

**А.Н. КОСИНЕЦ, В.К. ОКУЛИЧ, С.Д. ФЕДЯНИН, Е.А. КОНОПЕЛЬКО,  
В.А. КОСИНЕЦ, В.Е. ШИЛИН, Е.Л. МАЦКЕВИЧ**

## **ТЕСТ-СИСТЕМА «АБ-ГРАМ(-)» ДЛЯ ОЦЕНКИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ К АНТИБИОТИКАМ**

УО «Витебский государственный медицинский университет»,  
Республика Беларусь

В настоящее время на базе Витебского государственного медицинского университета и Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии» Республики Беларусь на базе Витебской областной клинической больницы разработана тест-система «АБ-ГРАМ (-)» для определения чувствительности грамотрицательных микроорганизмов в полужидкой питательной среде к широкому спектру антибиотиков. Данная система по сравнению с тест-системами известных мировых производителей, таких, как Becton Dickinson, Abbott Diagnostics, Difco/Pasco Laboratories, Vitek Systems, Roche Diagnostics, BioMerieux, характеризуется возможностью оценки чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, перечень которых адаптирован к условиям клиник Республики Беларусь. При использовании тест-системы «АБ-ГРАМ (-)» стоимость определения чувствительности одного штамма микроорганизма снижается примерно в 4 раза по сравнению с импортными аналогами. Проведенные клинические испытания разработанной тест-системы продемонстрировали её высокую эффективность.

*Ключевые слова: тест-система, бактерии, антибиотик, антибиотикочувствительность.*

At present, “AB-GRAM (-)” test system for sensitivity determination to antimicrobial preparations for gram-negative bacteria in semi liquid medium has been worked out at Vitebsk State University and the National Research Center «Infections in Surgery». The given test system for sensitivity definition to antibiotics has some advantages over the test systems of the well-known producers such as Becton Dickinson, Abbott Diagnostics, Difco/Pasco Laboratories, Vitek Systems, Roche Diagnostics, BioMerieux: the system is characterized by evaluation possibility of microorganisms sensitivity to antibiotics, which are really used in the hospitals of Belarus. On using “AB-GRAM (-)” test system, the cost of one microorganism strain is approximately 4 times lower than its foreign analogues. A clinical trial of the test-system has shown its high effectiveness.

*Keywords: test-system, bacteria, antibiotic, sensitivity to antibiotics.*

Представления об этиологической структуре гнойно-септических процессов за последнее время существенно расширились. Этиологическая структура экзогенных возбудителей хирургических инфекций весьма разнообразна. Золотистый стафилококк, коагулазоотрицательные стафилококки, Enterococcus spp., E.coli, P.aeruginosa, Enterobacter spp. – наиболее часто выделяе-

мые микроорганизмы при хирургической раневой инфекции [19, 29]. У госпитализированных и негоспитализированных пациентов лидирующие позиции могут занимать энтеробактерии (60,8%), которые в 30,6% случаев представлены E.coli. Реже выделяются K.pneumoniae (25,7%) и P.aeruginosa (15,6 %) [21, 27]. Синегнойная палочка – повсеместно распространённый микроорга-

низм, который в последнее время приобретает всё большее значение в качестве возбудителя тяжёлых госпитальных инфекций. Так, до 12% инфекционных процессов мочевыводящих путей, 8% случаев раневых инфекций связаны с *P.aeruginosa* [11, 12].

Частота встречаемости различных представителей грамотрицательной микрофлоры при гнойно-воспалительных процессах по литературным данным, значительно варьирует в зависимости от нозологической формы. Так, энтеробактерии высеваются 6,43%-60,8% [2, 27, 31], представители псевдомонад – в 1,43%-52,9% [2, 6, 22, 24].

В условиях отделения реанимации большое значение приобретает дифференцировка внебольничных госпитальных инфекций, которые существенно различаются как по структуре потенциальных возбудителей, так и по уровню антибиотикочувствительности. Значительна роль ацинетобактера, характеризующегося природной устойчивостью к большинству антибиотиков и быстрым формированием приобретённой резистентности к антибактериальным препаратам многих групп [12].

По данным Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии», в этиологической структуре гнойно-воспалительных заболеваний и осложнений на долю грамотрицательных микроорганизмов, представленных в основном семействами *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* (в основном *P.aeruginosa*) и ферментирующими грамотрицательными палочками, приходится примерно 42,07%. Большим многообразием характеризуются энтеробактерии, из которых наиболее часто выделяются *Proteus spp.* (7,95%), *E.coli* (4,94%), *Klebsiella spp.* (4,48%), *Enterobacter spp.* (3,78%), *Morganella morganii* (0,62%), *Serratia spp.* (0,54%) и *Citrobacter freundii* (0,46%) [17].

