

© Руденко А. В., Кругліков В. Т., Степанова Н. М., Лебідь Л. О., Колесник М. О., 2014

УДК 616.61-002.3 -022.7/.9-036.12-039.35

А. В. РУДЕНКО, В. Т. КРУГЛІКОВ, Н. М. СТЕПАНОВА, Л. О. ЛЕБІДЬ, М. О. КОЛЕСНИК
СПЕКТР МІКРОФЛОРИ СЕЧІ ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ РЕЦИДИВУЮЧИЙ ПІЄЛОНЕФРИТ
(ДЕСЯТЬ РОКІВ СПОСТЕРЕЖЕННЯ)

RUDENKO, V. KRUGLIKOV, N. STEPANOVA, L. LEBID, M. KOLESNYK
SPECTRUM OF MICROFLORA IN URINE OF PATIENTS WITH CHRONIC RECURRENT
PYELONEPHRITIS
(THE TEN YEARS FOLLOWING-UP)

ДУ «Інститут нефрології НАМН України», м. Київ

SI "Institute of Nephrology NAMS of Ukraine", Kyiv

Ключові слова: хронічний рецидивуючий пієлонефрит, збудники, механізми персистенції.**Key words:** chronic recurrent pyelonephritis, pathogens, mechanisms of persistence.**Резюме.** Целью данной работы была сравнительная оценка видового спектра бактериальных возбудителей хронического рецидивирующего пиелонефрита при лонгитудинальном исследовании.**Материалы и методы.** Проведены комплексные микробиологические исследования мочи, соскобов из цервикального канала и вагинальных мазков 386 женщин, больных хроническим пиелонефритом.**Результаты исследования.** Анализ спектра микрофлоры, выделенной из мочи больных на протяжении 10 лет, выявил существенный рост удельного веса *Enterococcus spp.* (до 18,6 %). В процессе рецидивирования хронического пиелонефрита у 64,3 % больных выявлены изменения спектра возбудителей с преобладанием *E. faecalis* та *S. epidermidis* (по 14,3 %). Параллельно установлено наличие условно-патогенной микрофлоры у обследованных женщин в вагинальных мазках (40,1 %) и соскобах из цервикального канала (30,8 %). Рассмотрены механизмы персистенции бактерий в мочеполовых путях у женщин, страдающих хроническим рецидивирующим пиелонефритом.**Заключение.** Подчеркнута важность всестороннего изучения спектра и свойств возбудителей, обуславливающих обострения хронического пиелонефрита, и механизмов течения заболевания.**Summary.** The aim of this work was to compare the specific spectrum of bacterial pathogens which stipulate chronic recurrent pyelonephritis during the longitudinal following-up.**Materials and methods.** There were performed the complex microbiologic investigations of urine, scrapes from cervical canal and vaginal smears from 386 women with chronic pyelonephritis.**Results.** The analysis of the spectrum of microflora separated out of the patients' urine during 10 years showed the considerable growth of the specific weight of *Enterococcus spp.* (up to 18,6 %). In the process of chronic pyelonephritis recurrence in 64,3 % patients showed the changes in the specific spectrum of pathogens with the prevalence of *E. faecalis* and *S. epidermidis* (14,3 % each). At the same time, there was stated the presence of opportunistic microflora in vaginal smears (40,1 %) and scrapes from cervical canal (30,8 %) of the examined women. The mechanism of bacteria persistence in urogenital tracts in women with chronic recurrent pyelonephritis was also under study.**Conclusion.** There has been confirmed the importance of the comprehensive study of the spectrum and specificity of pathogens which can stipulate the aggravation of chronic pyelonephritis and mechanisms of its course.

ВСТУП. Інфекційно-запальні захворювання нирок, зокрема пієлонефрит, на сьогодні посідають перше місце у структурі хронічної хвороби нирок (66,06%) [7-9]. Незважаючи на досягнення у вивченні етіології та патогенезу цих захворювань, у розробці нових методів їх діагностики та терапії тенденції до зниження частоти даної патології нирок не відмічається. Навпаки, спостерігається збільшення кількості

хворих з хронічним латентним та/або рецидивуючим перебігом захворювання [8].

