

В.А. КОСИНЕЦ

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ ОСНОВНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ РАСПРОСТРАНЕННОГО ГНОЙНОГО ПЕРИТОНИТА

ГОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова»,
Российская Федерация
УО «Витебский государственный медицинский университет»,
Республика Беларусь

Цель. Создать тест-системы для идентификации грамотрицательных и неклостридиальных анаэробных микроорганизмов и определения их чувствительности к антибактериальным препаратам, разработать эффективные схемы антибактериальной терапии при лечении пациентов с распространенным гнойным перитонитом.

Материал и методы. С помощью разработанных тест-систем проведены исследования перитонеального экссудата 85 пациентов с распространенным гнойным перитонитом. Изучен характер грамотрицательной аэробной и неклостридиальной анаэробной микрофлоры, определена ее чувствительность к антибактериальным препаратам, а также предложены эффективные схемы рациональной антибактериальной терапии.

Результаты. Доминирующая роль в развитии перитонита принадлежит кишечной палочке (54,9%) и бактероидам (63,4%). Рациональное применение антимикробных препаратов в до- и послеоперационных периодах во многом предопределяют успех лечения распространенного гнойного перитонита. На основании данных об этиологической структуре и чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам нами установлены следующие эффективные схемы рациональной эмпирической антибактериальной терапии распространенного гнойного перитонита: цефалоспорины III поколения + метронизадол; цефалоспорины III поколения + аминогликозиды + метронизадол; цефалоспорины IV поколения + метронизадол; карбапенемы (имопинем, меропенем); фторхинолоны + метронизадол.

Заключение. Для идентификации грамотрицательных микроорганизмов и определения их чувствительности к антибактериальным препаратам разработаны тест-системы «ИД-ЭНТ» и «АБ-ГРАМ(-)», для облигатно-анаэробных микроорганизмов – «ИД-АНА» и «АБ-АН», соответственно. Разработанные тест-системы характеризуются большим разнообразием антибиотиков, относительной дешевизной, простотой в изготовлении, эксплуатации, быстротой определения чувствительности и могут найти широкое применение для определения чувствительности штаммов возбудителей хирургической инфекции в бактериологических лабораториях различного профиля.

Ключевые слова: распространенный гнойный перитонит, тест-системы, аэробы, анаэробы, антибактериальная терапия

Objectives. To create test-systems for identification of gram-negative and non-clostridial anaerobic microorganisms and for determination of their sensitivity to antibacterial preparations, to work out effective schemes of the antibacterial therapy at treatment of patients with widespread purulent peritonitis.

Methods. By means of the developed test systems investigations of peritoneal exudate of 85 patients with widespread purulent peritonitis have been carried out. The character of gram-negative aerobic and non-clostridial anaerobic microflora has been studied, its sensitivity to antibacterial preparations has been defined, and also effective schemes of rational antibacterial therapy have been suggested

Results. The dominating role in peritonitis development belongs to *E.coli* (54,9 %) and *B. fragilis* (63,4 %). Rational application of antimicrobial preparations in pre – and postoperative periods in many respects predetermine success of treatment of widespread purulent peritonitis. On the basis of data on the etiologic structure and sensitivity of microorganisms to antimicrobial preparations we have established the following effective schemes of rational empirical antibacterial therapy of widespread purulent peritonitis: cephalosporins of III generation + metronidazole; cephalosporins of III generation + aminoglycosides + metronidazole; cephalosporins of IV generation + metronidazole; carbapenems (imipenem, meropenem); fluoroquinolones + metronidazole.

Conclusions. «ID-ENT» and «AB-GRAM (-)» test systems have been developed for identification of gram-negative microorganisms and determination of their sensitivity to antibacterial preparations, for obligate anaerobic microorganisms – «ID-ANA» and «AB-AN», respectively. The developed test systems are characterized by a great variety of antibiotics, relative low cost, simplicity in manufacturing and use, speed of determination of sensitivity and can find a wide application for determination of sensitivity of strains of causative agents of a surgical infection in bacteriological laboratories of a various profile.