Весьма проблемным в настоящее время является проведение антибиотикотера-

пии инфекционных процессов, вызванных экзогенными, часто госпитальными штаммами грамотрицательных микроорганизмов, характеризующимися множественной устойчивостью к антибиотикам [5, 14, 15, 21, 23, 30]. Известно, что в большинстве случаев тяжёлые инфекции (бактериемия, пневмония), вызванные антибиотикорезистентными штаммами бактерий, сопровождаются более высокой частотой летальных исходов, чем те же инфекции, но вызванные чувствительными штаммами микроорганизмов. Достаточно часто встречаются полирезистентные штаммы синегнойной палочки, энтеробактерий, продуцирующих  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра действия, включая карбапемазы [11, 20, 25].

Причины развития антибиотикорезистентности до конца не установлены, однако не вызывает сомнения, что важную роль в этом играет необоснованное использование антимикробных препаратов. Это приводит к селекции резистентных штаммов микроорганизмов. Как только хотя бы один пациент становится носителем резистентного штамма, появляется возможность передачи его другим пациентам [9, 18, 30].

В Республиканском научно-практическом центре «Инфекция в хирургии» за последние годы отмечено увеличение уровней устойчивости энтеробактерий к амоксициллину (82,31% и 87,8%;  $p < 0,05$ ), амоксициллину+клавуланат (62,2% и 82,93%;  $p < 0,05$ ), цефалотину (63,44% и 79,31%;  $p < 0,05$ ), цефокситину (37,95% и 40%;  $p > 0,05$ ), канамицину (44,66% и 92%;  $p < 0,05$ ), гентамицину (34,86% и 44,44%;  $p < 0,05$ ), тетрациклину (74,59% и 88%;  $p < 0,05$ ), левомицетину (59,45% и 78,85%;  $p < 0,05$ ), цiproфлоксацину (11,04% и 19,35%;  $p < 0,05$ ); псевдомонад – к цефтазидиму (63,95% и 100%;  $p < 0,05$ ), гентамицину (67,39% и 70,73%;  $p > 0,05$ ) [17].

По данным литературы, стратегии, которые жестко контролируют использование

антибиотиков в стационаре, позволяют обеспечить снижение частоты их нерационального применения и ограничивают появление и распространение резистентных штаммов микроорганизмов. Особенно большое значение для решения проблемы антибиотикорезистентности имеет целенаправленный надзор, направленный на мониторинг и сбор информации о назначении антибиотиков в стационаре. Одним из наиболее важных объектов для такого целенаправленного надзора являются отделения реанимации и интенсивной терапии. Полученная в результате его проведения информация может служить основой для разработки политики применения антибиотиков в стационаре [4, 8, 11, 28].

Проведение микробиологической диагностики инфекций и быстрое предоставление ее результатов (выделенный возбудитель и его чувствительность к антибиотикам) являются основными факторами, определяющими рациональный выбор и назначение адекватной антимикробной терапии. В связи с этим оптимизация определения чувствительности к антибактериальным препаратам проблемных возбудителей инфекционных процессов является важнейшим мероприятием по сдерживанию роста резистентности штаммов микроорганизмов [3, 7, 11, 16]. Разработкой тест-систем для определения чувствительности к антибиотикам занято много известных фирм, среди которых Becton Dickinson, Abbott Diagnostics, Vitek Systems, Roche Diagnostics, BioMerieux. Однако тест-системы импортного производства являются весьма дорогостоящими, что ограничивает их применение в отечественных бактериологических лабораториях и диктует необходимость разработки тест-систем отечественного производства [7, 13].

Цель исследования: оптимизировать определение чувствительности к антибиотикам грамотрицательных микрооргани-

зов-возбудителей тяжёлых хирургических инфекций путём разработки тест-системы «АБ-ГРАМ (-)».

### Материалы и методы

На базе бактериологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии» обследованы бактериологическими методами 54 пациента с тяжёлой хирургической инфекцией, из которых 20 находились на лечении в отделении реанимации.

Для выделения кишечной группы бактерий использовали среду Эндо с генцианфиолетовым, псевдомонады выделяли на среде ЦПХ, посев на микробы группы протей производили по методу Шукевича [10].

Идентификацию микроорганизмов проводили с помощью тест-систем на автоматизированном биохимическом анализаторе АТВ Expression фирмы «bioMerieux». Для идентификации использовались стрипы: ID 32 E – для энтеробактерий, ID 32 GN – для грамотрицательных палочек. Чувствительность грамотрицательных возбудителей оценивалась с помощью разработанной нами тест-системы «АБ-ГРАМ (-)», а также стрипами фирмы «bioMerieux» АТВ PSE – для псевдомонад, rapid АТВ E – для энтеробактерий и дискодиффузионным методом [1, 26].