Пієлонефрит — найбільш поширене інфекційно-запальне захворювання нирок, причому більше ніж у 25 % жінок, що перенесли гострий пієлонефрит, розвивається хронічний рецидивуючий перебіг захворювання [12, 18]. Хронічний пієлонефрит (ХПН) — інфекційно-індуковане вогнищеве ураження інтерстицію нирок з формуванням рубців і наступним пошкодженням всіх структур нефрона [8]. Поширення і хронізація пієлонефриту також в значній мірі пов'язані як із суттєвою трансформацією мікробного спектру сечової системи, що має місце з різних причин, так і з імунодефіцитним станом хворого [2, 6, 9, 25].

Руденко Ада Вікторівна
miclab@mail.ru

Відтак для розвитку інфекційно-запального процесу в нирках мають значення не тільки стан макроорганізму, а біологічні властивості бактерій, наявність фібрій, схильність до адгезії, можливість продукувати фактори, що пошкоджують епітелій сечових шляхів, загалом - вірулентність збудника [2, 9, 24].

За даними літератури та результатами попередніх досліджень найбільш частими збудниками пієлонефриту є грамнегативні мікроорганізми, насамперед, кишкова паличка, а також ентерококи та стафілококи. Етіологічна роль грампозитивних коків збільшується за хронічних процесів та усіляких ускладнень. У понад 20 % хворих на пієлонефрит, як правило, виділяються мікробні асоціації, основними учасниками яких є кишкова паличка та ентерококи [7, 12, 23]. Характерно, що впродовж хвороби може відбуватися зміна збудника інфекційного процесу та поява полірезистентних штамів мікроорганізмів. Особливо небезпечно це при безконтрольному та безсистемному застосуванні антибактеріальних препаратів [15, 17, 20].

МЕТОЮ нашого дослідження було вивчення спектру бактеріальних збудників хронічного рецидивуючого пієлонефриту (ХРПН) та визначення його особливостей в динаміці спостереження.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Матеріалом для досліджень були сеча, зіскреби зі слизової оболонки цервікального каналу та мазки з піхви 386 жінок, хворих на ХПН, які знаходились на лікуванні у ДУ «Інститут нефрології НАМН України» з 2003 по 2013 роки.

Кількісне визначення бактерій проводили шляхом посіву матеріалу на тверді поживні середовища – агарі: кров'яний, поживний, жовточно-сольовий, Левіна. Визначали показник мікробного числа кожного з видів бактерій та виділяли чисті культури. Ідентифікацію виявлених бактерій за їх морфологічними, культуральними, біохімічними властивостями проводили за Bergey's [14]. В роботі використовували поживні середовища фірми «Hi Media» (Індія).

Статистичну обробку результатів дослідження проводили, використовуючи параметричні методи з застосуванням програми STATISTICA 6.1 for Windows [11].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. У результаті проведених мікробіологічних досліджень при першому зверненні 386 жінок, хворих на ХПН, із сечі 250 (64,7 %) з них виділено 302 штами умовно-патогенних аеробних бактерій.

Для вивчення змін видового спектру бактерій у часі виділені штами було розподілено за двома періодами спостереження: I – 2003-2008 р.р. (n=142), II – 2009-2013 р.р. (n=160).

Більшість серед штамів, виділених в I та II періоди, склали ентеробактерії – 58,5±4,1 % та 63,0±3,8 % відповідно, а саме, кишкова паличка (*E.coli*) – 47,9±4,2 % та 51,9±3,9 %, протеї (*Proteus spp.*) – 4,9±1,8 % та 3,1±1,4 %, клебсієла (*K.pneumoniae*) – 2,8±1,4 % та 4,4±1,6 %, інші представники ентеробактерій – 3,0±2,0 % та 3,6±2,2 %. *P.aeruginosa* виявляли рідко – 2,1±1,2 % та 1,9±1,1 %. Решту виділених бактерій склали грампозитивні коки – 36,6±4,0 % 32,3±3,4 % відповідно (рис. 1).

