативный интегрон. Позиции: 1 — результат мультиплексной ПЦР; 2 — ген *sul1* в отдельной ПЦР; 3 — ген *int1* в отдельной ПЦР; М — маркер молекулярной массы 100–3000 пар нуклеотидов



за изменениями в геноме важнейших нозокомиальных патогенов.

Выражаем признательность сотрудникам бактериологических лабораторий, принявшим участие в работе, за высококвалифицированную помощь. Представленное исследование финансировалось грантом РФФИ-Урал 10-04-96023 и ФЦП «Кадры» (в части).

Литература

1. Fournier P.-E., Vallenet D., Barbe V. et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*// *PLoS Genetics*. 2006. Vol. 2 (1). P. e7.
2. Kooleman J.G.M., Stoof J., Van der Bijl M.W. et al. Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR// *J. clin. Microbiol.* 2001. Vol. 39. P. 8–13.
3. Grape M., Farra F., Kronvall G., Sundström L. Integrins and gene cassettes in clinical isolates of cotrimoxazole-resistant gram-negative bacteria// *Clin. Microbiol. Infect.* 2005. Vol. 11. P. 185–192.
4. Sandvang D., Aarestrup F.M., Jensen L.B. Characterization of integrins and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* *Typhimurium* DT104// *FEMS Microbiol. Lett.* 1997. Vol. 157. P. 177–181.
5. Соломенский А.П., Яфаев Р.Х., Гончаров А.Е. и др. Активность сульфадиазина серебра в отношении штаммов *Acinetobacter baumannii*, выделенных в ожоговых стационарах// Антибиотики и химиотер. 2005. № 7. С. 37–40.
6. Kim Tae-Eun, Kwon Hyuk-Joon, Cho Sun-Hee et al. Molecular differentiation of common promoters in *Salmonella* class 1 integrins// *J. Microbiol. Methods*. 2007. Vol. 68. P. 453–457.
7. Крутиков М.Г. Контроль инфекции в ожоговом стационаре// Комбустиология. 2003. № 14.
8. Goncharov A., Solomennyy A., Aslanov B. Genotypic structure and susceptibility to antimicrobial agents of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Russian burn intensive care units// *Int. J. antimicrob. Agents*. 2007. Vol. 29 (Suppl. 2). S. 655.
9. Dijkshoorn L., Nemec A., Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*// *Nat. Rev. Microbiol.* 2007. Vol. 5. P. 939–951.
10. Lu Po-Liang, Huang Li-Yueh, Lian Shen-Tsuen et al. How carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. established in a newly constructed hospital// *Int. J. antimicrob. Agents*. 2008. Vol. 31. P. 463–466.

MLVA-генотипирование метициллинрезистентных штаммов золотистого стафилококка, циркулирующих в специализированных стационарах географически удаленных регионов России*

*A. E. Goncharov¹, B. V. Kologjueva^{1,2}, T. N. Suborova³, N. V. Samosova¹, B. Yu. Xorošilov¹,
K. A. Agapov¹, L. P. Zueva¹*

¹ Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И. И. Мечникова;

² Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург;

³ Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург

Значительная доля внутрибольничных инфекций, обусловленных метициллинрезистентным *Staphylococcus aureus* (*MRSA*), связана с международными эпидемическими клонами, способными к межконтинентальному распространению.

Ранее было продемонстрировано [1], что в стационарах России и Беларусь циркулируют, по меньшей мере, два эпидемических штамма *MRSA*, генетически родственных международным эпидемическим штаммам *EMRSA1* и *EMRSA2*. Вместе с тем, ввиду недоступности большинству практических лабораторий методов генетического типирования, клональная структура популяций возбудителя, представляющих госпитальные (то есть эндемичные для отдельных стационаров) штаммы, остается сравнительно малоизученной. В настоящем исследо-

вании мы предприняли попытку адаптировать для практического применения методику многолокусного VNTR-типовирования стафилококков, предложенную A. Sabat и соавт. (2003) [5].

Целью настоящего исследования явилось изучение клональной структуры и генетических характеристик метициллинрезистентных штаммов *S. aureus*, выделенных при внутрибольничных инфекциях в нескольких специализированных стационарах крупных российских мегаполисов (Санкт-Петербург, Москва, Пермь).

Материалы и методы

Молекулярно-генетическому типированию были подвергнуты 55 неповторяющихся штаммов *MRSA*, выделенных от пациентов разных стационаров Санкт-Петербурга, Москвы и Перми. Ха-

рактеристика изученных культур представлена в табл. 1.

Для подтверждения видовой принадлежности изучаемых штаммов и одновременно для выявления наличия гена лейкоцидина Пантона—Валлентайна была применена мультиплексная полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием праймеров, специфичных к участкам гена внеклеточной термонуклеазы *tic* (ген «домашнего хозяйства», обнаружение которого использовали в качестве внутреннего контроля амплификации) и гена *rvl*. Нуклеотидные последовательности праймеров представлены в [2, 3]. В качестве положительного контроля амплификации гена *rvl* была использована культура *S. aureus* CCUG 47167, полученная из коллекции Гётеборгского университета (Швеция). Амплификацию ДНК осуществляли в термоциклере «Терцик» фирмы «ДНК-технология» (Россия).

Условия амплификации были следующие: предварительная денатурация при 94 °C с последующими 30 циклами амплификации (10 с денатурации при 94 °C, 20 с отжига при 53 °C, 30 с удлинения при 72 °C) и финальным удлинением при 72 °C в течение 5 мин.

Устойчивость к метициллину верифицировали при идентификации гена *meC4* методом ПЦР согласно [4].

Клональную принадлежность изучаемых культур определяли

Таблица 1. Характеристика изученных культур *MRSA*

Город, профиль стационара	Число изученных культур	Дата выделения культур
Санкт-Петербург I — гнойная остеология	13	2007–2010 гг.
Санкт-Петербург II — ожоговая реанимация	12	2008–2009 гг.
Санкт-Петербург III — стационар для больных СПИДом	2	2008 г.
Санкт-Петербург IV — реанимационное отделение хирургической клиники	10	2009 г.
Пермь I — экстренная хирургия	10	2009 г.
Москва I — нейрохирургическая реанимация	8	2009 г.

* Работа получила финансовую поддержку в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России».

методом *MLVA* по пяти локусам с использованием праймеров, предложенных A. Sabat и соавт. (2003) [5], при этом амплификацию локусов *cifA* и *cifB*, *spa* и *sspA* проводили в мультиплексном формате, а локус *sdrCDE* амплифицировали отдельно.

Амплификацию ДНК осуществляли в термоциклире «Терцик» фирмы «ДНК-технология» (Россия). Мультиплексную ПЦР при *MLVA*-тиปировании проводили в следующих условиях: денатурация при 95 °C (15 мин) с последующими 35 циклами амплификации (30 с денатурации при 94 °C, 30 с отжига при 55 °C, 60 с удлинения при 72 °C) и финальным удлинением при 72 °C в течение 5 мин.

Визуализацию результатов осуществляли с помощью гель-электрофореза в 1 % растворе агарозы.

Полученные профили *MLVA*-типирования сопоставляли с профилями *MLVA*-типирования культур, представляющие собой европейские эпидемические клоны *MRSA*: *S. aureus SMI Sa774 (EMRSA1)*, *S. aureus SMI Sa775 (EMRSA3)*, *S. aureus SMI Sa776 (EMRSA15)*.

Результаты и обсуждение

Все изученные изоляты характеризовались отсутствием гена лейкоцидина Пантона—Валлентайна (*pru*). По данным G. Lina [2], данный фактор патогенности характерен для негоспитальных популяций золотистого стафилококка. Таким образом, отсутствие среди изученных штаммов *pru*-позитивных изолятов свидетельствовало в пользу того, что изученные штаммы сформировались в госпитальных условиях.

