



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИИ  
ВОЛГОГРАДСКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ

О.Г.Крамарь, Е.В.Резников

**ОСНОВЫ  
КЛИНИЧЕСКОЙ БАКТЕРИОЛОГИИ**

Одобрено центральной методической комиссией  
Волгоградской медицинской академии  
в качестве учебного пособия

Волгоград  
2002

УДК 616-093/-098 (075)  
ББК 52.64

**Крамарь, Олег Григорьевич**

Основы клинической бактериологии: Учебное пособие/  
Крамарь О.Г., Резников Е.В. Под ред. проф. Крамарь В.С.; Волгогр.  
мед. акад. – Волгоград, 2002. – 184 с.

Рассмотрены основные вопросы, возникающие перед врачами-клиницистами, обусловленные возросшим вниманием к микробиологическим исследованиям в повседневной диагностической и лечебной работе, а именно:

изменения в характере и частоте внутрибольничных инфекций. Все чаще выявляются микроорганизмы, болезнетворная активность которых в прошлом была незначительной, а сейчас приобрела большое значение;

лечение антибиотиками вызывает необходимость проводить поиски микроорганизма-возбудителя и индивидуального выбора наиболее подходящего антибиотика в зависимости от его чувствительности;

антибиотики не могут разрешить вопросы ликвидации заболеваний, вызванных микроорганизмами. Вместе с тем они стали источником новых проблем, которые касаются как отдельно, так и вместе взятых микроорганизмов и организма человека;

близкое сотрудничество лечащего врача с микробиологом стало необходимостью.

**Р е ц е н з е н т ы:** Л.Н.Терновская, доктор медицинских наук;  
А.Б.Покатилов, доцент.

УДК 616-093/-098 (075)  
ББК 52.64

©Крамарь О.Г., Резников Е.В., 2002  
© Волгоградская медицинская  
академия, 2002

В больничные стационары ежегодно госпитализируются десятки миллионов человек. Главной задачей коллективов этих учреждений является возможно полное и быстрое восстановление здоровья госпитализированных больных и создание безопасных и комфортных условий пребывания больных и работы медицинских работников в больничных стационарах. Эти задачи решаются совокупностью клиническими специалистами, клинической микробиологией и санитарной микробиологией.

Специфические микробиологические проблемы в соматических стационарах существуют давно, но понятие о клинической микробиологии, как самостоятельном разделе медицинской микробиологии, ее задачах и методах формируется только в настоящее время.

Выделение этого раздела обусловлено главным образом тем, что в результате эволюции микробов, темпы которой резко усилились во 2-й половине XX века, произошло резкое увеличение удельного веса и абсолютного количества инфекционных заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами.

Большинство таких больных госпитализируют в неинфекционные стационары.

Биологические особенности условно-патогенных микробов, широкое и часто нерациональное применение антибиотиков, расширение спектра и утяжеление оперативных вмешательств, широкое внедрение в практику здравоохранения диагностических и лечебных процедур, ведущих к нарушению целостности покровов, и ряд других факторов привели к возникновению в больничных стационарах ряда сложных проблем практического и научного порядка (циркуляция множественно устойчивых и больничных вариантов бактерий, нарастание внутрибольничных, хронических, смешанных, вторичных инфекций и сепсиса и др.). Клиническая микробиология решает микробиологические аспекты этих проблем.

*Клиническая микробиология* является разделом медицинской микробиологии и исследует микробиологические аспекты этиологии патогенеза и иммунитета микробных заболеваний в неинфекционной клинике, разрабатывающей и реализующей методы их лабораторной диагностики, специфической терапии и профилактики.

Поскольку главным объектом изучения клинической микробиологии являются условно-патогенные микробы и их взаимоотношения с организмом и популяцией человека, то высказано предложение сузить содержание рассматриваемого отдела и определить клиническую

микробиологию как предмет, изучающий заболевания, вызванные условно-патогенными микробами. Клиническая микробиология исследует главным образом одну группу микробов - условно-патогенные, одну группу заболеваний - оппортунистические инфекции и одну антропогенную экосистему - больничные учреждения.