Keywords: widespread purulent peritonitis, test-systems, aerobs, anaerobs, antibacterial therapy

Введение

В современных условиях не утратила своего значения проблема лечения распространенного гнойного перитонита [1, 2, 3, 4]. Причиной этому служит многофакторное системное поражение фактически всех органов. Ведущая роль в развитии осложнений и неблагоприятных исходов при данном заболевании принадлежит синдрому энтеральной недостаточности, а основным источником аэробной и неклостридиальной анаэробной микрофлоры является желудочно-кишечный тракт [5].

За последние десятилетия выявлены существенные изменения чувствительности основных возбудителей распространенного гнойного перитонита к антибактериальным препаратам. Современная интраабдоминальная инфекция характеризуется множественной, быстро растущей резистентностью к антибиотикам и антисептикам, что вызывает необходимость дальнейшего изучения этиологической структуры распространенного гнойного перитонита с целью разработки эффективных схем рациональной антибиотикотерапии [6, 7, 8, 9].

Идентификацию и определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам можно производить с помощью питательных сред, микроскопии, инструментальных методов, метода бумажных дисков, метода серийных разведений в жидкой или плотной питательной среде.

Вместе с тем, трудоемкость, полукочественный учет, требования к качеству питательных сред, длительность постановки являются существенными недостатками используемых методов.

В настоящее время для идентификации микроорганизмов и определения их чувствительности к антибактериальным препаратам используются тест-системы импортного производства: Becton Dickinson, Abbott Diagnostics, Difco/Pasco Laboratories, Roche Diagnostics, Vitek Systems, BioMerieux. Для подавляющего большинства отечественных лабораторий они недоступны из-за высокой стоимости, кроме того, в данных тест-системах список антибиотиков не всегда адаптирован для Российской Федерации и Республики Беларусь.

В этиологической структуре распространенного гнойного перитонита ведущая роль принадлежит микроорганизмам представителям семейства Enterobacteriaceae, некло-

стридиальным анаэробам, что и обусловило необходимость создания отечественных тест-систем для идентификации и определения чувствительности к антибактериальным препаратам данных групп возбудителей.

Цель исследования: создать тест-системы для идентификации и определения чувствительности к антибактериальным препаратам грамотрицательных и неклостридиальных анаэробных микроорганизмов и разработать эффективные схемы антибактериальной терапии при лечении пациентов с распространенным гнойным перитонитом.

Материал и методы

Для идентификации грамотрицательных микроорганизмов и определения их чувствительности к антибактериальным препаратам нами разработаны тест-системы «ИД-ЭНТ» и «АБ-ГРАМ(-)», для облигатно-анаэробных микроорганизмов – «ИД-АНА» и «АБ-АН», соответственно.

В качестве планшетов использовали 96-луночные планшеты для ИФА, которые содержат 8 рядов по 12 лунок. Всего на одном планшете можно одновременно идентифицировать четыре штамма микроорганизмов, определить чувствительность грамотрицательных микроорганизмов к 23 антибиотикам и к 12 антибиотикам облигатно-анаэробных микроорганизмов.

Инструментальный учет производился с помощью многоканального спектрофотометра Ф 300 и компьютера с программным обеспечением «Microbi», разработанных нами совместно с производственным объединением «Витязь» (Республика Беларусь), комплекс антибактериальный (КАН) (рис. 1).

Тест-системы прошли санитарно-гигиенические и клинические испытания в Республике Беларусь. Испытания показали, что тест-системы соответствуют заявленным требованиям: по параметру оценки качества и воспроизводимости в серии определений чувствительности контрольного образца к противомикробным препаратам с расчетом различий по точному критерию Фишера и по параметру диагностической специфичности, по сравнению с методом бумажных дисков и с тест-системами фирмы «bioMerieux» (Франция). Получены регистрационные документы, утвержденные Белорусским государственным



Рис. 1. Тест-системы и автоматизированный комплекс антибактериальный (КАН)

научно-исследовательским институтом стандартизации и сертификации и Министерством здравоохранения Республики Беларусь («ИД-ЭНТ», ТУ РБ 300002704.020-2011 г; «АБ-ГРАМ(-)», ТУ РБ 300002704.011-2009 г; «ИД-АНА», ТУ РБ 300002704.016-2011 г; «АБ-АН», ТУ РБ 300002704.019-2011 г.