В предварительных исследованиях [6] при использовании комбинации пульс-электрофореза и *spa*-сиквенстипирования мы установили факт циркуляции в двух стационарах Санкт-Петербурга эпидемического штамма *MRSA*, отнесенного к *spa*-сиквенстипу *t008* и пульс-электротипу I.

Данный эпидемический штамм (штамм *BT2007*) характеризовался определенным профилем *MLVA*-типирования (рисунок). Последующее *MLVA*-типирование показало, что данный *MLVA*-тип распространен и длительно (более двух лет) циркулирует в двух

Результат *MLVA*-типирования культур *S. aureus* по четырем локусам (*cifA* и *cifB*, *spa* и *sspA*). Позиции 1–4 — культуры, выделенные в стационаре Санкт-Петербург I (эпидемический клон *BT2007*); 5, 6 — культуры, выделенные в стационаре Пермь I; 7–10 — культуры, представляющие европейские эпидемические клоны *MRSA* — *Sa774 (EMRSA1)*, *S. aureus SMI Sa775 (EMRSA3)*, *S. aureus SMI Sa776 (EMRSA15)*

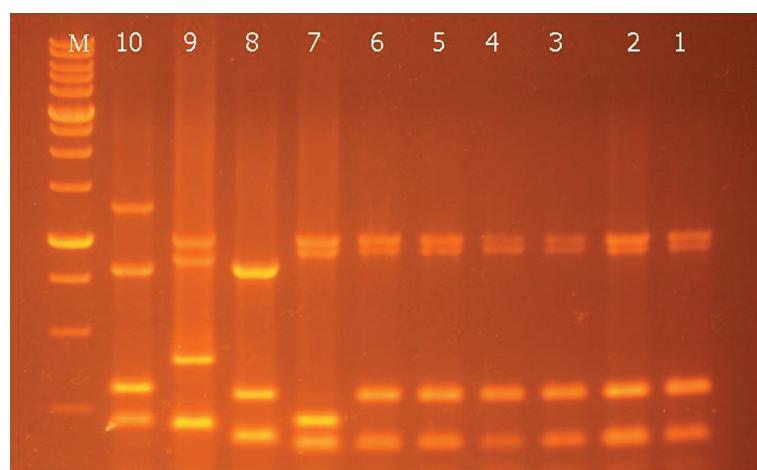


Таблица 2. Результаты *MLVA*-типирования *MRSAs* из разных стационаров

Город, профиль стационара	Число культур				не кластеризованные культуры
	всего изученных культур	<i>MLVA</i> -тип 1	<i>MLVA</i> -тип 2	<i>MLVA</i> -тип 3	
Санкт-Петербург I	13	11	—	—	2
Санкт-Петербург II	12	4	—	—	8
Санкт-Петербург III	2	—	—	—	2
Санкт-Петербург IV	10	—	7	—	3
Пермь I	10	5	—	—	5
Москва I	8	—	—	8	—

санкт-петербургских и пермском стационарах (табл. 2, см. рисунок).

Заключение

Таким образом, генетическая структура метициллинрезистентных штаммов золотистого стафилококка, изученная методом *MLVA*, характеризовалась сравнительно высокой гомогенностью. 35 из 55 изученных штаммов (63,64 %) были отнесены к одной из трех клональных линий, причем одна из них была представлена изолятами ранее идентифицированного нами эпидемического клона *BT2007*.

Ранее отмечалось [7], что методика *MLVA*-типирования в использованном нами варианте не уступает по разрешающей способности методу пульс-электрофореза. На наш взгляд, данная методика относительно проста в исполнении, экономична и может быть применена практическими лаборатория-

ми, использующими метод полимеразной цепной реакции, в комплексе с другими методами молекулярно-генетического типирования при осуществлении эпидемического надзора за внутрибольничными инфекциями стафилококковой этиологии, включая инфекции, обусловленные метициллинрезистентными штаммами стафилококков.

Широкая циркуляция в отечественных стационарах эпидемических клонов *MRSA*, выявленная в том числе и в нашей работе, позволяет поставить вопрос о необходимости систематического мониторинга за ними на уровне региона и на национальном уровне.

Литература

1. Дмитренко О.А., Шагинян И.А., Прохоров В.Я. и др. Молекулярно-генетическое типирование метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных в разных регионах Российской Федерации, на основании изучения

- размеров продукта амплификации и последующего рестрикционного анализа коагулазного гена// ЖМЭИ. 2005. № 4. С. 46–52.
2. Lina G., Piemont Y. et al. Involvement of Panton–Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia// Clin. Infect. Dis. 1999. Vol. 29. P. 1128–1132.
3. Brakstad O.G., Aasbakk I.K., Maeland J.A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene// J. clin. Microbiol. July 1992. Vol. 30. № 7. P. 1654–1660.
4. Mehrotra M., Wang G., Johnson W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance// J. clin. Microbiol. 2000. Vol. 38. № 3. P. 1032–1035.
5. Sabat A., Krzyszton-Russjan J., Strzalka W. et al. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates// J. clin. Microbiol. 2003. Vol. 41. P. 1801–1804.
6. Гончаров А.Е., Olsson-Liljequist B., Зуева Л.П. и др. Эпидемический штамм метициллинрезистентного *Staphylococcus aureus* в стационарах Санкт-Петербурга// Журн. микробиол. 2010. № 5. С. 24–29.
7. Malachowa N., Sabat A., Gniadkowski M. et al. Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of *Staphylococcus aureus* isolates// J. clin. Microbiol. 2005. Jul. Vol. 43 (7). P. 3095–3100.

Микробиологические аспекты антибактериальной терапии парапротезной инфекции, вызванной грамположительными возбудителями

C. A. Божкова, Р. М. Тихилов, В. Л. Разоренов, В. Г. Чуприс, Т. М. Петрова

Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р. Р. Вредена,
Санкт-Петербург

В современных условиях проблема лекарственной устойчивости микроорганизмов приобрела глобальный характер, что обусловлено растущей резистентностью микрофлоры практически ко всем существующим группам антибиотиков.

Оптимальным вариантом при планировании антибактериальной терапии (АБТ) является выбор препарата или их комбинации, который(-ые) перекрывает(-ют) весь спектр возможных возбудителей. Как правило, наиболее частыми этиологическими агентами инфекции в области хирургического вмешательства (ИОХВ) в травматологии и ортопедии являются грамположительные микроорганизмы (стафилококки и энтерококки), при этом АБТ эффективна только в сочетании с хирургическим лечением, так как инфицированные, лишенные кровоснабжения костные фрагменты недоступны действию препаратов, а наличие имплантата на фоне развивающегося гнойно-септического процесса является дополнительным фактором риска как генерализации, так и хронизации инфекции [1].

Известно, что стафилококки характеризуются высоким уровнем природной чувствительности к подавляющему большинству антибактериальных препаратов, однако АБТ госпитальных и хронических стафилококковых инфекций может представлять серьезную проблему из-за формирования у микроорганизмов антибиотикорезистентности [2]. Обнаружение у энтерококков факторов вирулентности приве-

ло к переоценке их роли в этиологии инфекционного процесса, несмотря на то, что в течение многих лет они рассматривались как клинически малозначимые микроорганизмы, кроме однозначно доказанной этиологической роли при эндокардитах [3]. Выбор препаратов для терапии энтерококковых инфекций ограничен как природной устойчивостью данных возбудителей ко многим антибиотикам, так и выраженным потенциалом к развитию приобретенной резистентности.