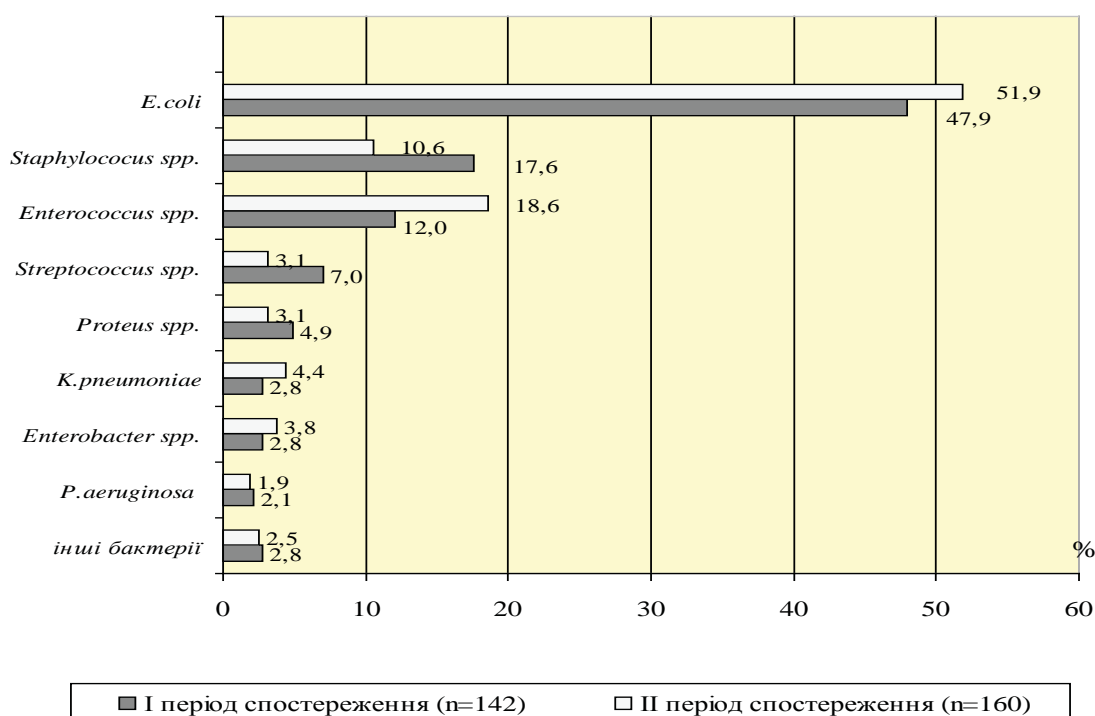


Рис. 1. Спектр бактеріальної флори, виділеної із сечі жінок, хворих на ХПН

За отриманими даними тенденція до збільшення частоти виділення мікроорганізмів на протязі десяти років спостереження простежується для більшості ентеробактерій, крім *Proteus spp.* Проте, щодо кокової мікрофлори, така тенденція характерна лише для ентерококів – від $12,0 \pm 2,7$ % до $18,6 \pm 3,1$ % ($p < 0,05$), частота ж виділення стафілококів та стрептококів зменшувалась від $17,6 \pm 3,2$ % до $10,6 \pm 2,4$ % ($p < 0,05$) та від $8,0 \pm 2,3$ % до $3,1 \pm 1,4$ % ($p > 0,05$) відповідно (рис. 1).

За видовим складом серед стафілококів на протязі десяти років як в I, так і в II періо-

ди превалював *S.epidermidis* – $44,0 \pm 9,9$ % та $47,1 \pm 12,1$ %. Відмічено зниження частоти виділення *S.saprophyticus* з $24,0 \pm 8,5$ % до $5,9 \pm 5,7$ % та підвищення *S.haemolyticus* – з $4,0 \pm 3,9$ % до $29,4 \pm 11,0$ %. (рис. 2). Серед стрептококів в обидва періоди спостереження частіше виділявся *S.alpha-haemolyticus* – $70,0 \pm 14,5$ % та $80,0 \pm 17,9$ %, що відноситься до нормальної мікрофлори, а серед ентерококів – *E.faecalis* – $76,5 \pm 10,3$ % та $80,0 \pm 7,3$ % (рис. 3, 4).

