

Исследование уровня обеззараживающей активности тканевой жидкости у больных хроническим остеомиелитом

Л.В. Розова, З.С. Науменко

Study of the level of tissue fluid disinfecting activity in patients with chronic osteomyelitis

L.V. Rozova, Z.S. Naumenko

Федеральное государственное учреждение науки

«Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова Росздрава», г. Курган
(генеральный директор — заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор В.И. Шевцов)

С применением модифицированного метода определения обеззараживающей активности ткани обследовано шесть больных хроническим остеомиелитом, исследовано 18 проб тканевой жидкости в динамике (на 2-3-и, 7-е и 14-е сутки после операции). Анализ полученных данных показал, что на 2-3-и и даже 7-е сутки после операции у части больных выявляется низкий уровень обеззараживающей активности тканевой жидкости; на 14-е сутки после операции у 100 % обследованных больных, по лабораторным данным, уровень обеззараживающей активности ткани значительно возрастает. Результаты согласуются с литературными данными, свидетельствующими, что выраженное снижение функциональной активности иммунногенеза приостанавливается к 14-м суткам после операции, в поврежденном сегменте резко возрастает обеззараживающая активность тканевой жидкости.

Ключевые слова: обеззараживающая активность тканей, модификация метода, хронический остеомиелит.

Six patients with chronic osteomyelitis have been examined, 18 samples of tissue fluid have been investigated in dynamics (on 2nd–3rd, 7th and 14th postoperative day) using the modified method of tissue disinfecting activity determination. While analyzing the data obtained it has been demonstrated that low level of tissue fluid disinfecting activity in a part of patients is observed on 2nd–3rd and even on 7th postoperative day; and, according to the laboratory data on 14th day after surgery the level of tissue disinfecting activity increases significantly in 100% of the patients being examined. The results are consistent with the data in literature showing that marked decrease of immunogenesis functional activity is halted by 14 postoperative day, tissue fluid disinfecting activity sharply increases in the segment damaged.

Keywords: disinfecting activity of tissues, method modification, chronic osteomyelitis.

Проблема лечения ортопедотравматологической патологии, осложненной хронической гнойной инфекцией, остается актуальной до настоящего времени. Известны различные способы прогнозирования послеоперационных воспалительных осложнений, однако, из-за технической сложности они имеют ограниченное применение. С.А. Паевский предложил способ прогнозирования воспалительных осложнений в послеоперационной ране, основанный на способности тканевой жидкости проявлять обеззараживающие свойства [1, 2]. Механизм обнаруженного эффекта связан с резким усилением обеззараживающих свойств тканевой жидкости в случае безмикробного течения послеоперационного периода за счет синтеза гуморальных факторов, ускоряющих раневой репаративный процесс. Процесс безмикробного благополучного заживления послеоперационной раны закономерно сочетается с усилением обеззараживающего действия тканевой жидкости, и, наоборот, при развитии начальных стадий воспаления отмечается снижение обеззараживающего действия. Было установлено, что усиление бактерицидных свойств при чрезкостном остеосинтезе происходит лишь в случае стабильной фиксации костных отломков в систе-

ме «аппарат + конечность» [3, 4].

Первые работы по определению обеззараживающей активности тканевой жидкости при чрезкостном остеосинтезе были проведены около 20 лет назад. Метод имел ограничения для применения в практике в связи с недостаточной стандартизацией и необходимостью использования субъективных оценок в ходе работы (оценка концентрации микроорганизмов в суспензии визуально, «на глаз», использование «подручного» материала для изготовления дисков, использование неэталонных штаммов для приготовления газона тест-культуры). В связи с развитием методов микробиологических исследований и появлением современного оборудования возникла необходимость стандартизации методик по определению обеззараживающей активности тканевой жидкости. Строгая стандартизация является основой для получения достоверных и воспроизводимых результатов, клиническое значение которых все более возрастает в условиях доказательной медицины.