Цель настоящего исследования заключается в разработке рекомендаций по антибактериальной терапии парапротезной инфекции, вызванной грамположительными микроорганизмами, на основе данных микробиологического мониторинга и анализа резистентности выделенных изолятов к антимикробным препаратам в отделении гнойной хирургии стационара травматолого-ортопедического профиля за период 2007–2009 гг.

Материалы и методы

Исследование основано на анализе структуры и резистентности к антибиотикам 938 штаммов микроорганизмов, выделенных из раневого отделяемого, пунктатов, отделяемого из свищей 618 пациентов с глубокой парапротезной ИОХВ после эндопротезирования тазобедренного или коленного сустава, проходивших лечение в отделении гнойной хирургии с января 2007 г. по декабрь 2009 г.

Микробиологическое исследование биоматериала от пациентов проводили в соответствии с

«Методическими указаниями по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» (МУК 4.2.1890-04. 2004) с использованием полуавтоматизированной системы идентификации выделенных микроорганизмов на тест-системах «Lachema» (Чехия), с учетом результатов на планшетном микрофотометре «iEMSReader» (ThermoLabsystem, Финляндия), включающего системы микробиологического мониторинга «Микроб-Автомат» и «Микроб-2». Определение чувствительности к антибактериальным препаратам проводили диско-диффузионным методом с использованием дисков фирм «Bio-Rad Laboratories» (США) и «bioMerieux» (Франция), а также полуавтоматизированным методом с использованием стандартных панелей «СТАФИ-тест ТПК-6» (Россия).

Определяли чувствительность выделенных штаммов *Staphylococcus spp.* к Бензилпенициллину, Оксациллину, Амоксициллину+Клавуланату, Ванкомицину, Гентамицину, Линкомицину, Рифампицину, Ципрофлоксацину, Фузициевой кислоте, Эритромицину. Перечень антибактериальных препаратов для *Enterococcus spp.* включал: Ампициллин, Амоксициллин+Клавуланат, Ванкомицин, Гентамицин, Имипенем+Циластатин, Меропенем, Ципрофлоксацин.

В 2009 г. дополнительно для плановой коррекции формуллярного перечня определяли чувствительность к антибактериальным препаратам, которые могут использоваться для терапии парапротезной инфек-

ции: Клиндамицин, Линезолид, Моксифлоксацин, Триметоприм+Сульфаметоксазол (Котримоксазол), Фосфомицин, Тетрациклин.

Результаты и обсуждение

Анализ структуры выделенных за исследуемый период штаммов показал, что ведущие позиции в спектре возбудителей парапротезной инфекции сохраняют грамположительные микроорганизмы, несмотря на незначительное уменьшение их доли в динамике за 3 года (рис. 1).

Частота их выделения составила 75,1% в 2007 г., 70,6% в 2008 г. и 65,8% в 2009 г. При этом установлено, что в видовой структуре возбудителей парапротезной инфекции с участием грамположительных микроорганизмов основная роль принадлежит стафилококкам: 87,8; 85,6 и 81,4%, соответственно, в 2007, 2008 и 2009 гг. Энтерококки встречались в 10,9; 10,4 и 11,6% случаев за указанные годы, соответственно. Доля стрептококков была крайне незначительна (22 штамма разных видов за анализируемый период). С учетом того, что динамика высыпаемости основных видов стафилококков и энтерококков существенно не менялась за исследуемый период времени, дальнейший анализ структуры микрофлоры проводили по объединенным данным с 2007 по 2009 г.

Рис. 1. Сопоставление частоты выделения грамположительных и грамотрицательных возбудителей парапротезной инфекции в динамике за 3 года



Выявлено, что в 67% случаев стафилококковых инфекций этиологическая роль принадлежит *S. aureus* (рис. 2), в 18,4% — *S. epidermidis*. Другие виды коагулазонегативных стафилококков выделены в 14,5% случаев, в том числе *S. haemolyticus* (3,2%), *S. warneri* (2,7%), *S. hominis* (1,8%).

Изучение динамики антибиотикорезистентности за 2007, 2008 и 2009 гг. показало, что распространенность резистентных к Оксациллину штаммов *S. aureus* (*MRSA*) практически не изменилась (32,8; 30,3 и 30,4% за каждый указанный год, соответственно), в то же время частота выделения метициллинрезистентных штаммов *S. epidermidis* (*MRSE*) возросла более чем в 2 раза (рис. 3, 4).

Наиболее активными в отношении штаммов стафилококков были Ванкомицин, Фузидиевая кислота, Рифампицин (см. рис. 3, 4). Установлено, что частота выделения резистентных к Амоксициллину+Клавуланату штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* практически соответствует частоте выделения штаммов *MRSA* и *MRSE*. Таким образом, при выделении метициллинчувствительных штаммов стафилококков, ингибиторзащищенные пенициллины, с учетом хорошей биодоступности форм для перорального применения, могут быть препаратами выбора для длительных курсов АБТ при парапротезной инфекции.

Выявлен существенный рост устойчивости штаммов *S. epidermidis* к Ципрофлоксации, Гентамицину, Эритромицину. Анализ антибиотикорезистентности других видов коагулазонегативных стафилококков не проводили из-за малого количества выделенных штаммов (суммарно за 3 года — от 3 до 13 штаммов).

Частота выделения штаммов *Enterococcus spp.* при парапротезных инфекциях, вызванных грамположительными микроорганизмами, суммарно за исследуемый период составила 10,9%, из них 59,1% — штаммы *E. faecalis*, 21,1% — *E. fecium*, остальные виды выделены из раневого отделяемого в 19,8% случаев. Большинство изолятов *Enterococcus spp.* входили в состав микробных ассоциаций (63,4%).

Наиболее активными в отношении изолятов *E. faecalis* были Ванкомицин, Имипенем+Циластатин. Ингибиторзащищенные аминопенициллины (Ампициллин+Клавуланат) показали большую активность в отношении данного микроорганизма по сравнению с Ампициллином. Около 60–70% штаммов *E. faecalis* сохраняют чувствительность к Ципрофлоксации, Гентамицину и Ампициллину. Штаммы *E. faecium* отличались более высокой резистентностью

Таблица 1. Суммарный* уровень антибиотикорезистентности штаммов *E. faecalis* и *E. faecium* за 2007–2009 гг.

Антибиотик	Уровень резистентности, %	
	<i>E. faecalis</i> , n=36	<i>E. faecium</i> , n=15
Ампициллин	26,5	70
Амоксициллин+ Клавуланат	10,3	60
Ванкомицин	0	0
Гентамицин	36,8	50
Имипенем+ Циластатин	11,0	45,5
Меропенем	75,7	100
Ципрофлоксацин	33,0	45,5

* Анализ динамики антибиотикорезистентности не проводили в связи с небольшим количеством выделенных штаммов

к исследуемым антибактериальным препаратам, за исключением Ванкомицина (табл. 1).

Анализ состава микробных ассоциаций показал, что более 20% изолятов грамположительных микроорганизмов выделяются в составе микробных ассоциаций, при этом более чем в половине случаев — в комбинации с грамотрицательными бактериями (табл. 2).

Как видно из табл. 3, наиболее перспективными для введения в формулярный перечень клиники института антибактериальными препаратами с антистафилококковой активностью являются Линезолид, Фосфомицин, Моксифлоксацин. Кроме того, возможно применение Котримоксазола и препаратов из группы тетрациклинов (Доксициклина) в составе комбинированной терапии для пролонгированных курсов АБТ. В отношении штаммов *E. faecalis* максимальную активность показал Линезолид. Что касается Клиндамицина, введение его в формулярный перечень нецелесообразно из-за его низкой активности к ведущим возбудителям.