### Результаты и обсуждение

Нами разработана тест-система «АБ-ГРАМ (-)» для определения чувствительности грамотрицательных микроорганизмов к антибиотикам однократного использования. Основой системы является планшет, который содержит 8 рядов по 12 лунок с пороговой концентрацией препарата, что позволяет определять чувствительность четырёх микроорганизмов к 23 антибиотикам, наиболее часто назначаемым пациен-

Таблица 1

**Концентрации антибиотиков в лунках планшета  
(в мкг/мл или г/л после внесения питательной среды)**

Номер лунки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Обозначения антибиотиков для рядов:												
- А, С, Е, G	Амп 8	А+К 16/8	Цеф 64	Цфл 8	Цфт 16	Цфм 32	Цфз 16	Ими 8	Мер 8	Азт 32	Цтр 32	Ази 12
- В, D, F, H	Ген 8	Нет 16	Ами 32	Мок 16	Нор 4	Офл 8	Цип 4	Леф 8	Лом 8	Кот 38	Дио 20	К

Таблица 2

**Сокращённые названия антибиотиков**

Антибиотик	Сокращённое название
Ампициллин	Амп
Амоксициллин + клавуланат	А+К
Цефоперазон	Цеф
Цефалексин	Цфл
Цефотаксим	Цфт
Цефепим	Цфм
Цефтазидим	Цфз
Имипенем	Ими
Меропенем	Мер
Азтреонам	Азт
Цефтриаксон	Цтр
Азитромицин	Ази
Гентамицин	Ген
Нетилмицин	Нет
Амикацин	Ами
Моксифлоксацин	Мок
Норфлоксацин	Нор
Офлоксацин	Офл
Ципрофлоксацин	Цип
Левифлоксацин	Леф
Ломефлоксацин	Лом
Ко-тримоксазол	Кот
Диоксидин	Дио
Контрольная лунка	К

Таблица 3

**Состав питательной среды АБ**

Наименование компонента	Содержание компонента
bio-Tryptcase	17 г
bio-Soyase	3 г
Глюкоза	2,5 г
NaCl	5 г
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,5 г
Ca <sup>++</sup>	50 мг
Mg <sup>++</sup>	20 мг
Агар	1,4 г
Дистиллированная вода	до 1000 мл
pH	7,3

там с тяжёлой хирургической инфекцией. Концентрации антибиотиков в лунках планшета (в мкг/мл или г/л после внесения питательной среды) и их сокращённые названия представлены в таблицах 1 и 2.

Для культивирования микроорганизмов нами разработана питательная среда АБ на трипсозо-соевом бульоне (таблица 3).

С целью сокращения времени постановки опыта разработанную тест-систему выпустили в виде комплекта, в состав которого входят компоненты, представленные в таблице 4, и инструкция по применению.

Для постановки опыта по определению чувствительности готовили взвесь микроорганизмов. Для этого бактериологической

Таблица 4

**Компоненты тест-системы «АБ-ГРАМ (-)»**

Наименование компонента	Количество
Планшет с антибиотиками	1 штука
Питательная среда АБ	4 флакона
Стерильный раствор хлорида натрия с массовой долей 0,9%	4 флакона или стандартные ампулы
Наконечники стерильные для автоматических дозаторов вместимостью 200 мкл	4 штуки
Стандартный образец оптической плотности 0,5 оптических единиц (McFarland)	1 штука (4мл)
Пакетик с силикагелем	1 штука

петлей вносили одну или более колоний бактерий, выращенных в течение 18-24 ч при 37°C на МПА или селективной среде для грамотрицательных микроорганизмов, например, ЦПХ, в ампулу (флакон) с 2 мл стерильного 0,9% раствора хлорида натрия. 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 (составляет  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл); или сравнения со стандартом оптической плотности 0,5 оптических единиц (McFarland).

Переносили в ампулу с питательной АБ средой 50 мкл приготовленной взвеси бактерий и тщательно перемешивали. Вносили в каждую лунку планшета, содержащего высушенные антибиотики, по 135 мкл питательной среды АБ с микроорганизмами (примерно  $10^7$  КОЕ/мл). Планшет накрывали крышкой и инкубировали 18-24 ч при 35-37°C в термостате.