С помощью разработанных тест-систем проведены исследования перитонеального экссудата у 85 пациентов с распространенным гнойным перитонитом. Изучен характер грамотрицательной аэробной и неклостридиальной анаэробной микрофлоры, определена ее чувствительность к антибактериальным препаратам, а также установлены эффективные схемы рациональной антибактериальной терапии.

Результаты и обсуждение

Тест-система «ИД-ЭНТ» для идентификации грамотрицательных микроорганизмов однократного использования служит для определения видовой принадлежности грамотрицательных микроорганизмов в полужидкой среде после 18-24 ч инкубации. Учет идентификации возможен визуально или инструментально с помощью многоканального фотометра Ф300 и компьютера с программным обеспечением.

В состав тест-системы включено 24 теста определения ферментативной активности микроорганизмов, которые можно разделить на следующие группы: по способности утилизировать углеводороды; глюкозаминидазной, галактозидазной и глюкозидазной активно-

сти без добавления индикатора с включением хромогенных субстратов; уреазной и галактуронидазной активности; способности утилизировать L-арабит и гидролизовать малонат натрия; выработке индола при ферментации L-триптофана.

С целью сокращения времени постановки опыта разработанные тест-системы состоят из комплектов, в состав которых входят следующие компоненты: планшет с дегидрированными субстратами – 1 шт., стерильный 0,9% раствор хлорида натрия с массовой долей объемом 5 мл в ампуле – 4 шт., наконечники полипропиленовые стерильные для автоматических дозаторов вместимостью 200 мкл – 4 шт., стандартный образец оптической плотности 0,5 оптических единиц McFarland, объем 4 мл – 1 шт. (по заказу на все наборы), дополнительный реагент (+ ИНД), пакетик с силикагелем 1 шт.

Предложенный нами стандартизованный подход к комплектации тест-систем, наличие в них дегидрированных субстратов позволяет увеличить их срок годности до года с момента выпуска, и создает возможности по организации промышленного производства.

Разработанная нами тест-система «АБ-Грам(-)» позволяет определить чувствительность сразу четырех микроорганизмов к 23 антибактериальным препаратам.

Для дегидрирования антибиотиков в лунках планшета нами был предложен метод сушки в вакуумном шкафу (spt 200 HORIZONT, Польша) при минус $0,9 \pm 0,1$ атмосферы в присутствии избытка хлорида кальция для связы-

вания водяных паров при комнатной температуре.

Антибактериальные препараты, используемые в тест-системе, их сокращенные названия и концентрации представлены в таблице 1.

Для культивирования микроорганизмов нами разработана питательная среда АБ, в состав которой, в расчете на один литр, входят: трипсиновый гидролизат 17 г, соевый гидролизат 3 г, глюкоза 2,5 г, натрия хлорид 5 г, двухзамещенный калия фосфат 2,5 г, двухвалентная соль кальция 50 мг, двухвалентная соль магния 20 мг, агар 1,4 г, дистиллированная вода до 1000 мл. Под контролем рН-метра (HANNA 213, Германия) рН полученной питательной среды доводили до 7,3 и стерилизовали 15 мин. при 120°C и давлении плюс 1 атм. Стерильность питательной среды АБ определялась методом прямого посева на тиогликолевую среду и жидкую среду Сабуро.

Таблица 1

**Сокращенные названия
антимикробных препаратов
и их концентрации, используемые
в тест-системе «АБ-ГРАМ (-)»**

Антибиотик	Сокращенное название	Концентрация, мкг/мл
Ампициллин	Амп	8
Амоксициллин + клавуланат	А+К	16/8
Цефоперазон	Цеф	64
Цефалексин	Цфл	8
Цефотаксим	Цфт	16
Цефепим	Цфм	32
Цефтазидим	Цфз	16
Имипенем	Ими	8
Меропенем	Мер	8
Азтреонам	Азт	32
Цефтриаксон	Цтр	32
Азитромицин	Ази	12
Гентамицин	Ген	8
Нетилмицин	Нет	16
Амикацин	Ами	32
Моксифлоксацин	Мок	16
Норфлоксацин	Нор	4
Офлоксацин	Офл	8
Ципрофлоксацин	Цип	4
Левифлоксацин	Леф	8
Ломефлоксацин	Лом	8
Ко-тримоксазол	Кот	38
Диоксидин	Дио	20
Контрольная лунка	К	0

Примечание: Наличие роста в контрольной лунке обязательно. При наличии роста в лунке с антибиотиком штамм необходимо считать устойчивым к данному антибиотику.