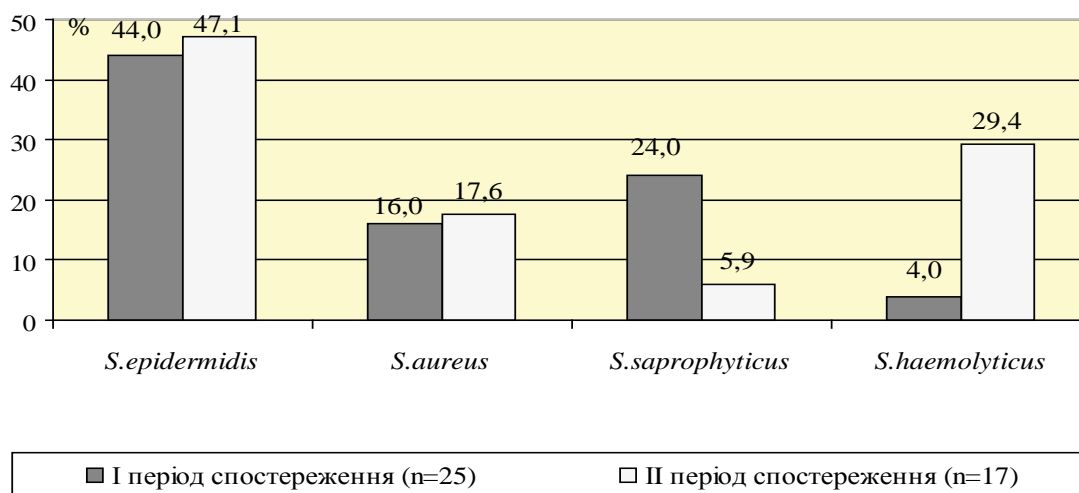


Рис. 2. Розподіл штамів *Staphylococcus spp.*, виділених із сечі жінок, хворих на ХПН

Таким чином, аналіз спектру мікрофлори, виділеної із сечі хворих на ХПН жінок при першому зверненні, виявив суттєве зростання питомої ваги *Enterococcus spp.*, зокрема *E. faecalis*.

Це може бути пов'язано з розповсюдженням високовірulentних штамів *E. faecalis*, починаючи з 80-х років минулого сторіччя [3].

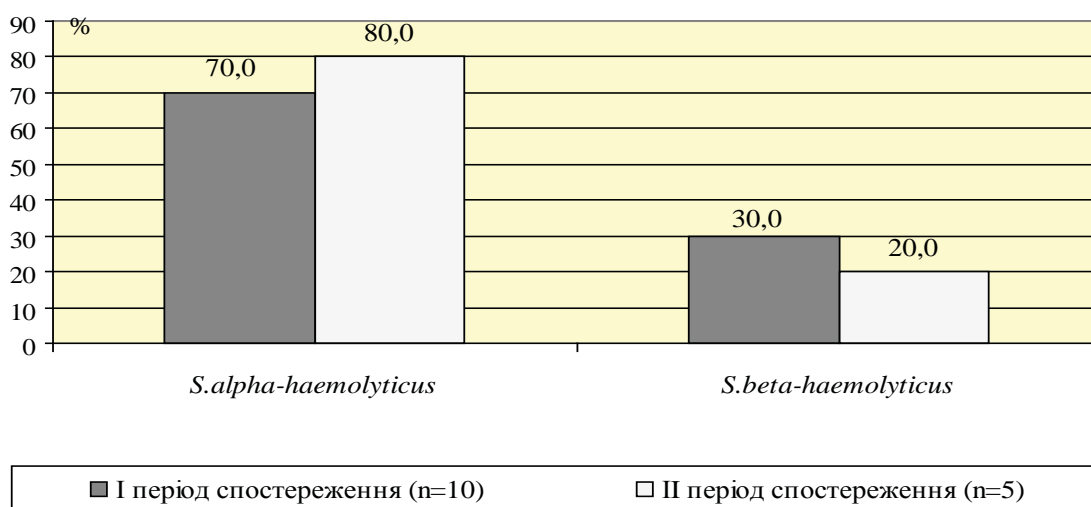


Рис. 3. Розподіл штамів *Streptococcus spp.*, виділених із сечі жінок, хворих на ХПН