После инкубации производили визуальный или инструментальный учёт. При визуальном учёте при наличии роста в лунке штамм считали резистентным, а при отсутствии роста – чувствительным к определённому антибиотику. Инструментальный учёт производился с помощью многоканального спектрофотометра АИФ М/340 и компьютера с программным обеспечением «Microbi», разработанных совместно с производственным объединением «Витязь».

Разработанная нами тест-система обладает следующими преимуществами: при определении чувствительности методом серийных разведений антибиотиков в жидкой или плотной питательной среде большие временные затраты идут на взвешивание антибиотиков и приготовление серийных разведений. При использовании тест-системы пороговые концентрации антибиотиков готовятся заблаговременно и нет

необходимости разводить антибиотики перед каждым определением чувствительности, что снижает трудозатраты в лаборатории и сокращает время постановки опыта оценки чувствительности с 3-4 часов до 15 минут без привлечения дополнительного персонала. Комплектация системы позволяет осуществлять постановку опыта сразу же после вскрытия комплекта, а возможность визуального и инструментального учета создаёт значительные удобства для пользователя.

Стандартизованный подход к комплектации тест-системы, наличие в ней высушенных в вакууме антибиотиков позволяет увеличить её срок годности до года с момента выпуска и создаёт возможности по организации промышленного производства. При использовании тест-системы стоимость определения чувствительности штамма снижается примерно в 4 раза по сравнению с импортными аналогами (с 4\$ - при использовании систем фирмы «Bio Merieux», до 1\$ - при использовании разработанной тест-системы).

К настоящему времени изготовлены и прошли внутренние клинические испытания 75 тест-систем «АБ-ГРАМ (-)». В бактериологической лаборатории Республиканского научно-практического центра «Инфекция в хирургии» было проведено сравнение результатов постановки опыта по определению чувствительности с методом бумажных дисков. Установлено, что для основного спектра антибиотиков наблюдается совпадение полученных результатов от 86 до 98,6% случаев. В большинстве случаев процент расхождения находился в пределах 31%. Основной проблемой в интерпретации результатов является метод учета при использовании бумажных дисков. Результаты оцениваются как: штамм устойчив, чувствителен или обладает промежуточной чувствительностью. В то же время в тест-системе результат только чувствителен или

резистентен. Анализ данных показал, что именно за счет наличия штаммов с промежуточной чувствительностью возникает большинство расхождений результатов этих методов.

### Выводы

Таким образом, разработанная нами тест-система «АБ-ГРАМ (-)» характеризуется большим разнообразием антибиотиков, относительной дешевизной, простотой в изготовлении, эксплуатации и может найти широкое применение для определения чувствительности штаммов грамотрицательных возбудителей хирургических инфекций в бактериологических лабораториях различного профиля.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Антибактериальная терапия в гнойной хирургии: руководство / под ред. А. Н. Косинца. – Витебск: ВГМУ, 2002. – 600 с.
2. Антибактериальная терапия лактационных маститов / Г. А. Белоненко [и др.] // Актуальные проблемы химиотерапии бактериальных инфекций: тез. докл. Всесоюз. конф. – М., 1991. – Ч. 1. – С. 54-56.
3. Богданов, М. Б. Опыт стандартизации антибактериальной терапии в многопрофильном стационаре / М. Б. Богданов, А. Л. Подольцев, Т. В. Черненко // Клиническая фармакология и терапия. – 2000. – Т. 9, № 2. – С. 26-30.
4. Власова, Н. В. Опыт создания протоколов антибактериальной терапии в многопрофильном стационаре / Н. В. Власова, И. Г. Мултых, А. И. Гречишкин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2003. – Т. 5, № 2. – С. 183-191.
5. Козлов, Р. С. Нозокомиальные инфекции: эпидемиология, патогенез, профилактика, контроль / Р. С. Козлов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т. 2, № 1. – С. 16-30.
6. Микробиологическая характеристика хронического посттравматического остеомиелита / Н. А. Зубарева [и др.] // Интенсивная терапия и профилактика хирургических инфекций: тез. 4 Всеарм. междунар. конф. – М., 2004. – С. 63.
7. Мониторинг антибиотикорезистентности клинически значимых микроорганизмов-возбудителей нозокомиальных инфекций в Республике Беларусь / Л. П. Титов [и др.] // Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам: матер. междунар. науч.-практ. конф. – Минск, 2003. – С. 57-58.
8. Политика применения антибиотиков в хирургии, 2003 / под ред. Л. С. Страчунского, Ж. К. Пешере, П. Э. Деллинджер // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2003. – Т. 5, № 4. – С. 302-317.
9. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / под общ. ред. Л. С. Страчунского, Ю. Б. Белоусова, С. Н. Козлова. – М., 2002. – 300 с.
10. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клиничко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений: Приказ министерства здравоохранения СССР, № 535. – М., 1985 – 126 с.
11. Руководство по инфекционному контролю в стационаре: пер. с англ. / под ред. Р. Венцеля, Т. Бревера, Ж.-П. Бутцлера. – Смоленск: МАКМАХ, 2003. – 272 с.
12. Сидоренко, С. В. Клиническое значение *Pseudomonas aeruginosa* // Клиническая фармакология и терапия. – 2003. – Т. 12, №2. – С. 12-17.
13. Практические аспекты современной клинической микробиологии / Л. З. Скала [и др.]. – М., 1997. – 184 с.
14. Сравнительная активность цефепима и других антибиотиков в отношении нозокомиальных грамотрицательных возбудителей инфекций в России / Л. С. Страчунский [и др.] // Клиническая микробиология