Основой данной среды является триптозо-соевый полужидкий агар, который обладает следующими преимуществами, по сравнению с другими питательными средами: на нем хорошо растут грамотрицательные микроорганизмы, он достаточно прозрачен, что весьма важно при учете результатов.

Для постановки опыта по определению чувствительности готовили взвесь микроорганизмов. Для этого бактериологической петлей вносили одну или более колоний, выращенных в течение 18-24 ч. при 37°C на мясо-пептонном агаре или селективной среде для грамотрицательных бактерий, например Эндо, в ампулу (флакон) с 2 мл стерильного раствора хлорида натрия с массовой долей 0,9%. Оптическая плотность взвеси в ампуле после внесения микроорганизма должна была соответствовать 0,5 оптических единиц McFarland. Это достигалось путем измерения на денситометре или на спектрофотометре при длине волны 550 нм – 0,125 OD; или сравнения со стандартом оптической плотности 0,5 оптических единиц McFarland.

Переносили в ампулу с питательной АБ средой 5 мкл приготовленной взвеси бактерий и тщательно перемешивали. Вносили в каждую лунку планшета по 135 мкл питательной среды АБ с микроорганизмами (конечная концентрация бактерий $\approx 10^7$ КОЕ/мл). Планшет накрывали крышкой и инкубировали 18-24 ч при 35-37°C в термостате.

После инкубации производили визуальный или инструментальный учет. При визуальном учете при наличии роста в лунке, штамм считали резистентным, а при отсутствии роста – чувствительным к определенному антибиотику.

Для идентификации облигатно-анаэробных микроорганизмов использовалась разработанная нами тест-система «ИД-АНА». Стандартные количества бактериальной взвеси вносятся в лунки планшета, содержащего дегидрированные субстраты с индикатором или хромогенные субстраты. После 4-6 часов инкубации производили визуальный или инструментальный учет. Штаммы, имеющие ферментативную способность, расщепляют соответствующие субстраты с изменением цвета содержимого лунок планшета. При отсутствии ферментативной способности изменения цвета содержимого лунок не происходит.

Тест-система «АБ-АН» для определения чувствительности облигатно-анаэробных бактерий к антибиотикам однократного использования служит для определения чувствительности облигатно-анаэробных микроорганиз-

Таблица 2

Возбудители распространенного гнойного перитонита							
Количество наблюдений		Возбудители					
		Анаэробы и аэробы		Анаэробы		Аэробы	
Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
80	100	61	76,25	12	15	7	8,75

мов к антибиотикам в полужидкой среде после 18-48 ч. инкубации.

В культуральную среду добавлялась бактериальная взвесь, которая затем вносилась в лунки планшета, содержащего лиофильно высушенные антибиотики. После инкубации производился визуальный или инструментальный учет. Резистентные штаммы растут в лунке, делая среду непрозрачной, а если штамм чувствителен к антибиотику, среда остается прозрачной. При отсутствии роста в лунках с 1-ой и 2-ой концентрацией антибиотика штамм чувствителен. При наличии роста в лунке с 1-ой концентрацией, но отсутствии в лунке со 2-ой концентрацией штамм обладает промежуточной чувствительностью. При наличии роста в лунках с 1-ой и 2-ой концентрацией штамм считается устойчивым. При отсутствии роста в контрольной лунке тест считается недействительным и его необходимо повторить.

Разработанные нами тест-системы обладают следующими преимуществами: одно исследование обходится примерно в 1\$, временные затраты на исследование чувствительности к антибиотикам занимает до 17 минут для 4 штаммов микроорганизмов вместо 3-4 часов, учет результатов – до 5 минут.

При микробиологическом исследовании перитонеального экссудата у 85 пациентов с распространенным гнойным перитонитом наличие бактериальной инфекции было под-

тверждено у 94,2% обследованных, 5,8% посевов оказались стерильными.

В результате проведенных микробиологических исследований установлено, что в 76,25% случаев воспаление брюшины было вызвано смешанной аэробно-анаэробной микрофлорой, в 15% – только анаэробами, в 8,75% – только аэробами (таблица 2).