Исходя из этого, задачами клинической микробиологии являются:

- исследование биологической роли условно-патогенных микробов в этиологии и патогенезе инфекционных заболеваний человека;
- разработка и использование методов микробиологической диагностики, специфической терапии и профилактики микробных заболеваний, встречающихся в неинфекционных стационарах;
- исследование микробиологических аспектов проблем внутрибольничных инфекций, дисбактериоза, лекарственной устойчивости микробов;
- микробиологическое обоснование и контроль за антимикробными мероприятиями в больничных стационарах.

В современной патологии человека предполагается этиологическая роль около ста видов условно-патогенных микроорганизмов. Условно-патогенные микроорганизмы встречаются среди всех категорий микробов: бактерий (*Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Moraxella*, *Veilonella*), микоплазм, грибов (*Candida*, *Aspergillus*), а также вирусов (*Herpes*, *Enterovirus* и др.).

Важным условием развития инфекционного процесса, вызванного УПМ, является преодоление ими колонизационной резистентности, которую создают определенные сочетания представителей нормальной микрофлоры человека. При этом возбудителями инфекционного процесса могут быть как представители собственной микрофлоры макроорганизма, так и УПМ, попадающие в него извне.

Для заболеваний, вызванных условно-патогенными микроорганизмами, характерен ряд особенностей: они развиваются у людей с пониженной иммунологической реактивностью в результате соматических заболеваний, оперативных вмешательств, применения лекарственных средств, обладающих иммунодепрессивным действием (гормоны, цитостатики и др.).

Инфекционные процессы, обусловленные УПМ, лишены нозологической специфичности: один и тот же вид микроба может вызвать воспалительные процессы различных органов и тканей и, напротив, разные виды микробов способны вызвать гнойно-воспалительные процессы одного и того же органа или ткани.

Плейотропность УПМ, то есть способность размножения в различных органах и тканях, зависит от наличия у них большого числа факторов патогенности, к которым относят: адгезины, дающие возможность им прикрепиться к клеткам макроорганизма; капсулы; К- и О-антигены; белки наружной мембраны, сообщающие микробам устойчивость к фагоцитозу и бактерицидному действию нормальной сыворотки; ферменты, способствующие проникновению и распространению микробов; экзо- и эндотоксины; гемолизины; факторы колициногенности и др.

Условно-патогенные микробы выделяют большое количество экзоферментов (гиалуронидаза, эластаза, коагулаза, фибринолизин, нейраминидаза, лецитиназа, нуклеазы, дезаминазы, декарбоксилазы и др.).

Для условно-патогенных микроорганизмов, занимающих различные экологические ниши, характерна выраженная популяционная изменчивость, которая проявляется в двух видах: внутри- и межпопуляционной. Внутрипопуляционная изменчивость проявляется в виде гетерогенности локальных популяций.

Гетерогенность популяций характерна для всех обитающих на Земле видов животных, растений, грибов, бактерий и вирусов, но у условно-патогенных бактерий этот признак особенно выражен и характерен.

Селективное преимущество гетерогенных популяций общеизвестно: чем больше генотипов (вариантов) в популяции, тем больше вероятность того, что в ней найдутся варианты, которые перенесут изменения внешней среды, в том числе и экстремальные.

Многочисленные исследования патологического материала в процессе пребывания больных в стационаре показывают, что популяции УПБ не только гетерогенны, но и изменчивы во времени, динамичны.

Эти изменения происходят непрерывно и состоят в исчезновении исходных и появлении новых вариантов в популяции, полной смене вариантного состава, изменении количественных соотношений вариантов, например, в переходе варианта от доминирования к минорности и наоборот. Главная направленность изменения состава популяции в процессе лечения - это переход от чувствительных вариантов к множественно устойчивым.

Условно-патогенные микроорганизмы обитают в виде сообществ с симбионтами. Сочленные микробиоценозы занимают в биотопе определенные экологические ниши и между ними существуют разнообразные экологические связи.

Микробиоценозы патологически измененных биотопов имеют существенные отличия, которые состоят в снижении способности к аутостабилизации, усилении конкурентных взаимоотношений между

сочленами микробиоценоза с появлением у микроорганизмов ферментов инвазии и агрессии, приводящих к развитию гнойно-воспалительных процессов у человека.