- и антимикробная химиотерапия. – 2003. – Т. 5, № 3. – С. 259-274.
15. Фадеев, С. Б. Микробиологические особенности хирургической инфекции мягких тканей / С. Б. Фадеев, О. В. Бухарин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1999. – № 4. – С. 11-14.
16. Яковлев, С. Современный взгляд на применение антибиотиков в стационаре / С. Яковлев // Врач. – 2001. – № 6. – С. 10-12.
17. Федянин, С. Д. Рациональное использование антибактериальных препаратов в комплексном лечении хирургической инфекции: автореф. дис. ... канд. мед. наук. / С. Д. Федянин. – Смоленск, 2006. – 20 с.
18. Andremont, Antoine. L'impact des antibiotiques sur les flores Symbiosales conditionne l'avenir de la resistance / Antoine Andremont // Med. Sci. – 2002. – Vol. 18, N 3. – P. 364-365.
19. Bowler, P. G. Wound microbiology and associated approaches to wound management / P. G. Bowler, B. I. Duerden, D. G. Armstrong // Clin. Microb. Rev. – 2001. – Vol. 14, N 2. – P. 244-269.
20. Correlation of extended spectrum beta lactamases production with cephalosporin resistance in gram negative bacilli / M. Ghatole [et al.] // Indian J. Pathol. Microbiol. – 2004. – Vol. 47, N 1. – P. 82-84.
21. Distribution and drug-resistance of 3 500 gram-negative bacteria in Guangzhou / Q. Z. Xiao [et al.] // Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao. – 2005. – Vol. 25, N 2. – P. 132-138.
22. Emergence of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) associated with wound infections / Y. Jahan, F. Jahan, K.Z. Mamun [et al.] // Mymensingh Med. J. – 2004. – Vol. 13, N 1. – P. 76-81.
23. Eradication of multi-drug resistant Acinetobacter from an intensive care unit / Y. D. Podnos [et al.] // Surg. Infect. (Larchmt). – 2001. – Vol. 2, N 4. – P. 297-301.
24. Incidence and sensitivity to antibiotics of germs isolated from surgical wound infections / D. Berceanu Vaduva [et al.] // Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol. – 2003. – Vol. 48, N 2-3. – P. 123-129.
25. Kucisec-Tepes, N. Pseudomonas aeruginosa – a significant hospital pathogen and resistance to carbapenem / N. Kucisec-Tepes // Acta Med. Croatica. – 2004. – Vol. 58, N 4. – P. 313-321.
26. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: tenth informational supplement / National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS. – Doc. M100-S9. – 1999. – 19 (1).
27. Resistance of bacteria and antibiotic prescription in Fann University Teaching Hospital, Dakar / A. I. Sow [et al.] // Dakar Med. – 2003. – Vol. 48, N 3. – P. 189-193.
28. Results of an antimicrobial control program at a university hospital / C. Martin [et al.] // Am. J. Health Syst. Pharm. – 2005. – Vol. 62, N 7. – P. 732-738.
29. Spectrum of microbes and antimicrobial resistance in a surgical intensive care unit, Barbados / S. Hariharan [et al.] // Am. J. Infect. Control. – 2003. – Vol. 31, N 5. – P. 280-287.
30. Tambic Andrasevic, A. Antibiotic resistance-bacteria fight back / A. Tambic Andrasevic // Acta Med. Croatica. – 2004. – Vol. 58, N 4. – P. 245-250.
31. Thanni, L. O. Prevalence of bacterial pathogens in infected wounds in a tertiary hospital, 1995-2001: any change in trend? / L. O. Thanni, O. A. Osinupebi, M. Deji-Agboola // J. Natl. Med. Assoc. – 2003. – Vol. 95, N 12. – P. 1189-1195.

*Поступила 03.09.2007г.*