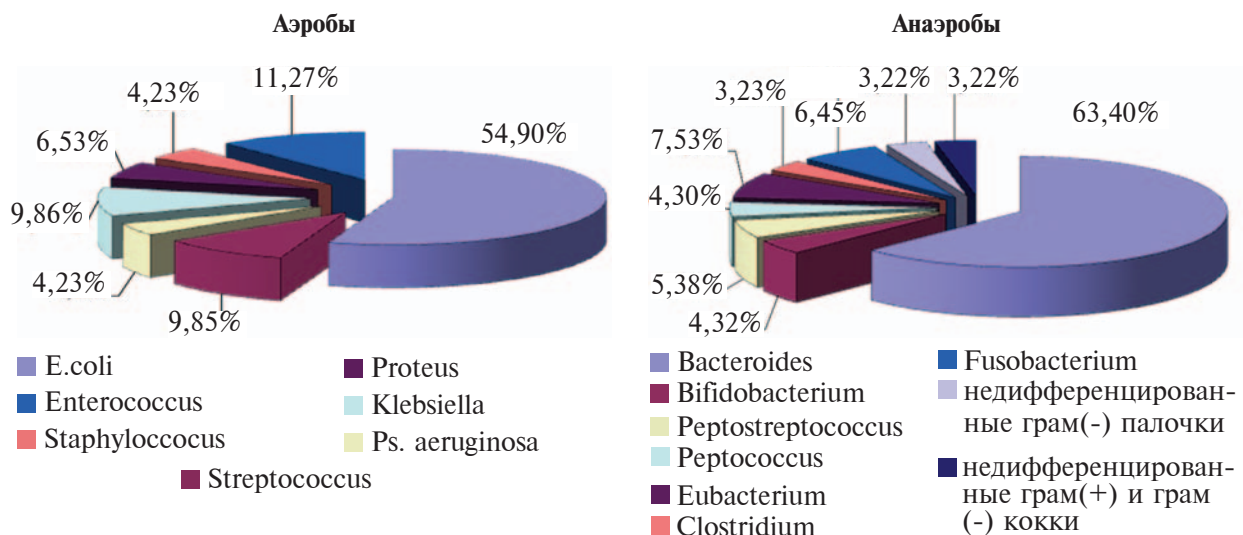
Среди выделенных 93 штаммов анаэробов представителей рода *Bacteroides* было 63,4%, *Bifidobacterium* – 4,32%, *Peptostreptococcus* – 5,38%, *Peptococcus* – 4,3%, *Eubacterium* – 7,53%, *Clostridium* – 3,23%, *Fusobacterium* – 6,45%, недифференцированные грам (-) палочки – 3,22%, недифференцированные грам (+) и грам (-) кокки – 3,22%.

Среди 71 штамма аэробов – *E.coli* – 54,93%, *Streptococcus* – 9,85%, *Pseudomonas aeruginosa* – 4,23%, *Klebsiella* spp. – 9,86%, *Proteus* spp. – 5,63%, *Staphylococcus* spp. – 4,23%, *Enterococcus* spp. – 11,27% (рис. 2).

При изучении чувствительности основных возбудителей распространенного гнойного перитонита к антибактериальным препаратам было установлено, что подавляющее большинство штаммов обладало множественной лекарственной устойчивостью.

Основные представители энтеробактерий (*E.coli*) обладали низкой чувствительностью к ампициллину (20,51%), амоксициллину + клавуланат (35,89%), ко-тримакозолу (48,71%), хлорамфениколу (46,15%), клин-

Рис. 2. Микрофлора брюшной полости у пациентов с распространенным гнойным перитонитом