## **ОПОРТУНИСТИЧЕСКИЕ ГНОЙНО- ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ИНФЕКЦИОННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ**

Гнойными (гнойно-воспалительными, гноеродными) инфекциями называют заболевания, сопровождающиеся развитием гнойного или серозно-гнойного воспаления тканей микробной этиологии. Они могут быть острыми и хроническими; местными (локальными), системными и генерализованными. Локальные (местные) инфекции, в свою очередь, разделяются на несколько групп, различающихся по этиологии и ряду других признаков, что обуславливает необходимость их отдельного рассмотрения.

### **Гнойные инфекции травматических, операционных и ожоговых ран (раневаая и ожоговая инфекция)**

Под ранами понимают механические травмы тканей с нарушениями их целости. По происхождению их разделяют на операционные, бытовые, производственные и боевые. Практически во все раны (боевые, бытовые, производственные и многие операционные) в момент их образования и после вносятся микроорганизмы, т.е. большинство нарушений ткани являются "бактериально загрязненными".

Микробному фактору в оценке развития инфекционного процесса всегда уделялось большое внимание, так как хорошо известно, что от вида микроба, вызвавшего инфекционный процесс, зависит специфика течения последнего и особенности морфологических изменений в органах. Это положение особенно важно учитывать в настоящее время, когда произошли значительные изменения в этиологической структуре возбудителей инфекционных заболеваний вообще и гнойных хирургических инфекций в частности и на первое место выдвинулась проблема условно-патогенных возбудителей. В настоящее время под селективным воздействием

антибактериальных препаратов произошли значительные изменения в этиологической структуре возбудителей гнойных хирургических инфекций. Ведущими среди них стали стафилококки и грамотрицательные бактерии, принадлежащие к семейству *Enterobacteriaceae* и к обширной малоизученной группе так называемых неферментирующих грамотрицательных бактерий. Существенная роль в этиологии раневой инфекции отводится облигатным неспорообразующим анаэробным бактериям.

Прежде чем перейти к микробиологической характеристике различных ран, необходимо остановиться на вопросе о бактериальном загрязнении раны (микробиологический термин "бактериальное обсеменение") и собственно инфекционном процессе в ране (клинический термин "инфицированная или гнойная рана"). Нам представляется, что под термином "бактериально загрязненная рана" следует понимать такое состояние, когда общие и локальные механизмы защиты способны подавить попавшие в рану микроорганизмы и не наблюдается никаких клинических признаков инфекционного процесса в ране. Принято различать первичное и вторичное микробное загрязнение раны. Первичное загрязнение наступает в момент нанесения раны и характерно для травматических и огнестрельных ран. Вторичное загрязнение раны, как правило, связано с нарушением правил асептики во время перевязок и операций и часто является следствием внутригоспитальной инфекции. Следовательно, само по себе присутствие микробов в ране (даже патогенных бактерий, не говоря уже о группе условно-патогенных микробов) еще не делает развитие инфекции в ране обязательным.

Начальная реакция организма на внедрение микробов в ткани протекает однотипно независимо от вида возбудителя и связана в первую очередь с развитием воспалительной реакции. В эксперименте и клинических наблюдениях установлено, что для развития инфекционного процесса в ране необходимо, чтобы общее количество микробов в 1 г ткани превысило "критический уровень", который составляет  $10^5$ - $10^6$  бактерий в 1 г ткани, взятой из глубины раны (Александр Дж., Гуд Р., 1974). Поскольку основные возбудители раневой инфекции - это в основном представители так называемой условно-патогенной микрофлоры тела человека, в процессе эволюционного развития выработались определенные количественные соотношения между этими микробами и макроорганизмом. Наличие этих микробов в ране ниже определенного предела (менее  $10^5$  на 1 г ткани) не приводит к клинически выраженному инфекционному процессу, и организм

справляется с таким бактериальным загрязнением раны. Активное размножение этих микробов выше указанного предела приводит к развитию клинически выраженной местной или генерализованной инфекции. Эти количественные соотношения между микробами и макроорганизмом лежат в основе биологической сущности инфекционного процесса.

Схема 1.