Этиология инфекционных болезней является основой для формирования стратегии и тактики АБТ. Однако, несмотря на значительное разнообразие возбудителей, основную группу (около 70% в среднем за исследуемый период), на которую приходится подавляющая часть этиологии глубокой ИОХВ после эндопротезирования крупных суставов, составляют грамположительные микроорганизмы, в основном штаммы *Staphylococcus spp.* и *Enterococcus spp.*

Штаммы стафилококков способны продуцировать значительное количество факторов вирулентности (поверхностные белки, способствующие колонизации тканей; полисахаридная капсула, белок A, каротиноиды, каталаза, токсины, экзотоксины и др.), большинство из которых встречается у *S. aureus* [4]. При условии целостности эпителиальных покровов, иммунокомпетентный организм успешно противостоит развитию стафилококковых инфекций. Однако в условиях травмы, хирургического стресса на фоне тяжелой операции, к которым относят эндопротезирование суставов и

Рис. 2. Видовая структура стафилококков при парапротезной инфекции

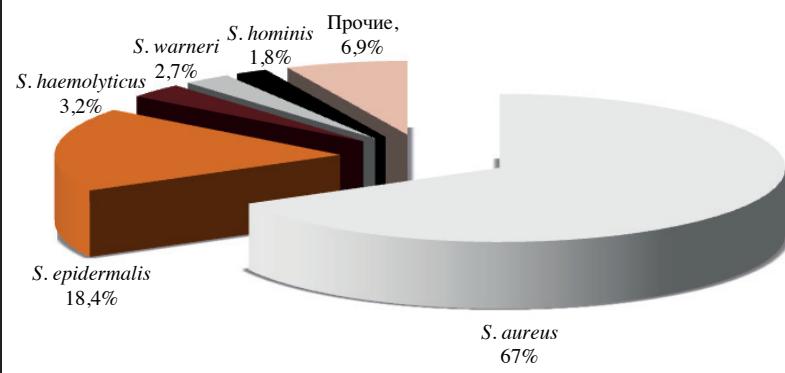


Рис. 3. Динамика антибиотикорезистентности госпитальных штаммов *S. aureus* за период 2007–2009 гг., n=372

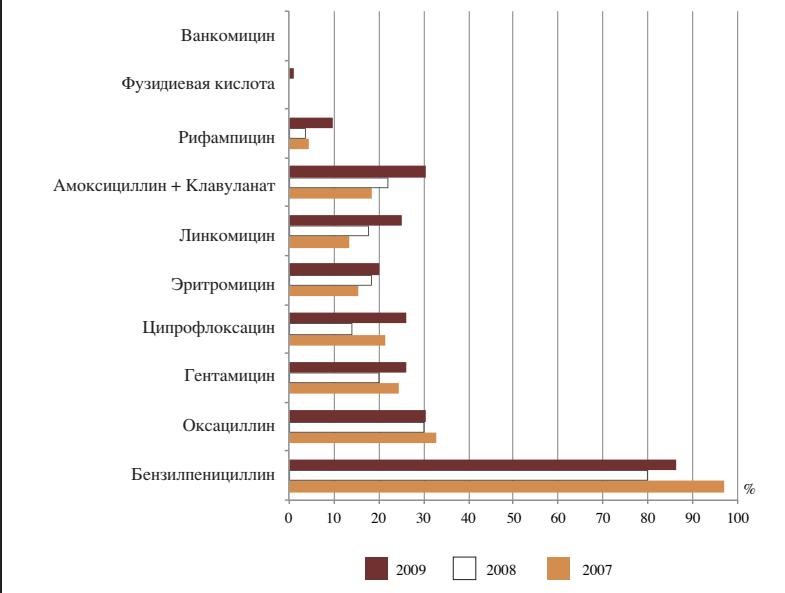


Рис. 4. Динамика антибиотикорезистентности госпитальных штаммов *S. epidermidis* за период 2007–2009 гг., n=102

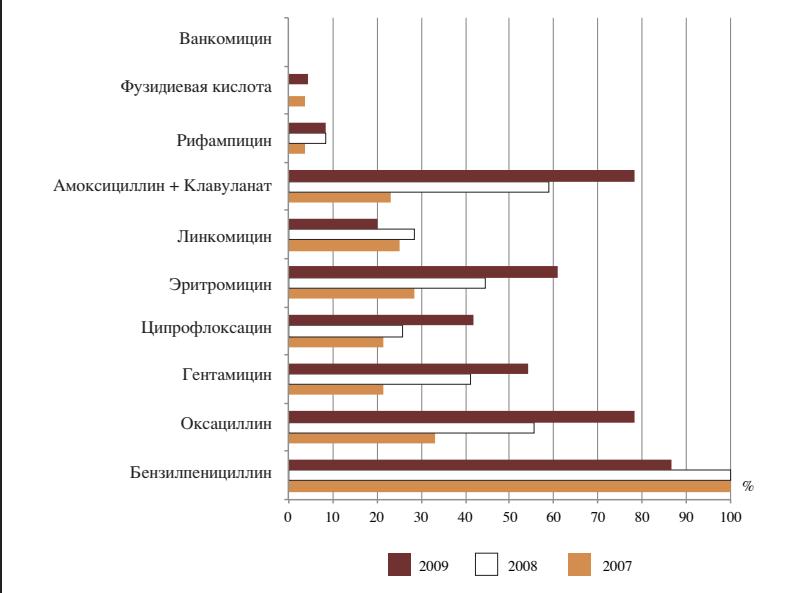


Таблица 2. Структура ассоциаций с участием грамположительных микроорганизмов, выделенных из раневого отделяемого пациентов отделения гнойной остеологии в 2007–2009 гг.

Микробная ассоциация	Число ассоциаций		
	2007 г.	2008 г.	2009 г.
Ассоциация двух штаммов микроорганизмов			
с Гр (+) бактериями	18	20	11
с Гр (–) бактериями	19	14	15
с <i>C. albicans</i>	1	2	1
с другими микроорганизмами	4	9	4
Ассоциация трех штаммов микроорганизмов	7	17	10
с Гр (+) и Гр (–) бактериями			
Итого ассоциаций	49	62	41
доля от общего количества изолятов Гр (+) бактерий, %	21,4	24,8	23,8

Примечание. Гр (+) — грамположительные; Гр (–) — грамотрицательные

Таблица 3. Резистентность ведущих грамположительных возбудителей парапротезной инфекции к антибактериальным препаратам в 2009 г.

Препарат	Резистентность, %		
	<i>S. aureus</i> , n=102	<i>S. epidermidis</i> , n=23	<i>E. faecalis</i> , n=16
Клиндамицин	22,5	68,2	100
Линезолид	0	0	0
Моксифлоксацин	16,3	5	38,5
Бисептол	2	22,2	—
Фосфомицин	8	9,5	—
Тетрациклин	22,8	40,9	76,9

реконструктивные операции на костях, особенно сопровождающиеся массивной кровопотерей, снижением иммуреактивности, условно-патогенные микроорганизмы проявляют свои вирулентные свойства и вызывают развитие гнойно-септических инфекций.

Несмотря на то, что в настоящее время описано более 30 видов стафилококков, основное клиническое значение как наиболее вирулентный имеет *S. aureus*, штаммы которого в данном исследовании были изолированы в 67% случаев выделения стафилококковой флоры. *S. epidermidis* и другие коагулазонегативные стафилококки, по данным литературы, характеризуются значительно меньшей клинической значимостью [2]. Теми немногими факторами вирулентности, которые имеют данные микроорганизмы, являются капсульные и другие адгезины, обеспечивающие прикрепление микроорганизмов к белкам внеклеточного матрикса (фибриногену,

фибронектину и др.). Отложение данных белков практически на всех имплантатах создает благоприятные условия для адгезии стафилококков и формирования биопленки, в составе которой они становятся недоступными для факторов иммунной системы пациента и воздействия антибактериальных препаратов. Микроорганизмы в составе биопленок обладают повышенной выживаемостью в присутствии антибиотиков как за счет снижения доступа препарата, так и перераспределения генов антибиотикорезистентности через внеклеточную ДНК и/или прямую передачу генов из клетки в клетку [5]. По-видимому, именно это свойство приводит к тому, что санация гнойного очага при парапротезной инфекции без удаления компонентов эндопротеза, как правило, неэффективна даже на фоне этиотропной АБТ и зачастую приводит в последующем к рецидиву гнойно-септического процесса.