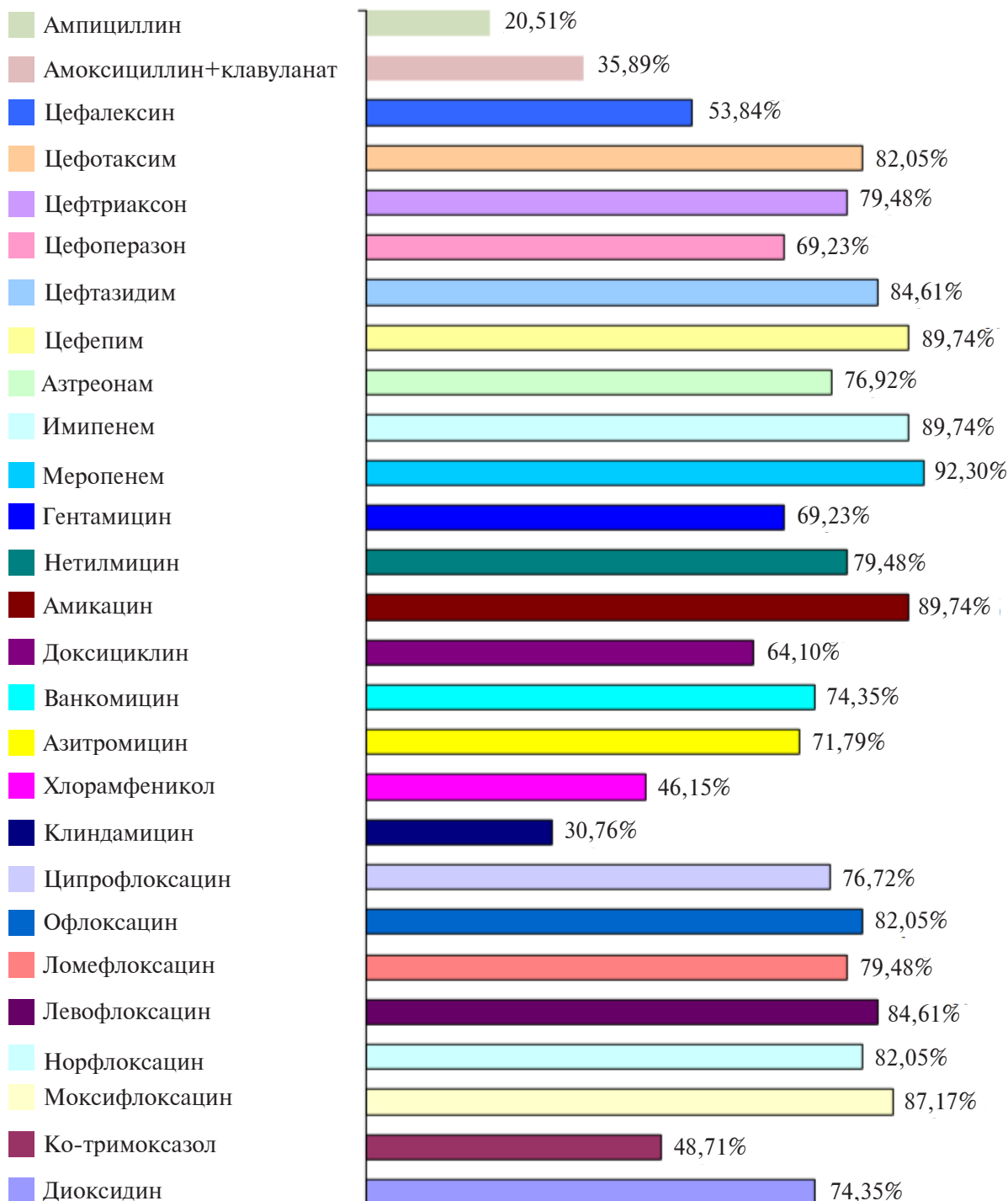


дамицину (30,76%). Эффективными были цефалоспорины III, IV поколений – цефтазидим (84,61%); цефепим (89,74%); карбапенемы – имипенем (89,74%), меропенем (92,3%); аминогликозиды – амикацин (89,74%); фторхинолоны – цiproфлоксацин (76,92%), ломефлоксацин (79,48%), норфлоксацин – 82,05% чувствительных штаммов (рис. 3).

Выделенные штаммы рода бактероидов

были резистентны к пенициллину (100%), амоксициллину (86,21%), тикарциллину (74,14%), хлорамфениколу (75,87%), цефокситину (41,38%). Высокоэффективное действие на бактероиды оказывал меропенем (100%), имипенем (98,27%), метронидазол (93,1%), клиндамицин (81,03%), меньшей активностью обладал тикарциллин+клавуланат (74,13%), амоксициллин+клавуланат 63,79%, моксифлоксацин (53,44%) (рис. 4).