### Основные возбудители гнойной инфекции в хирургии



Одна из основных трудностей в проблеме ран и раневой инфекции - отсутствие объективных лабораторных критериев для оценки течения раневого процесса. Клиницистам необходимы объективные бактериологические тесты для прогнозирования течения раневой инфекции и степени опасности развития инфекционных осложнений, для объективной сравнительной оценки различных методов лечения гнойных ран.

Наши исследования показали, что наиболее стабильным и информативным показателем, хорошо коррелирующим с характером гнойно-воспалительного процесса, является метод количественной характеристики микрофлоры на 1 г ткани, взятой при биопсии. Определение количества бактерий на 1 см<sup>2</sup> раневой поверхности, как и количества

микробов в 1 мл раневого отделяемого, имеет меньшее диагностическое и прогностическое значение, ибо уровень бактериальной обсемененности на поверхности раны подвержен значительным колебаниям в зависимости от лечебных факторов.

Нами установлена прямая зависимость между количеством микробов в 1 г ткани и характером гнойно-воспалительного процесса. Выявлены различия в уровне бактериальной обсемененности гнойных ран различного генеза (табл. 5.1.). В первичных гнойных ранах, образовавшихся после вскрытия гнойных очагов мягких тканей, количество микробов в 1 г биоптата до хирургической обработки у большинства больных (65%) не превышало  $10^3$  (т.е. критический уровень) и в среднем составляло  $10^3 \cdot 10^4$  ( $4 \cdot 10^4 \pm 0,40$ ). В то же время у большинства больных хирургическим сепсисом (95%) количество микробов в ране превышало критический уровень, достигая в отдельных случаях очень высоких показателей -  $10^9 \cdot 10^{11}$  в 1 г ткани раны ( $2 \cdot 10^7 \pm 0,43$ ). Столь значительное повышение степени бактериальной обсемененности гнойных ран на фоне снижения антиинфекционной резистентности организма у больных этой категории способствовало генерализации инфекционного процесса.

### МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАН

Согласно современным представлениям, наиболее общим принципом является деление ран на **операционные** и **случайные**. Операционные раны в свою очередь могут быть разделены на "чистые" и инфицированные (гнойные). Соответственно и микробиологическую характеристику ран целесообразно давать в зависимости от их характера.

Клинический опыт показывает, что ведущим фактором, определяющим возможность перехода бактериально загрязненной раны в инфицированную, является функциональное состояние поврежденных тканей. Развитие инфекции наиболее вероятно в обширных бактериально загрязненных ранах, содержащих большое количество нежизнеспособных или поврежденных тканей, которые служат отличной средой для бактерий. Своевременная полноценная хирургическая обработка такой бактериально загрязненной раны может превратить ее в "чистую".

Инфекционный процесс (инфекция в ране) развивается при нарушении равновесия между микробами, загрязняющими рану, и защитными силами макроорганизма, что проявляется клиническими симптомами воспаления. По мнению большинства авторов, именно клинические симптомы

воспаления служат основным показателем, позволяющим клиницисту ограничивать микробное загрязнение раны от инфекции.

При развитии инфекционного процесса в ране в отличие от бактериального загрязнения происходит распространение микробов в глубь жизнеспособных тканей, в лимфатические и кровеносные пути, после чего резко проявляется патогенное воздействие бактерий как на течение местного раневого процесса, так и на весь организм. Изложенные закономерности особенно наглядно проявляются на примере операционных ран. Известно, что несмотря на применение современных мер асептики в операционных, к концу операций раны очень часто бывают обсеменены различной микрофлорой, однако инфекция в послеоперационной ране развивается значительно реже. Так, A. Biver (1983) на основании анализа обширного клинического материала показал, что к концу операции в 80-90% случаев раны обсеменены различной микрофлорой (чаще непатогенным стафилококком), но послеоперационные нагноения возникают лишь в 2-30% случаев.

Основными возбудителями инфекции ран, полученных при военных действиях, являются грамотрицательные бактерии семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Pseudomonas*, а также стафилококки. По данным J. Kovaric и соавт. (1978), T. Matsumoto и соавт. (1989), из ран военного времени грамотрицательные бактерии выделялись в 60-70%, а патогенный золотистый стафилококк в 30-40% случаев. Из грамотрицательных бактерий в таких ранах наиболее часто определяются *Ps. aeruginosa* (до 30%) и *E. coli* (до 17%).