Целью нашего исследования явилось определение уровня бактерицидной активности тканевой жидкости с применением усовершенствованных, стандартизированных методик исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проанализированы пробы тканевой жидкости в послеоперационном периоде в динамике (на 2-3-и, 7-е и 14-е сутки) у 6 больных хроническим остеомиелитом. Забор тканевой жидкости осуществлялся стандартными стерильными ненагруженными дисками диаметром 5 мм. Диски, пропитанные тканевой жидкостью, и диск с канамицином помещали на агаровую поверхность микробного газона эталонного штамма *Micrococcus lysodeikticus* 4698 ATCC. Стандартизацию тест-культуры *M. lysodeikticus* осуществляли по усовершенствованной методике с

использованием денситометра «Densimat» фирмы «bio Merieux» (Франция) [7]. Посевы инкубировали в термостате при 30°С.

После термостатирования измеряли зону ингибирования роста вокруг диска и определяли результаты. На основе полученных данных по формуле высчитывали уровень обеззараживающей активности тканевой жидкости [5, 6]. Забор материала при скудном выделении тканевой жидкости осуществлялись по усовершенствованной методике [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Известная методика получения суспензии *M. lysodeikticus*, используемой при изготовлении газона для определения обеззараживающей активности тканей, заключалась в следующем: по оптическому стандарту мутности плотностью 5 единиц под визуальным контролем («на глаз») готовили исходную суспензию *m. lysodeikticus*. Затем методом серийных разведений (10^{-1} - $10^{-3,5}$) доводили тест-культуру до конечной концентрации (приблизительно 200-300 тысяч микробных тел в 1 мл) и наносили на питательный агар в чашках Петри [6]. Здесь следует отметить, что от величины посевной дозы зависит плотность роста колоний на газоне и, в конечном итоге, - диаметр зоны ингибирования вокруг исследуемого диска с антимикробным препаратом. Следовательно, при приготовлении исходной суспензии микроорганизма «на глаз» всегда существовала вероятность получения недостоверных результатов, особенно при проведении повторных исследований.

Современная микробиологическая техника позволяет избежать косвенных методов оценки концентрации микроорганизмов в суспензии. Для стандартизации тест-культуры *M. lysodeikticus* использовали денситометр «Densimat» фирмы «bio Merieux». «Densimat» предназначен для измерения плотности суспензий микроорганизмов, используемых для идентификации и определения антибиоточувствительности в системах API, ID 32, ATB, rapid ATB. «Densimat» измеряет как в рассеянном, так и в проходящем свете; соотношение показателей прямо пропорционально плотности бактериальной суспензии, которая выражается в единицах McFarland. Методом прямого подсчета нами было установлено, что суспензия плотностью 0,2 McFarland соответствует концентрации *M. lysodeikticus* $2-3 \times 10^7$ клеток/мл. Таким образом, для получения необходимой концентрации (200-300 тысяч микробных тел в 1 мл) полученную суспензию нужно развести в 100 раз. Приготовленную по этому способу стандартизованную суспензию

использовали для изготовления газонов.

Данный способ позволяет приготовить точно стандартизованную тест-культуру (исключается этап визуального контроля мутности при получении исходной суспензии и метод серийных разведений), используемую для определения обеззараживающей активности тканевой жидкости с минимальными затратами рабочего времени.

Еще одно из ограничений метода заключалось в том, что не все пациенты могли быть обследованы, поскольку методика забора тканевой жидкости заключалась в пропитке стерильного диска из фильтровальной бумаги тканевой жидкостью из спицевых каналов или ран во время перевязки [5]. В случае скудного выделения тканевой жидкости было невозможно определить уровень обеззараживающей активности.

Нами предложен усовершенствованный способ забора тканевой жидкости при отсутствии ее выделения во время перевязки. Стерильный стандартный диск, диаметром 5 мм, укладывают в рану или спицевой канал под сухую повязку. Через 20 – 24 часа диск, пропитанный тканевой жидкостью, снимают и помещают на газон с микробной культурой. Это позволяет определить уровень бактерицидной активности ткани у всех пациентов, включая случаи недостаточного количества или отсутствия выделения тканевой жидкости.