Рис. 3. Чувствительность *E. coli* к антибактериальным препаратам



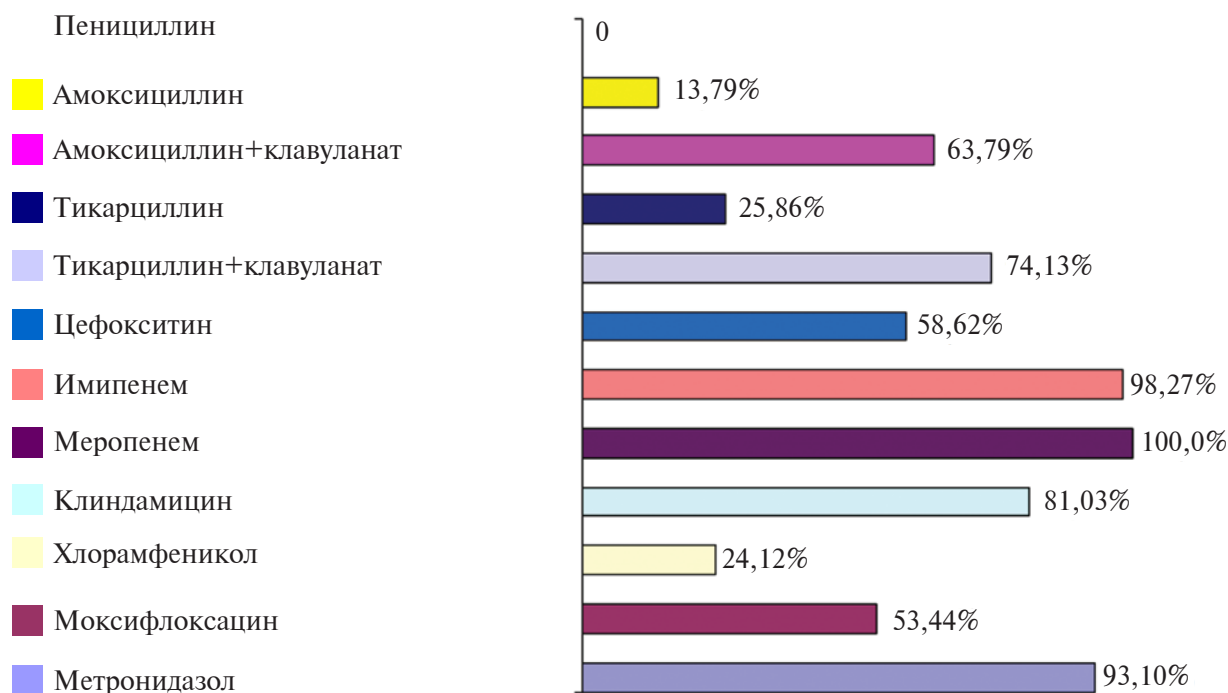


Рис. 4. Чувствительность *Bacteroides* spp. к антибактериальным препаратам

Отсутствие универсальных антибактериальных препаратов указывает на необходимость их комбинированного применения с целью лечения распространенного гнойного перитонита.

Заключение

Таким образом, разработанные нами тест-системы характеризуются большим разнообразием антибиотиков, относительной дешевизной, простотой в изготовлении, эксплуатации, быстротой определения чувствительности и могут найти широкое применение для определения чувствительности штаммов возбудителей хирургической инфекции в бактериологических лабораториях различного профиля.

Распространенный гнойный перитонит необходимо рассматривать как смешанную полимикробную аэробно-анаэробную инфекцию. Доминирующая роль в развитии перитонита принадлежит кишечной палочке (54,9%) и бактероидам (63,4%).

Рациональное применение антибактериальных препаратов в до- и послеоперационном периодах во многом предопределяют успех лечения распространенного гнойного перитонита.