M. Tong (1992) указывает на важную роль внутригоспитальной инфекции (особенно грамотрицательной микрофлоры и в первую очередь синегнойной палочки) и в военных госпиталях.

Что касается микрофлоры травматических ран (бытовая, производственная травма и др.), то в посевах из свежих ран при первичной хирургической обработке преобладают стафилококки как в монокультуре, так и в ассоциациях. Лишь в единичных случаях высеваются в чистой культуре грамотрицательные микробы (синегнойная и кишечная палочки, протей и др.). Анаэробная микрофлора обнаруживается в 0,1% наблюдений. В процессе лечения больных в стационаре значительно возрастает частота выделения из таких ран грамотрицательной микрофлоры.

Сравнительный анализ микрофлоры "свежих" травматических ран при поступлении больных и развитии гнойных осложнений (Девятов А. А. и др., 1975) позволил установить, что возбудители гнойной инфекции

отличаются от "уличной" микрофлоры по видовому составу, признакам патогенности, чувствительности к антибиотикам. На основании этих данных сделан вывод о том, что возбудителем гнойной инфекции травматических ран является не "уличная" микрофлора, попавшая в рану при бактериальном загрязнении, а "госпитальная" микрофлора, которая проникает в рану в случае несоблюдения правил асептики и антисептики при хирургической обработке раны или при последующих перевязках.

При бактериологическом исследовании микрофлоры гнойных посттравматических ран нами отмечено, что по качественному составу микрофлора их очень сходна с таковой у больных с хроническими гнойными заболеваниями и у больных сепсисом (см. табл. 1). Уже при первичных исследованиях гнойных посттравматических ран выявлено, что наряду с высоким процентом выделения стафилококков и стрептококков более чем у 60% больных из ран выделялась различная грамотрицательная микрофлора, почти у 30% - синегнойная палочка.

### **"Чистые" операционные раны**

Каждая рана является открытыми воротами для инвазии бактериальной микрофлоры. Операционные раны при так называемых чистых операциях условно можно рассматривать свободными от бактериальной микрофлоры, хотя даже в условиях современной операционной при соблюдении строгих правил асептики практически невозможно избежать бактериального обсеменения операционного поля во время хирургического вмешательства. В работах О. Jepsen (1972) убедительно показано, как возрастает частота бактериального обсеменения ран на этапах операции: если после разреза кожи наличие бактериальной флоры в ране выявлено только в 4,8% случаев, то в конце операции этот показатель возрос до 18%, а при первой перевязке составлял 47,4%. Изучение видового состава микрофлоры "чистых" ран показало, что в большинстве случаев из таких ран выделяется стафилококк (чаще плазмонекоагулирующий) и лишь в более поздние сроки из них выделяется грамотрицательная микрофлора, по-видимому, в результате внутригоспитального инфицирования.

### **Гнойные операционные раны**

Для гнойных ран различного генеза характерно, что в них среди представителей раневой микрофлоры на всех этапах обследования

преобладают стафилококки, которые выделяются как монокультурах, так и в различных микробных ассоциациях. Наблюдается довольно высокий процент выделения различных грамотрицательных бактерий, особенно синегнойной палочки, частота высеваемости которой из ран значительно возрастает в процессе пребывания больных в стационаре. Сравнительный анализ раневой микрофлоры, выделенной из ран различного генеза, позволил выявить определенные качественные различия в видовом составе возбудителей раневой инфекции (табл. 1).