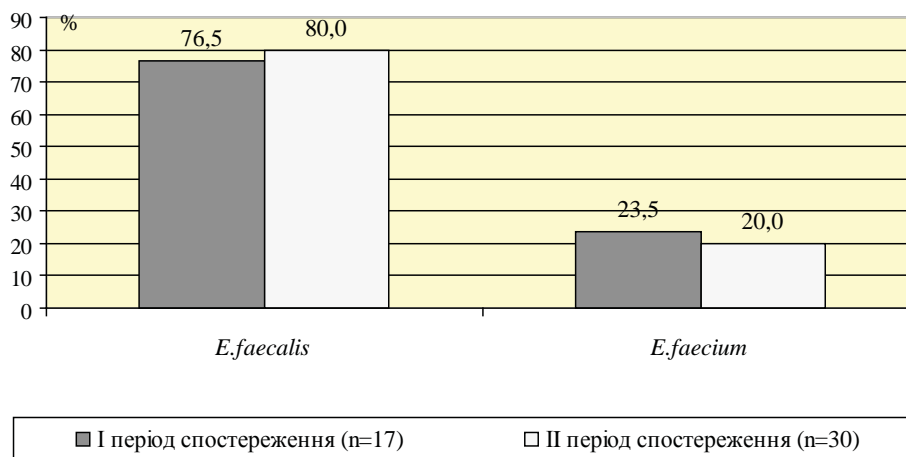


Рис. 4. Розподіл штамів *Enterococcus spp.*, виділених із сечі жінок, хворих на ХПН

Одним з важливих критеріїв оцінки вірулентності ентерококів є резистентність до антибіотиків. Відмічено здатність цих мікроорганізмів набувати стійкості до антибактеріальних препаратів як за рахунок переносу плазмід і/або транспозонів, так і хромосомного обміну або мутацій. Відтак, на сьогодні ентерококам притаманний широкий спектр природної стійкості до антибіотиків різних класів, таких як цефалоспорины, пеніциліни, аміноглікозиди, хінолони та лінкозаміди [21].

Проте вирішальним фактором в оцінці спроможності патогенних штамів *E. faecalis* обумовлювати інфекцію сечової системи є наявність генів вірулентності. Зараз відомо, що такі штами мають так звані «острівці патогенності», в яких зосереджені гени, що обумовлюють їх вірулентність, а саме *ace* (поверхневий білок, що зв'язується з колагеном), *act* (поверхневий антиген), *agg* (агрегаційна субстанція), *agrBfs* (AgrBfs протеїн *E. faecalis*), *esp* (ентерококовий поверхневий протеїн), *hyl* (гіалуронідаза), *cyl ABLM* (гемолізін), *efaAfs* (ендокардит-специфічний антиген), *sag A* (антиген, що секретується) та *gel E* (желатиназа) [22].

Продовжується також поступове збільшення за останні десятиліття етіологічної ролі ентеробактерій при ХПН, і насамперед *E. coli*. Це пояснюється зростанням популяції *E. coli* з наявністю таких властивостей як антибіотикорезистентність та патогенність, а саме стійкість до фагоцитозу, адгезивність, продукція гістоуражуючих субстанцій (цитотоксини, ферменти, метаболіти), що сприяє поступовому витісненню стафілококів в якості збудників ХПН [9, 16, 24, 26].

Виявлено зміни видового спектру серед виділеної мікрофлори в процесі рецидивування ХПН. Спостереження проводили за 28 хворими в динаміці їх лікування за наявності рецидивів після проведеної терапії на протязі від трьох місяців до двох років. Більш ніж у половини обстежених (64,3 %) у віддалений період в сечі виявляли мікроорганізми, відмінні за видовим спектром від виділених при первинному бактеріологічному обстеженні. Показано, що в дебюті захворювання превалювали штами *E. coli* (39,2 %) та *S. aureus* (10,7 %), а після декількох рецидивів домінуюче положення займали вже *E. faecalis* та *S. epidermidis* (по 14,3 %; рис. 5).