Известно, что среди всех групп антибиотиков β -лактамы в большинстве случаев составляют основу терапии стафилококковых инфекций, при этом аминопенициллины, цефалоспорины I–II поколения и карбапенемы обладают практически такой же антистафилококковой активностью, как и пенициллин. Развитие устойчивости стафилококков к β -лактамным антибактериальным препаратам связано либо с продукцией β -лактамаз, либо с наличием дополнительного пенициллинсвязывающего белка — ПСБ2а [6, 7].

Из 372 изолятов *S. aureus*, выделенных от пациентов с парапротезной инфекцией, более 80% были резистентны к Бензилпенициллину, а следовательно, к амино-, карбокси- и уреидопенициллином. Стафилококковые β -лактамазы эффективно подавляются ингибиторами (Клавуланатом, Сульбактамом), в связи с чем Амоксициллин+Клавуланат в ходе исследования показал в отношении золотистого и эпидермального стафилококка существенно большую активность, чем Бензилпенициллин (см. рис. 3, 4). Остальные β -лактамы с потенциальной антистафилококковой активностью (цефалоспорины I, II и IV поколения и карбапенемы) сохраняют активность в отношении β -лактамазпродуцирующих штаммов.

Штаммы *Staphylococcus spp.*, обладающие ПСБ2а, клинически устойчивы ко всем β -лактамным антибактериальным препаратам. Маркером наличия ПСБ2а является устойчивость к Оксациллину и Метициллину. Метициллин в настоящее время в клинической практике и лабораторной диагностике не применяют, его вытеснил Оксациллин, однако термин «оксациллинрезистентность» является полным синонимом термина «метициллинрезистентность».

Распространенность штаммов *MRSA* в России высока. По данным многоцентрового исследования «StEnt», устойчивость к Метициллину выявлена в 33,6% случаев [8], при этом частота выделения *MRSA* варьировала от 0 до 89,5%, преобладая в ожоговых (78,4%), травматолого-ортопедических (41,6%) и реанимационных (41,3%) отделениях. Согласно данным, полученным в настоя-

щем исследовании (см. рис. 3, 4), устойчивость к Оксациллину у возбудителей парапротезной инфекции составила для *S. aureus* около 30% (суммарно за 2007–2009 гг.), в то же время для *S. epidermidis* отмечено ее существенное увеличение с 33,3% в 2007 г. до 78,3% в 2009 г. Аналогичная ситуация наблюдается и в отношении других групп антибактериальных препаратов — почти в два раза возросла резистентность изолятов *S. epidermidis* в отношении Эритромицина, Ципрофлоксацина, Гентамицина, что иллюстрирует высокую вероятность развития перекрестной резистентности штаммов метициллинрезистентных стафилококков к препаратам разных групп. Таким образом, выделение штаммов *MRSE* из гнойного очага при парапротезной инфекции является неблагоприятным прогностическим признаком для эффективности АБТ, так как длительное введение Ванкомицина или прием Линезолида в амбулаторных условиях представляется крайне затруднительным. Сохранившие активность к *MRSE* Рифампицин и Фузидиевую кислоту для достижения хорошего антистафилококкового эффекта необходимо сочетать с β-лактамами или фторхинолонами [9].

В ходе исследования было показано (см. рис. 3, 4), что около 70–80% изолятов *S. aureus* сохраняют чувствительность к Гентамицину, Ципрофлоксацину, Эритромицину, Линкомицину. В то же время, их применение существенно ограничивается тем, что, во-первых, все перечисленные препараты уступают β-лактамам в антистафилококковой активности, а во-вторых, как уже говорилось выше, отмечается крайне высокая частота перекрестной резистентности у штаммов *MRS*. Несмотря на многолетнее использование в терапии парапротезных инфекций Ванкомицина, до настоящего времени в клинике института не выявлено штаммов стафилококков, резистентных к данному препарату, и он остается препаратом выбора для АБТ инфекций, вызванных метициллинрезистентными стафилококками. Кроме того, возможно расширение спектра antimикробных препаратов с антистафилококковой активностью для комбинированной этиотропной тера-

пии парапротезной инфекции за счет Моксифлоксацина, Котримоксазола, Фосфомицина, Доксициклина при подтвержденной чувствительности к ним выделенных возбудителей (см. табл. 3).

Микробиологический мониторинг в отделении гнойной хирургии показал, что около 10% случаев инфекций протезированных суставов протекают с участием энтерококков, при этом в 63,4% случаев данные микроорганизмы входят в состав микробных ассоциаций. Это подтверждает данные литературы о возможном участии энтерококков в начальной стадии развития клинически выраженной инфекции, индуцирующих воспалительную реакцию при синергидных взаимодействиях с другими микроорганизмами, в дальнейшем не влияя на течение процесса [2, 3]. Таким образом, только около 5% случаев парапротезных инфекций имеют энтерококковую этиологию, в связи с чем нецелесообразно говорить об эмпирической терапии энтерококковых инфекций после эндопротезирования крупных суставов, а при установленном участии штаммов *Enterococcus spp.* АБТ должна быть этиотропной.

Наиболее активным в отношении энтерококков до настоящего времени остается Ванкомицин. Остальными препаратами, обладающими антиэнтерококковой активностью (в порядке её снижения), являются Имипенем+Циластатин, Ампициллин+Сульбактам, Ципрофлоксацин, Гентамицин и Ампициллин. Однако все перечисленные препараты оказывают в отношении энтерококков только бактериостатическое действие. Необходимость в назначении АБТ, оказывающей бактерицидное действие в клинике травматологии и ортопедии, возникает при развитии инфекции на фоне нейтропении или при невозможности удаления эндопротеза. Наиболее выраженный бактерицидный эффект можно получить при комбинированной терапии β-лактамами или Ванкомицином в сочетании с аминогликозидом (Гентамицином) [1], однако надо учитывать, что последнее сочетание обладает крайне высокой нефротоксичностью и при необходимости его применения

требуется регулярный контроль клиренса креатинина у пациента, чтобы не допустить развитие острой почечной недостаточности.

Для терапии рецидивирующих глубоких ИОХВ после эндопротезирования крупных суставов, вызванных полирезистентными грамположительными микроорганизмами, можно рекомендовать использование Линезолида, к которому в течение 2009 г. не было выделено ни одного резистентного штамма и высокая эффективность которого при лечении инфекции костей и суставов показана в ряде исследований [10, 11]. Однако надо учитывать, что рекомендуемая продолжительность приема Линезолида — 20 сут — является недостаточной для терапии парапротезной инфекции.

Определенную перспективу в лечении стафилококковых и энтерококковых инфекций в травматологии и ортопедии может иметь применение Даптомицина и Тигецциклина. Однако до настоящего времени эти препараты не зарегистрированы для лечения инфекции костей и суставов и их применение в терапии парапротезной инфекции требует дальнейшего изучения.

Таким образом, с учетом полученных результатов бактериологического мониторинга и анализа антибиотикорезистентности определен перечень антибактериальных препаратов для этиотропной терапии глубокой ИОХВ, вызванной грамположительными микроорганизмами, после эндопротезирования крупных суставов (табл. 4).