Таблица 1.  
Характеристика раневой микрофлоры у различных групп больных (в процентах)

Состав микрофлоры	Содержание микрофлоры, %							
	Посттравматические гнойные раны		Гнойные раны после острых гнойных заболеваний		Гнойные раны после хронических гнойных заболеваний		Гнойные раны у больных сепсисом	
	при поступлении	в процессе лечения	при поступлении	в процессе лечения	при поступлении	в процессе лечения	при поступлении	в процессе лечения
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Staph. aureus</i>	59,8	46,4	86,6	60,0	48,0	32,4	54,5	43,7
<i>Staph. epidermidis</i>	13,3	12,4	4,9	18,4	5,1	10,8	9,1	6,3
<i>Str. spp.*</i>	11,6	8,9	9,8	6,2	16,3	10,8	18,1	18,2
<i>Ps. aeruginosa</i>	25,9	46,3	8,2	30,8	38,8	54,0	45,4	68,8
<i>Proteus spp.</i>	19,6	21,4	2,7	1,5	28,6	27,0	22,7	31,3
<i>Escherichia coli</i>	24,4	14,3	7,1	15,4	14,3	10,8	22,7	25,0
Другие	3,8	7,1	1,1	4,6	5,1	10,8	9,1	6,3

\* spp. - species populations (все виды)

Основными возбудителями острых гнойных заболеваний мягких тканей являются грамположительные бактерии, а именно *Staphylococcus aureus* и различные виды стрептококков. В процессе лечения снижается частота выделения из гнойных ран *Staph. aureus* и *Streptococcus spp.*, но значительно возрастает частота выделения грамотрицательной микрофлоры, особенно *Pseudomonas aeruginosa* (30,8%), что является результатом внутригоспитального инфицирования ран. Необходимо отметить, что возбудители острых гнойных заболеваний у 83,7% обследованных больных представлены в виде монокультур, среди которых при поступлении *Staph. aureus* составлял 84,9% и *Ps. aeruginosa* - только 4,6%.

Совершенно иная картина выявлена при бактериологическом исследовании гнойных ран у больных, оперированных по поводу хронических гнойных заболеваний. Приведенные в табл. 1 материалы показывают, что возбудителями хронических гнойных заболеваний наряду со стафилококками и стрептококками у большинства больных могут быть грамотрицательные микробы, в основном *Ps. aeruginosa* и различные виды бактерий рода *Proteus*. По данным бактериологических исследований, при хронических гнойных заболеваниях раневая микрофлора носит полимикробный характер и в 54,1% наблюдений представлена в виде микробных ассоциаций. Преобладают ассоциации *Staph. aureus* с грамотрицательной микрофлорой, особенно *Staph. aureus* с *Ps. aeruginosa* (32,6%).

Значительное возрастание частоты выделения грамотрицательной микрофлоры, особенно *Ps. aeruginosa*, из вторичных гнойных ран, было подтверждено при бактериологическом изучении микрофлоры гнойных ран у больных сепсисом. Уже при первичных исследованиях у большинства обследованных из ран была выделена различная грамотрицательная микрофлора (см. табл. 1). В 50% наблюдений раневая микрофлора была представлена в виде монокультур, видовой состав которых был довольно разнообразен, как и видовой состав микробных ассоциаций. В монокультурах чаще всего обнаруживались *Staph. aureus*, *Ps. aeruginosa* и грамотрицательные бактерии семейства *Enterobacteriaceae*. Среди микробных ассоциаций также преобладали ассоциации *Staph. aureus* с *Ps. aeruginosa* (20%) и с *Proteus* (31%).

### Случайные раны

В эту обширную и разнообразную группу входят травматические раны различного происхождения - производственная, бытовая, уличная травмы, в нее следует включить раны военного времени, нанесенные огнестрельным и другими видами оружия. Такие раны обычно сопровождаются значительными повреждениями тканей, глубоким проникновением в ткани осколков, "гвоздей" и остатков одежды. Случайные раны всегда являются первично бактериально загрязненными, поскольку любое случайное ранение неизбежно сопровождается загрязнением бактериями различных видов.

## Ожоговые раны

Среди гнойных ран, относящихся к инфицированным, выделяют ожоговые раны, под которыми понимают повреждение целостности тканей организма, вызванное местным воздействием высокой температуры, химических веществ, электрического тока, излучения.