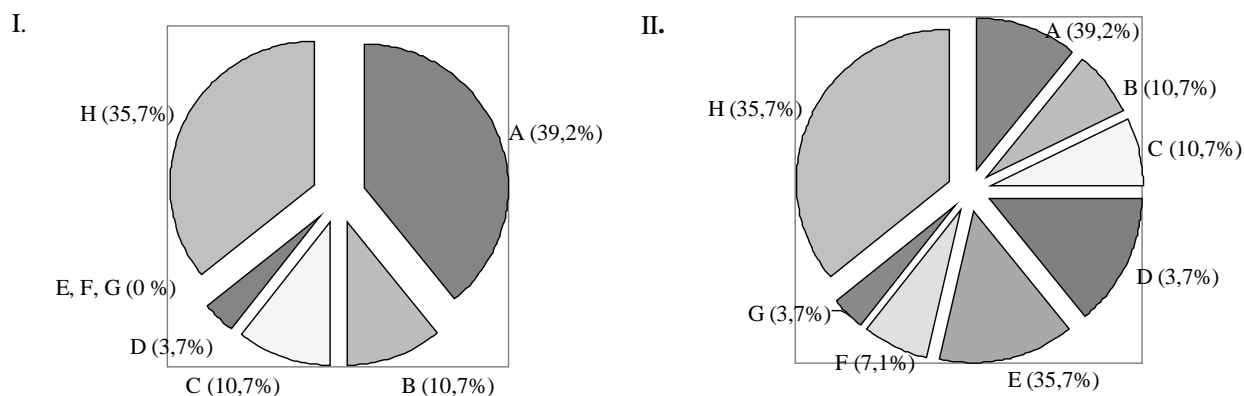


Рис. 5. Зміни спектру бактеріальної флори, виділеної із сечі жінок, хворих на ХРПН за період спостереження

A – *E. coli*, B – *S. aureus*, C – *S. haemolyticus*, D – *E. faecalis*, E – *S. epidermidis*, F – *Enterobacter spp.*, G – *S. α-haemolyticus*, H – зміни збудника не відбулося; I – в дебюті захворювання (n=28), II – після рецидивів (n=28)

Важливими є результати мікробіологічного дослідження біологічного матеріалу із статевих шляхів жінок репродуктивного віку, хворих на ХРПН. У 52 % таких пацієнток виявлено супутні запальні захворювання органів малого тазу [8].

За нашими даними з 182 обстежених у 73 (40,1 %) умовно-патогенні бактерії були виділені в мазках піхви, а у 56 (30,8 %) – з зіскребів цервікального каналу, причому в піхві переважали ентерококи (25,3 %), а в цервікальному каналі – стафілококи (18,7 %; рис. 6).

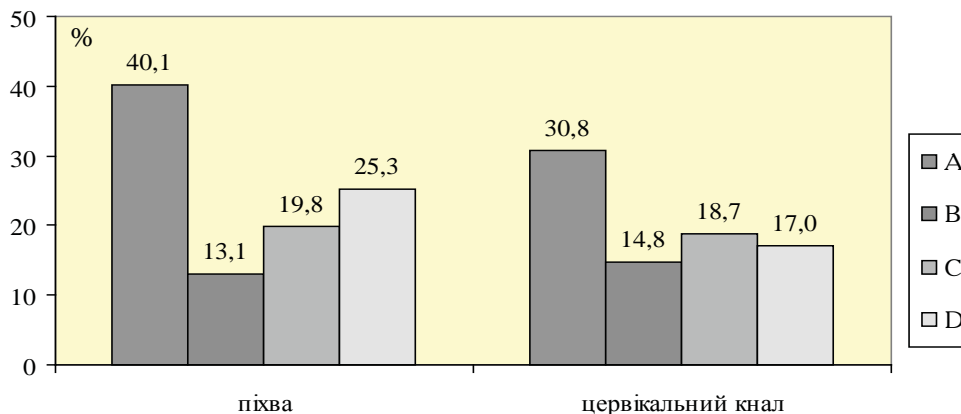


Рис. 6. Частота виділення умовно-патогенних бактерій з біологічного матеріалу із статевих шляхів жінок, хворих на ХРПН

A – всього, B – *E. coli*, C – *Staphylococcus spp.*, D – *Enterococcus spp.*

Аналізуючи отримані дані можна дійти висновку, що спектр бактеріальних збудників ХПН поступово змінюється у часі за рахунок появи більшої кількості вірулентних штамів того чи іншого виду. Також відбуваються зміни видового складу збудників й при рецидивуванні ХПН, а сама кількість випадків рецидивуючого пієло-нефриту залишається вельми високою.

Що може бути причиною ХРПН? Чому при ХРПН так часто виділяються збудники бактеріальної природи та відбуваються їх зміни впродовж тривалого часу незалежно від багатьох курсів проведеної антибіотикотерапії?

Наведені вище дані свідчать про те, що мікрофлора, виявлена в статевих шляхах, які виступають своєрідним «резервуаром» накопичення бактерій, може бути потенційною загрозою для подальшого інфікування сечової системи, обумовлюючи тим самим наступні рецидиви ХПН та зміну спектру збудників.