Рекомендуемая продолжительность АБТ протезированных суставов — 4–6 нед в связи с тем, что через 4 нед после хирургического вмешательства наступает реваскуляризация костной ткани. В случае, когда невозможно провести радикальную хирургическую обработку гнойного очага или необходимо сохранить инфицированный эндопротез, некоторые авторы рекомендуют проводить длительные курсы АБТ — более 3 мес [1, 12].

Выходы

Ведущую позицию в этиологической структуре парапротезных инфекций занимает грам-

Таблица 4. Перечень антибактериальных препаратов для этиотропной терапии парапротезной инфекции, вызванной грамположительной микрофлорой

Возбудитель	Препараты выбора	Альтернативные препараты
<i>MSSA, MSSE</i>	Оксациллин	Ингибиторзащищенные пенициллины
	Цефалоспорины I–II поколения	Клиндамицин ^{1)*}
<i>MRSA, MRSE</i>	Ванкомицин	Ципрофлоксацин ^{2)*}
		Моксифлоксацин ^{2)*}
		Доксициклин ^{2)*}
		Линезолид
Ампициллинчувствительные <i>Enterococcus spp.</i>	Ампициллин (Аамоксициллин) ^{3)*}	Ингибиторзащищенные пенициллины Ципрофлоксацин ^{1)*, 3)*}
Ампициллинрезистентные <i>E. faecalis</i>	Ингибиторзащищенные пенициллины ^{3)*}	Ванкомицин ^{3)*} Имипенем+Циластатин ^{3)*} Моксифлоксацин ^{3)*}
Ампициллинрезистентные <i>E. faecium</i>	Ванкомицин ^{3)*}	Линезолид

^{1)*} При аллергии на β-лактамные антибиотики; ^{2)*} в комбинации с Рифампицином, Фузидиевой кислотой, Ко-тримоксазолом или Фосфомицином; ^{3)*} в комбинации с аминогликозидами (Гентамицином)

положительная микрофлора (около 70%), а именно *S. aureus*, *S. epidermidis*, существенно реже штаммы *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*.

Ассоциации микроорганизмов выделены в 20% случаев, при этом более половины ассоциаций содержат в своем составе грамотрицательные бактерии.

Для проведения эмпирической терапии со дня оперативного лечения при отрицательных результатах посева или в случае острой клинической ситуации до установления этиологии инфекционного процесса, антибактериальная терапия должна включать Ванкомицин в сочетании с антибиотиком, обладающим активностью против грамотрицательных возбудителей.

При развитии рецидива инфекции, вызванной *MRSA*, *MRSE* или ампициллинрезистентными штаммами *Enterococcus spp.*, препаратом выбора является Линезолид.

Назначение антибактериальных препаратов при отсутствии выраженных признаков гнойного процесса и интоксикации

должно быть основано на результатах бактериологического исследования раневого, свищевого отделяемого, аспираата, тканевых биоптатов и проводиться в комплексе с хирургическим лечением.

Литература

1. Рак А.В., Амирасланов Ю.А., Борисов И.В. Хирургические инфекции опорно-двигательного аппарата. Остеомиелиты // В кн.: Хирургические инфекции: Практич. рукж. М.: Литтерра, 2006. С. 635–678.
2. Сидоренко С.В. Микробиологические аспекты хирургических инфекций // Инфекции в хирп. 2003. № 1. С. 22–27.
3. Eaton T.J., Gasson M.J. Molecular screening of *Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates* // Appl. Environ. Microbiol. 2001. Vol. 67. P. 1628–1635.
4. Ефименко Н.А., Гучев И.А., Сидоренко С.В. Инфекции в хирургии. Фармакотерапия и профилактика. Смоленск, 2004.
5. Тец В.В. Микроорганизмы и антибиотики. Инфекции кожи, мягких тканей, костей и суставов. СПб.: КЛЕ-Т, 2006.
6. Белобородов В.Б. Актуальные вопросы антимикробной терапии
7. Gold H.S., Moellering R.C. Antimicrobial-drug resistance // New Engl. J. Med. 1996. Vol. 335. P. 1445–1453.
8. Страчунский Л.С., Дехнич А.В., Белькова Ю.А. и др. Сравнительная активность антибактериальных препаратов, входящих в лекарственные формы для местного применения в отношении *Staphylococcus aureus*: результаты российского многоцентрового исследования // Клин. микробиол. и антимикроб. химиотер. 2002. № 4 (2). С. 157–163.
9. Widmer A.F., Gaechter A., Ochsner P.E., Zimmerli W. Antimicrobial treatment of orthopedic implant-related infections with rifampin combinations // Clin. Infect. Dis. 1992.
10. Rao N., Ziran B.H., Hall R.A., Santa E.R. Successful treatment of chronic bone and joint infections with oral linezolid // Clin. Orthop. Relat. Res. 2004. Vol. 427. P. 67–71.
11. Rayner C.R., Baddour L.M., Birmingham M.C. et al. Linezolid in the treatment of osteomyelitis: results of compassionate use experience // Infection. 2004. Vol. 32 (1). P. 8–14.
12. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова, Смоленск: Макмах, 2007.

Антибактериальная активность хитозановых гидрогелей с нанокластерами серебра

С. Ф. Антонов, И. В. Ларионов, Т. Ш. Нураев, Е. В. Черняева, В. А. Бланрова,
И. Л. Потокин, К. А. Некрасова, Б. А. Парамонов, Д. Ю. Андреев, Д. А. Козулин

Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

Совершенствование средств лечения ожогов и ран является актуальной задачей хирургии. При лечении ран, осложненных бактериальной инфекцией, заметное место занимают препараты серебра [1–5]. Широкое применение получило использование препаратов нитрата серебра и сульфадиазина серебра. Однако средства, включающие ионы серебра, обладают рядом недостатков. В первую очередь, к ним можно отнести быструю инактивацию средств в ране за счет связывания серебра с продуктами распада тканей и нацием хлорида, что вызывает необходимость частых повторных обработок (до 12 раз в сут для нитрата серебра и дважды в сутки — для сульфадиазина серебра). Во вторых, поступление больших количеств серебра в организм человека может приводить к побочным эффектам, включающим лейкопению, аллергию, диспептические расстройства и заболеванию аргирозом у людей, чувствительных к серебру.

В настоящее время большой интерес представляет включение в состав перевязочных материалов нанокластеров серебра [6], обладающих широким спектром antimикробного свойства в отношении грамположительных и грамотрицательных, аэробных и анаэробных, спорообразующих и аспорогенных бактерий в виде монокультур и микробных ассоциаций, включая антибиотикоустойчивые госпитальные штаммы. В связи с тем, что серебро в наноразмерном состоянии очень активно, можно полагать, что высокий antimикробный эффект будет получен при низком общем содержании серебра в повязке.

Целью настоящей работы явилось получение хитозановых гидрогелей с нанокластерами се-

ребра и изучение их антибактериального действия.

Материалы и методы

Приготовление хитозановых гидрогелей (ХГ)

2% нейтрализованный раствор хитозана (поли-(1-4)-2-амино-2-дезокси- β -D-глюкоза), пр-во ЗАО «Биопрогресс», с молекулярной массой около 400 КДа и степенью дезацетилирования (СД) 70% подвергали повторному дезацетилированию в течение 3 ч при +110 °C в присутствии 40% NaOH, модуле 1:10 в атмосфере аргона. Хитозан выделяли на фильтре, промывали деионизированной водой, 96% этиловым спиртом и повторно деионизированной водой до нейтральной реакции. В результате, получали хитозан с молекулярной массой около 200 КДа и СД 91±2%. Хитозан (Х) растворяли в 2% водном растворе муравьиной кислоты и нейтрализовали до pH 6,0–6,3.