Уровень обеззараживающей активности тканевой жидкости вычисляли по формуле.

$$K = \frac{CАСД \times ЗЗРТЖ}{ЗЗРА},$$

где К – концентрация в мкг в эквиваленте антибиотика; САСД – содержание антибиотика в стандартном диске; ЗЗРТЖ – зона задержки роста тканевой жидкостью; ЗЗРА – зона задержки роста антибиотика.

Например, исследуемый образец пробы тканевой жидкости у больного под № 6 образует зону задержки роста тест-культуры диаметром

18 мм. В этих же условиях стандартный диск с канамицином, содержащий 30 мкг антибиотика, образует зону задержки роста тест-культуры - 23 мм. Тогда концентрация антимикробных веществ тканевой жидкости в эквиваленте антибиотика будет составлять 23,5 мкг:

$$K = \frac{30\text{мкг} \times 18\text{мм}}{23\text{мм}} = 23,5\text{мкг}.$$

Уровень обеззараживающей активности исследуемой тканевой жидкости определяли по сравнению с общеизвестной средней терапевтической минимальной подавляющей концентрации (СТМПК) антибиотика. Известно, что для канамицина СТМПК составляет 15-20 мкг/мл, поэтому уровень эквивалента по канамицину бактерицидной активности тканевой жидкости оценивается следующим образом: ниже 15 мкг/мл оценивается как низкий, от 15-20 мкг/мл – средний, выше – 20 мкг/мл – высокий [9].

С помощью основных методов и усовершенствованных методик нами было обследовано в динамике шесть больных хроническим остеомиелитом и взято 18 проб тканевой жидкости на 2-3-и, 7-е и 14-е сутки после операции (табл. 1).

Как видно из представленных результатов, на 2-3-и сутки после операции у трех больных, по лабораторным данным, был получен низкий уровень обеззараживающей активности тканей (ОАТ), у двух – средний, у одного – высокий (зона ингибирования роста составляла 16 мм, концентрация в эквиваленте к канамицину – 21,8 мкг).

На седьмые сутки после операции: у двух больных был выявлен низкий уровень ОАТ: в одном случае зона торможения роста отсутствовала, в другом составила 13 мм. У четверых больных был отмечен средний уровень ОАТ: концентрация бактерицидных веществ в тканевой жидкости составляла 17-20 мкг.

На 14-е сутки после операции у всех обследованных больных выявлен высокий уровень обеззараживающей активности тканевой жидкости в эквиваленте к канамицину - концентрация бактерицидных веществ варьировала от 21,6 до 35 мкг.

Это подтверждают и литературные данные, что на 14-е сутки лечения в поврежденном сегменте резко возрастает обеззараживающая активность тканевой жидкости.

Таблица 1

Зоны торможения роста тест-культуры и уровень обеззараживающей активности тканевой жидкости в эквиваленте к канамицину у больных хроническим остеомиелитом

№ п/п	После операции	Диаметр зоны торможения роста (мм)*	Концентрация в мкг в эквиваленте антибиотика	Уровень обеззараживающей активности тканевой жидкости
1	2-3-и сутки	11	14,9	низкий
	7-е сутки	—**	—	низкий
	14-е сутки	22	30,0	высокий
2	2-3-и сутки	—	—	низкий
	7-е сутки	11	17,0	средний
	14-е сутки	38	35,0	высокий
3	2-3-и сутки	10	14,9	низкий
	7-е сутки	13	13,0	низкий
	14-е сутки	20	30,0	высокий
4	2-3-и сутки	12	16,0	средний
	7-е сутки	25	19,0	средний
	14-е сутки	24	32,5	высокий
5	2-3-и сутки	16	21,8	высокий
	7-е сутки	15	18,6	средний
	14-е сутки	18	21,6	высокий
6	2-3-и сутки	22	20,0	средний
	7-е сутки	11	20,0	средний
	14-е сутки	18	23,5	высокий

Примечание: * – Диаметр зоны ингибирования роста тест-культуры вокруг диска с тканевой жидкостью; ** – отсутствие зоны торможения роста тест-культуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хронический остеомиелит представляет собой синдромокомплекс компенсаторно-приспособительных и патологических реакций организма, при которых особое значение приобретает состояние иммунной системы организма, включая факторы неспецифической резистентности. Обеззараживающая активность тканевой жидкости относится к факторам неспецифической резистентности, является интегральным показате-

лем антимикробных свойств и обусловлена действием множества идентифицированных и неидентифицированных веществ химической и биологической природы.