Раніше було показано, що бактеріальний фактор формування рецидивуючого перебігу ХПН є одним з основних складових цього захворювання [8, 12]. Застосоване етіотропне лікування хворих на ХРПН не гарантує звільнення організму від збудника [12, 18]. Так, мікроорганізм або декілька мікроорганізмів можуть довготривало персистувати в організмі хворого і, за наявності сприятливих умов, активізуватися, викликаючи черговий рецидив та змінюючи один одного [1, 13].

Існує декілька механізмів персистенції. По-перше, це поява в популяції великої кількості полірезистентних бактерій, чому безперечно сприяє широке використання антибіотичних препаратів; по-друге, поява вірулентних штамів бактеріальних збудників. Ці бактерії за рахунок набуття таких властивостей як антилактофери-

нова активність, антилізоцимна активність та деякі інші можуть довготривалий час персистувати в організмі хворого [1].

Певна кількість бактерій може персистувати в організмі у вигляді L-форм, що утворюються внаслідок впливу антибіотичних препаратів і не виявляються загальноприйнятими методами лабораторної діагностики. L-форми бактерій, тобто такі, що в даний період втратили клітинну оболонку, відрізняються тим, що виявляють стійкість до різних класів антибіотиків, спроможність виживати за несприятливих умов, а за сприятливих для них умов – трансформуватись у батьківський вид. [10].

Згідно наукових розробок останніх років вважається, що самою розповсюдженою формою персистування бактерій є знаходження їх у біоплівках. Встановлено, що біоплівки можуть утворювати понад 90 % відомих видів бактерій, а їх формування виявляється у 80 % випадків хронічних захворювань мікробної етіології [5].

Біоплівка – це форма організації життєдіяльності мікроорганізмів. Це не просто скупчення бактерій на певній поверхні. Біоплівка – конгломерат, що складається з клітинного компоненту – моно- або асоціації культур мікроорганізмів та неклітинного матриксу, що являє собою складну біохімічну суміш полісахаридів, глікопептидів, нуклеїнових кислот та ліпідів. Суттю існування біоплівки є захист бактерій від несприятливих фізичних, хімічних та біологічних факторів навколишнього середовища. Для мікроорганізмів, що знаходяться у біоплівках, характерні такі властивості, як зниження чутливості до антимікробних хіміопрепаратів, можливість запобігання впливу імунної системи, продукція різних метаболітів, спроможність передачі інформації між самими

мікроорганізмами за допомогою спеціальних сигнальних систем [4]. Завдяки такій структурі зруйнувати біоплівку дуже важко – туди не проникає жоден антибіотик, - а бактерії, в свою чергу, «виходять» з поверхневого шару за її межі і знову провокують інфекційно-запальний процес, тобто рецидив [19].