Для приготовления геля смешивали раствор хитозана с вязким наполнителем 10% раствором ПВП с молекулярной массой около 3 млн КДа, глицерином и 0,02M раствором нитрата серебра фармакопейного качества. После смешивания гель засвечивали ультрафиолетом от бактерицидных ламп. Образование наночастиц серебра в геле контролировали сканированием адсорбционных спектров геля в УФ и видимом спектре (200–900 нм) с помощью спектрофотометра через определенные промежутки времени. Хитозановый контрольный гель готовили аналогично, но без добавления нитрата серебра.

Сравнительную бактерицидную активность гелей оценивали по величине зоны лизиса колоний микроорганизмов после нанесения капель тестируемых

растворов и гелей разной концентрации на газоны культур эталонных штаммов *Escherichia coli* M-17 и № 1337.1, *Staphylococcus aureus* ATCC-№ 25923 и № 1169.2 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-№ 27853, № 1321, *Candida albicans* (ATCC 885-653, № 259). Для приготовления газона культуры смывали раз в сутки с косяков физиологическим раствором (2 мл). Полученную суспензию хорошо перемешивали и разбавляли до 10⁶ КОЕ/мл. 0,3 мл суспензии наносили на чашки с агаром Хотингера. Диаметры зон задержки роста микробов измеряли после 24-часовой инкубации.

Бактерицидную активность гидрогелей изучали путем внесения в полную питательную среду (ГМФ) разных количеств гидрогелей, содержащих 20; 200; 2 000 мкг хитозана (по сухому весу) на 1 мл среды, непосредственно перед засевом тест-культур или в середине фазы логарифмического роста. Культивирование осуществляли в плоскодонных полистироловых 96-ячеекных планшетах при +37 °C. Оптическую плотность культур измеряли на вертикальном спектрофотометре для микроплат «Bio-Rad» на длине волн 490 нм. Тест-культурами служили условно-патогенные микроорганизмы (*Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli* M-17). Плотность засева варьировали в диапазоне 10⁶–10⁷ КОЕ/мл (через порядок). Бактерицидную активность оценивали по величине снижения титра культуры в присутствии компонентов геля относительно контроля.

Морфологические исследования

Для получения микрофотографий ультратонких срезов гелей применяли специальную мето-

дику обработки образцов. Она заключалась в безводной фиксации материала в 10% ацетоновом растворе акролеина и постфиксации в 0,4% растворе Oso_4 (растворитель вода:ацетон 1:5). Далее материал подвергали гидратации для отмычки от солей. После удаления солей материал дегидратировали и пропитывали смолой (Аралдит). Далее проводили полимеризацию при +60 °C. Из подготовленного таким образом материала получали ультратонкие срезы толщиной 300–400 ангстрем с помощью микротома «ULTRATOM-III» (LKB Швеция). Ультратонкие срезы контрастировали 1% раствором уранила ацетата и раствором свинца по Рейнольдсу. Ультратонкие срезы образцов исследовали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-100С при рабочем ускоряющем напряжении 80 кВ. Фотографировали при ув. 10 000, 20 000 и 50 000.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты изучения бактерицидной активности растворов хитозана при их внесении в среду культивирования.

Раствор хитозана ингибировал рост микроорганизмов. Наиболее чувствительными к нему оказались *E. coli M-17* и условно-патогенный *S. flexneri*, а наиболее устойчивыми — *K. pneumonia* и *C. albicans*. Степень подавления роста зависела от природы микроорганизма. Так, для *S. flexneri* выявлен бактерицидный эффект, нараставший по мере увеличения концентрации хитозана в питательной среде. Для *S. aureus* высокие концентрации хитозана оказывали бактерицидный, а низкие — бактериостатический эффект, для *K. pneumonia* хитозан оказывал только слабый бактериостатический эффект. Биоцидные свойства хитозана не зависели от плотности бактериальной популяции, физио-

логического состояния микроорганизмов, типа строения клеточной стенки (граммположительный или грамотрицательный). Вместе с тем, при изменении условий культивирования микроорганизмов изменялись и ингибирующие концентрации гидрогеля. Так, при выращивании культур на плотных средах биоцидный эффект хитозана регистрировали лишь в концентрациях 2 000–4 000 мкг/мл.

Включение в состав гидрогеля кластерного серебра в концентрации 0,1 мМоль приводило к полному подавлению жизнеспособности тест-культур во всех использованных разведениях через 18 ч инкубирования. Данные по росту культуры стафилококка в присутствии хитозана и нанокластеров серебра представлены на рис. 1.

Диаметры зон лизиса при изучении сравнительной бактерицидной активности хитозановых растворов и гелей, растворов ионного серебра и хитозановых гелей с включением серебра в форме ионов и наночастиц представлены в табл. 2.

Диаметры зон лизиса в результате действия растворов и гелей хитозана примерно равны 1 см. Хитозан не проявляет бактерицидного действия в отношении *C. albicans*. Раствор ионного серебра показывает такую же зону задержки роста всех тест-культур при разведении 5 мМоль. В разведении 0,4 мМоль он не проявляет бактерицидного действия. Включение в состав хитозанового геля серебра в ионной форме в количестве 0,05 мМоль несколько повышает бактерицидную активность геля, в том числе и в отношении *C. albicans*. Включение в гели нанокластеров серебра в той же концентрации приводит к увеличению диаметров зон лизиса практически в два раза (рис. 2). Повышение в геле концентрации нанокластеров до 0,1 мМоля (по серебру) приводит к увеличению диаметра зон лизиса до 2,7–3,0 см. Таким образом, полученные данные позволяют говорить о синергизме бактерицидного действия хитозана и серебра.

В ходе исследования срезов микробных клеток методом электронной микроскопии был выявлен ряд специфических изменений ультраструктурной организации клеточной стен-

Таблица 1. Сравнительные данные роста бактерий

Тест-культура	Без хитозана		С хитозаном	
	исходная величина, LgKOE/мл	Конечная величина (контроль), LgKOE/мл	20 мкг/мл хитозана, LgKOE/мл	200 мкг/мл хитозана, LgKOE/мл
<i>Shigella flexneri 2 a</i>	4,5±0,3	8,0±0,5	4,2±0,2	3,0±0,3
<i>Staphylococcus aureus 209</i>	5,5±0,4	9,0±0,5	7,9±0,5	4,6±0,2
<i>Escherichia coli M-17</i>	5,0±0,3	9,0±0,5	7,8±0,3	4,2±0,2

Рис. 1. Эффективность роста *Staphylococcus aureus 209* в ГМФ при введении разных количеств хитозана и хитозана (2 000 мкг/мл) с наночастицами серебра (AgNP). Первый столбик (5,5) — исходная плотность культуры при посеве; последующие столбики — плотность после 18 ч инкубации