Как показали исследования по изучению иммунного статуса больных травматической болезнью с целью оценки влияния оперативного вмешательства на состояние иммунной системы с применением дорогостоящих методов (определе-

ние субпопуляционного состава лимфоцитов с помощью моноклональных антител) и математического моделирования, сама операция в первые послеоперационные дни приводит к угнетению иммунной системы, к концу первой послеоперационной недели наблюдается положительная динамика, а выраженное снижение функциональной активности иммуногенеза приостанавливается к 14-м суткам после операции [10].

Анализ полученных данных по исследованию тканевой жидкости показал аналогичные результаты: на 2-3-и и даже 7-е сутки после операции у части больных был выявлен низкий уровень обеззараживающей активности ткане-

вой жидкости. На 14-е сутки после операции у 100 % обследованных больных, по лабораторным данным, уровень обеззараживающей активности ткани был высоким. Следовательно, неинвазивная недорогостоящая методика определения уровня обеззараживающей активности ткани может быть применена для оценки напряженности факторов неспецифической резистентности в ранний послеоперационный период с прогностической целью. Стандартизация, модификация метода обуславливает его доступность и возможность применения для исследования больных в динамике с наименьшими затратами времени и средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Паевский, С. А. Способ ранней диагностики инфицирования послеоперационной раны / С. А. Паевский // Лабораторное дело. – 1988. - № 8. - С. 55-58.
2. Паевский, С. А. Способ лабораторного прогнозирования воспалительных осложнений в послеоперационном периоде у хирургических больных / С. А. Паевский // Актуальные вопросы клинической микробиологии в неинфекционной клинике : тез. докл. II всесоюз. конф. В 2-х ч. – М., 1988. – Ч. 1. - С. 13-14.
3. Паевский, С. А. Способ определения бактерицидной активности тканей при лечении ортопедических больных методом чрескостного остеосинтеза / С. А. Паевский // Клиническая лабораторная диагностика. – 1993. - № 5. - С. 25-29.
4. Паевский, С. А. Исследование механизма saniрующего эффекта при чрескостном остеосинтезе аппаратом Илизарова / С. А. Паевский // Травматология и ортопедия. – 1994. - № 2. - С. 21-30.
5. А.с. 1781610 СССР, А 61 В 10/00 Способ определения бактерицидной активности тканей / С.А. Паевский (СССР). - № 4875467 / 14 ; Заявл. 16.10.1990; Опубл.15.12.92. Бюл. № 46.
6. Новые способы ранней диагностики и профилактики воспаления, у ортопедотравматологических больных при компрессионно-дистракционном остеосинтезе : метод. рекомендации / ВКНЦ «ВТО»; сост. : С. А. Паевский, А. М. Аранович. – Курган, 1991. – 31 с.
7. Удостоверение № 103 / 02 на рац. предложение. Метод стандартизации тест - культуры для определения обеззараживающей активности тканей с использованием денситометра / Л. В. Розова, З. С. Науменко ; РНЦ «ВТО».
8. Удостоверение № 84 / 01 на рац. предложение. Усовершенствование методики забора тканевой жидкости для определения уровня бактерицидной активности тканей (обеззараживающего эффекта) / Л. В. Розова, З. С. Науменко ; РНЦ «ВТО».
9. Справочник по антибиотикам / под ред. С. М. Навашина, И. П. Фоминой. - М. : Медицина, 1974. – С. 34–41.
10. Котельников, Г. П. Состояние иммунного статуса гомеостаза при оперативном лечении переломов у больных с травматической болезнью / Г. П. Котельникова, И. Г. Труханова // Медицинская иммунология. – 2003. – Т. 5, № 3-4. - С. 400–401.

Рукопись поступила 15.12.05.