ВИСНОВКИ. Все сказане вище дозволяє зробити висновок про важливість подальшого всебічного вивчення спектру і властивостей збудників ХРПН, механізмів його перебігу та особливостей, що в значній мірі сприятиме ефективній розробці й впровадженню нових методів лікування цього захворювання.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Бухарин О.В. Механізми виживання бактерій / О. В. Бухарин, А. Л. Гинцбург, Ю. М. Романова [и др.]. – М.: Медицина, 2005. – 367 с.
2. Возіанов О.Ф. Гострий пієлонефрит у жінок репродуктивного віку. Чинники запального процесу нирок й фактори, що сприяють його розвитку / О. Ф. Возіанов, С. П. Пасечніков, А. В. Руденко [та ін.] // Урологія. – 2010. – Т. 14 (додаток). – С. 97-102.
3. Гармашева И. Л. Биологическая активность и безопасность энтерококков / И. Л. Гармашева, Н. К. Коваленко // Микробиол. журн. – 2011. – Т. 73, № 4. – С. 77-84.
4. Голуб А. В. Бактериальные биопленки – новая цель терапии ? / А. В. Голуб // Клин. микробиология и антимикробн. химиотерапия. – 2012. – Т. 14, № 1. – С. 23-29.
5. Гостев В.В. Бактериальные биопленки и инфекции / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // Журн. инфектологии. – 2010. - № 2 (3). – С. 4-15.
6. Есиловский Ю. М. Патогенез пиелонефрита: монография / Ю. М. Есиловский. – М.: МЕД прессинформ, 2007. – 368 с.
7. Колесник М. О. Спектр бактеріальної мікрофлори урогенітального тракту у хворих на хронічний пієлонефрит та її чутливість до антибіотиків / М. О. Колесник, А. В. Руденко, В. Т. Кругліков [та ін.] // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2010. – № 4. – С. 5-10.
8. Колесник Н. А. Концептуальная модель рецидивирующих инфекций мочевой системы / Н.А. Колесник, Г. Н. Дранник, В. Е. Дриянская [и др.] // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2011. - № 2 (30). – С. 5-17.
9. Колесник М. Патогенез пієлонефриту: що ми знаємо і що ні / М. Колесник, Н. Степанова, В. Дриянская [та інші] // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2011. - № 3 (31). – С. 34-46.
10. Коротяев А. И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев. – С.-Пб.: СпецЛит, 2008. – 767 с.
11. Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных: применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва – М.: Медиа Сфера, 2002. – 312 с.
12. Романенко О. А. Особливості мікробного спектру сечостатевої системи жінок з рецидивуючим пієлонефритом / О. А. Романенко, Н. М. Степанова, А. В. Руденко [та ін.] // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2013. – № 1 (37). – С. 25-31.
13. Фильчаков И. В. Персистенция бактерий и формирование доминантных популяций возбудителя / И. В. Фильчаков, А. М. Зарицкий // Сучасні інфекції. – 2005. - № 2. – С. 20-27.
14. Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи. В 2-х томах / Дж. Хоулт, Нью Криг, П. Смит [и др.]. – М.: Мир, 1997. – 800 с.
15. Яровой С. К. Современное состояние антибиотикорезистентности основных возбудителей пиелонефрита / С. К. Яровой, В. А. Максимов, Н. А. Шиманский, Е. Н. Карева // Урология. – 2010. - № 2. – С. 21-27.
16. van Duin D. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes / D. van Duin, K. S. Kaye, E. A. Neuner, R. A. Bonomo // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2013. – Vol. 75, № 2. – P. 115-120.
17. Gould I. M. Antibiotic resistance: the perfect storm / I. M. Gould // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2009. – Vol. 34, Suppl. 3. – P. 52-55.
18. Grabe (Chairman) M. Guidelines on urological infections / M. Grabe (Chairman), V. C. Bishop, T. E. Bjerklund-Johansen [et al.] // European Association of Urology. – 2012. – 109 p.
19. Hoiby N. Antibiotic resistance of bacterial biofilms / N. Hoiby, N. Bjarnsholt, M. Givskov [et al.] // Int. J. Antimicrob. Agents. – 2010. – Vol. 35, № 4. – P. 322-332.
20. Mandell G. L. Principles for practice of infectious diseases / G. L. Mandell, J. E. Bennet, R. Dolin. – Churchill Livingstone, 2000. – 682 p.
21. Mundy L. M. Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance / L. M. Mundy, D. F. Sahm, M. Gilmore // Clin. Microbiol. Rev. – 2000. – Vol. 13, № 4. – P. 513-522.
22. Pillar C. M. Enterococcal virulence – pathogenicity island of *E.faecalis* / C. M. Pillar, M. S. Gilmore // Front. Biosci. – 2004. – Vol. 9. – P. 2335-2346.
23. Ramakrishnan K. Diagnosis and management of acute pyelonephritis in adults / K. Ramakrishnan, D. C. Scheid // Am. Fam. Physician. – 2005. – Vol. 71, № 5. – P. 933-942.
24. Salvatore S. Urinary tract infections in women / S. Salvatore, E. Cattoni, G. Siesto [et al.] // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2011. – Vol. 156, № 2. – P. 131-136.
25. Tamaki K. Chronic pyelonephritis: Pathogenesis, pathophysiology and therapy / K. Tamaki, T. Kusumoto, S. Okuda // Nippon Rinsho. – 2006. – Vol. 64, Suppl. 2. – P. 485-488.
26. Vranes J. Low virulence of *Escherichia coli* strains causing exacerbation of chronic pyelonephritis / J.Vranes, S Schonwald, N. Sterk-Kuzmanovic [et al.] // Acta Clin. Croat. – 2000. – Vol. 40. – P. 165-170.

Надійшла до редакції 22.04.2014

Прийнята до друку 19.05.2014