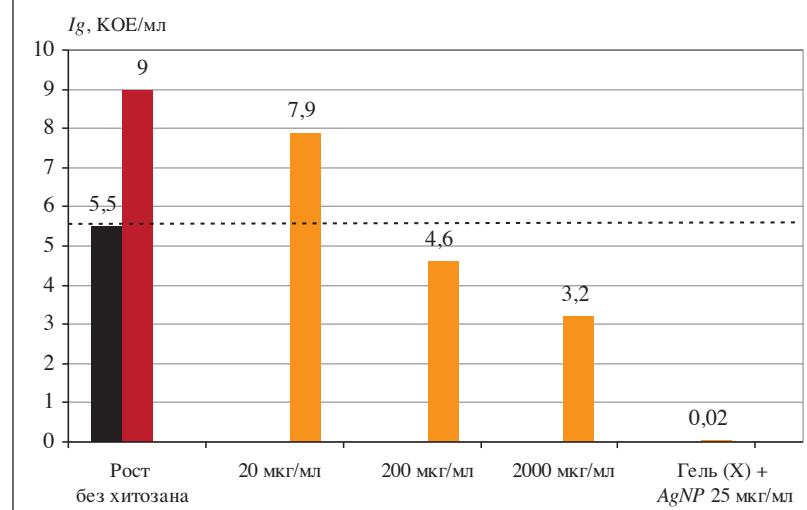
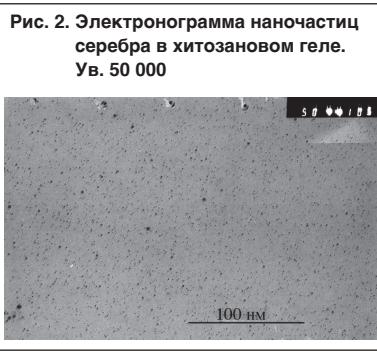


Таблица 2. Сравнительная бактерицидная активность хитозановых растворов и гелей, растворов ионного серебра, хитозановых растворов и гелей с ионным серебром (Ag^+) и нанокластерами серебра ($AgNP$)

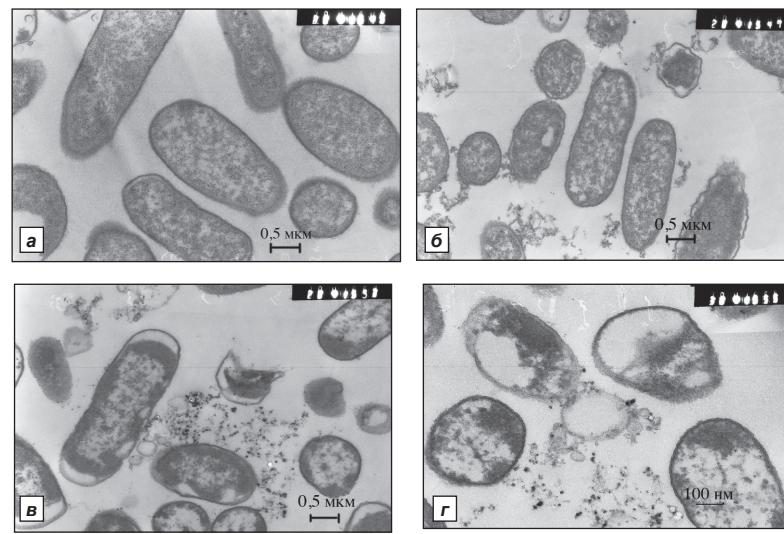
Образец	Тест-культуры, диаметр зоны лизиса, см ²			
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
	ATCC № 25923	ATCC № 25922 (240533)	ATCC № 27853	ATCC 885-653 (№ 259)
Хитозан 1 %	0,79±0,16	1,11±0,09	0,94±0,07	—
Гель	1,01±0,24	1,29±0,11	1,15±0,1	—
0,02M $AgNO_3$ (исходный)	—	—	—	—
Разведение 1:4 (0,005 M $AgNO_3$)	0,96±0,17	2,0±0,15	1,67±0,05	1,45±0,12
Разведение 1:50 (0,0004 M $AgNO_3$)	—	—	—	—
Гель с Ag^+ (0,00005 M)	1,07±0,1	1,33±0,05	1,55±0,05	1,06±0,2
Гель с $AgNP$ (0,00005 M по Ag)	1,42±0,2	2,2±0,19	2,37±0,06	1,72±0,24
Гель с $AgNP$ (0,0001 M по Ag)	2,65±0,05	2,71±0,12	3,26±0,14	2,60±0,05



ки и органоидов цитоплазмы при взаимодействии с хитозаном и наночастицами серебра. В цитоплазме большей части исследованных клеток отмечено неравномерное увеличение электронной плотности белково-рибосомального комплекса, проявляющееся в усилении гетерогенности цитоплазмы клеток. Для грамположительных микроорганизмов под действием хитозана в клеточной стенке под слоем пептидогликана в зоне расположения тейхоэвых кислот выявлен дополнительный, нехарактерный для данного типа строения клеточной стенки электронноплотный слой (8–10 нм).

Срезы клеток *E. coli* M-17, полученных из одной культуры и проинкубированных в присутствии хитозанового геля и наночастиц серебра, представлены на рис. 3. При воздействии наночастиц серебра ($AgNP$) наблюдается большое количество клеточных структур во внеклеточном пространстве, что можно объяснить вытеканием цитоплазмы из-за нарушения частицами $AgNP$ целостности клеточной мембранны (см. рис. 3, в, г). Наблюдается коагуляция и расслоение внутриклеточных структур и лизис клеток.

Рис. 3. Электронограммы структуры *Escherichia coli* M-17 в разных условиях культивирования: а — в контроле; б — инкубированных в присутствии геля на основе хитозана; в, г — в присутствии наночастиц серебра. Ув. 20 000 (а, б, в) и 50 000 (г)



Согласно данным литературы [7], механизм антимикробной активности хитозана заключается во взаимодействии полимера с отрицательно заряженной бактериальной стенкой с последующей дестабилизацией клеточной мембраны, изменением проницаемости, взаимодействием про никших молекул с клеточной ДНК и ингибированием ее репликации. Механизм ингибирующего действия ионов серебра на микроорганизмы также частично известен. Полагают, что при обработке клеток ионами Ag^+ клеточная ДНК теряет способность к репликации, а клеточные белки инактивируются [2]. Кроме того, ионы Ag^+ связываются с функциональными группами белков, приводя их к денатурации. Механизм бактерицидной активности

наночастиц серебра [3] заключается в образовании пор в клеточных стенах бактерий с аккумуляцией наночастиц в клеточных мембранах, что приводит к росту их проницаемости с последующей гибелю клеток.

Выходы

Проведенные исследования бактерицидного действия гелей хитозана, содержащих наночастицы серебра, показали их высокую бактерицидную эффективность в отношении тест-штаммов при крайне низких концентрациях серебра в геле, что позволяет гарантировать требуемые antimикробные свойства гидрогелевых перевязочных материалов и резко снизить риски побочных эффектов, характерных для серебросодержащих препаратов. Хитозановые гидрогелевые пере-

вязочные материалы, содержащие нанокластеры серебра, перспективны для использования в хирургической практике.

Литература

1. Одегова Г.В., Бурмистров В.А., Родионов П.П. Исследование состояния серебра в серебросодержащих антибактериальных препаратах арговит и аргогель// В сб.: Применение препаратов серебра в медицине: Матер. науч.-практич. конф. «Новые химические системы и процессы в медицине». Новосибирск, 2004. С. 58–63.
2. Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q. et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*// *J. biomed. Mater. Res.* 2000. Vol. 52 (4). P. 662–668.
3. Sondi I., Salopek-Sondi B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria// *J. Colloid Interface Sci.* 2004. Vol. 275. Iss. 1. P. 177–182.
4. Wright J.B., Lam K., Hanson D., Burrell R.E. Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens// *Amer. J. Inf. Cont.* 1999. Vol. 27. P. 344–350.
5. Grier N. Silver and its compounds// In: Block S.S. (ed.). *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 3rd ed. Philadelphia, PA: Lea & Febiger, 1983.
6. Singh M., Singh S., Prasad S., Gambhir I.S. Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles// *Digest J. Nanomaterials Biostructures.* 2008. Vol. 3. № 3. P. 115–122.
7. Sanpui P., Murugadoss A., Durga Prasad P.V. et al. The antibacterial properties of a novel chitosan–Ag-nanoparticle composite// *Int. J. Food Microbiol.* 2008. № 2. P. 142–146.