На основании данных об этиологической структуре и чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам нами установлены следующие эффективные схемы рациональной эмпирической антибактериаль-

ной терапии распространенного гнойного перитонита:

Цефалоспорины III поколения + метронидазол;

Цефалоспорины III поколения + аминогликозиды + метронидазол;

Цефалоспорины IV поколения + метронидазол;

Карбопенемы (имипенем, меропенем);

Фторхинолоны + метронидазол.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гостищев В.К. Перитонит / В.К. Гостищев, В.П. Сажин, А.Л. Авдовенко. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2002. — 238 с.
2. Ерюхин И.А. Хирургические инфекции. Руководство для врачей под ред. И.А. Ерюхина, Б.Р. Гельфанда, С.А. Шляпникова. СПб.: "Питер", 2004. — 325 с.
3. Савельев В.С. Перитонит: практич. руководство. / под общ. ред. В.С. Савельева, Б.Р. Гельфанда, М.И. Филимонова. — М.: Литтерра, 2006. — 208 с.
4. Шуркалин Б.К. Гнойный перитонит / Б.К. Шуркалин — М.: Два Мира Принт, 2000. — 224 с.
5. Гаин Ю.М. Синдром энтеральной недостаточности при перитоните: теоретические и практические аспекты, диагностика и лечение / Ю.М. Гаин, С.И. Леонович, С.А. Алексеев. — Молодечно, 2001. — 265 с.
6. Антибиотикопрофилактика в абдоминальной хирургии / Б.С. Брискин [и др.] // Хирургия, Приложение Consilium Medicum. — 2003. — № 1. — С. 9-13.
7. Еремин С.Р. Актуальные проблемы эпидемиологии интраабдоминальных инфекций / С.Р. Еремин,

Л.П. Зуева // Инфекции в хирургии. — 2003. — № 1. — С. 58-62.

8. Савельев В.С. Абдоминальная хирургическая инфекция: клиника, диагностика, антимикробная терапия: практическое руководство / Под ред. В.С. Савельева, Б. Р. Гельфанда. — М.: Литерра, 2006. — 168 с.

9. Хачатрян Н.Н. Антибактериальная терапия перитонита / Н.Н. Хачатрян // Consilium medicum, Приложение. — 2002. — № 1. — С. 19-25.

Адрес для корреспонденции

119991, Российская Федерация,
г. Москва, ул. Яузская, д. 11,
ГОУ ВПО «Первый Московский государственный
медицинский университет им. И.М. Сеченова»,
кафедра общей хирургии,
тел.моб.: +7 925 050 54 63,
e-mail: vkosinets@yandex.ru,
Косинец Владимир Александрович

Сведения об авторах

Косинец В.А., к.м.н., докторант кафедры общей хирургии ГОУ ВПО «Первый Московский госу-

дарственный медицинский университет им. И.М. Сеченова».

Поступила 24.08.2012 г.

УВАЖАЕМЫЕ КОЛЛЕГИ!

**22–24 мая 2013 г., в г. Москве планируется проведение
XV МЕЖДУНАРОДНОГО КОНГРЕССА ПО АНТИМИКРОБНОЙ ТЕРАПИИ**

Для участия в конференции приглашаются анестезиологи-реаниматологи, акушеры-гинекологи, бактериологи/микробиологи, врачи общей практики, дерматовенерологи, инфекционисты, клинические фармакологи, кардиологи, неонатологи, оториноларингологи, педиатры, провизоры, реаниматологи, стоматологи, пульмонологи, терапевты, хирурги, урологи, эпидемиологи.

Правила представления тезисов

Объем не более 2500 знаков (включая пробелы).

Обязательные разделы тезисов: Цель. Материалы и методы. Результаты. Выводы. Тезисы не должны содержать графики и таблицы.

Вид представления тезисов: «online» на сайте ANTIBIOTIC.ru (предпочтительно!) или по электронной почте iacmac.congress@gmail.com или conference@antibiotic.ru вложенным файлом в формате MS Word с обязательным указанием адреса эл. почты автора.

Срок подачи тезисов: до 1 апреля 2013 г.

Для рассмотрения принимаются оригинальные тезисы по антимикробной терапии, клинической микробиологии. Тезисы будут опубликованы в приложении к журналу «Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия».

Секретариат: 214019, Смоленск, а/я 60

Телефоны: (4812) 45 06 02, 45 06 03

Факс: (4812) 45 06 12 (доб. 123)

Эл. почта: conference@antibiotic.ru

Дополнительная информация на сайте: www.antibiotic.ru