Утрата кожного или слизистого покрова, выполняющего барьерную и антимикробную функцию, наличие некротических масс экссудата, нарушение микроциркуляции, токсическое поражение окружающих тканей создают благоприятные условия для проникновения в рану и размножения в ней микробов. Кроме того, у больных ожогами, особенно глубокими и обширными, происходит резкое снижение активности факторов естественного иммунитета и способности к иммунному ответу на инфекционные агенты, что повышает вероятность развития ожоговой инфекции, утяжеляет течение местного инфекционного процесса и содействует его генерализации, развитию септикопиемии и микробной токсемии.

Инфицирование ожоговой раны начинается сразу же после ожога. В рану попадают микроорганизмы с неповрежденных участков кожи и слизистой оболочки, воздуха, одежды и других объектов внешней среды. В стационаре эта внебольничная, как правило, мало вирулентная и чувствительная к антибактериальным препаратам микрофлора сменяется на больничные штаммы. Возбудителями ожоговой инфекции в этот период являются золотистый и эпидермальный стафилококки, пиогенный стрептококк, синегнойные бактерии, кишечная палочка, энтеробактерии. При глубоких ожогах часто выделяют анаэробные бактерии. Среди названных видов бактерий ведущее место принадлежит стафилококку, хотя в 80-90-е годы его удельный вес существенно снизился, а грамотрицательных бактерий, особенно синегнойной палочки, - резко возрос. Для ожоговой инфекции, особенно позднего периода, характерны: частое присутствие в ране нескольких видов бактерий, выраженная гетерогенность популяций, их высокая устойчивость к антибиотикам и антисептикам, постоянное количественное и качественное изменение видового и вариантного состава возбудителей. Ожоговая инфекция нередко осложняется сепсисом, который, особенно псевдомонадный, протекает тяжело и дает высокую летальность.

## ОСОБЫЕ ВИДЫ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ

В повседневной практике врач может встретиться с таким течением раневого процесса, которое резко отличается от описанных вариантов местными изменениями в ране и общими проявлениями, обусловленными видом возбудителя раневой инфекции.

В этой главе рассматриваются особые виды клостридиальной раневой и неклостридиальной анаэробной и гнилостной инфекций.

### **Анаэробная клостридиальная и неклостридиальная инфекции**

Под термином “анаэробная инфекция” обычно подразумеваются острые заболевания с участием спорообразующих микробов рода *Clostridium*, возбудителей газовой гангрены, столбняка и ботулизма.

Однако, удельный вес этих микроорганизмов невелик и составляет около 5% среди патогенных анаэробов (Столбовой А. В., Кочеровец В. И., 1981; Blettery В. и др., 1979). Помимо спорообразующих облигатных анаэробных бактерий, имеется большая группа анаэробных бактерий, которые не образуют спор (неспорообразующие или неклостридиальные). Обычно это представители нормальной аутофлоры человека, обитающие в полости рта, кишечнике, на коже. Об их участии в развитии раневой инфекции известно давно (Veillon A., 1893; Melaney F., 1924), но лишь в последние годы в связи с развитием и усовершенствованием методов бактериологической диагностики появилась возможность более точного выделения и идентификации микроорганизмов, вызывающих развитие анаэробной клостридиальной инфекции. Этот вид раневой инфекции относится к наиболее опасным для жизни осложнениям ран любого генеза. Считается, что клостридиальная раневая инфекция имеет наибольшее распространение во время боевых действий. Так, в различные периоды первой мировой войны заболевание встречалось у 2-15% раненых. В 1,2-1,5% случаев ранений клостридиальная раневая инфекция зарегистрирована во время боев на озере Хасан, у реки Халгин-Гол и во время войны с белофинами (Ахутин М. Н.). Во время Великой Отечественной войны осложнения ран клостридиальной инфекцией составляли на некоторых этапах эвакуации от 0,08 до 1,5%.

Этиология. Классическими возбудителями клостридиальной инфекции считаются *Clostridium perfringens*, *Cl. oedematiens*, *Cl. histolyticum*, *Cl. septicum*.

Для клостридий характерна способность выделять экзотоксины, вызывающие некроз соединительной ткани и мышц. Другое важное свойство токсинов - способность вызывать гемолиз, тромбоз сосудов, поражение миокарда, печени, почек (Johnson J. T. et al., 1969).

Клостридиальный экзотоксин представляет собой сложную коллоидную структуру, дающую выраженный фармакологический эффект. К наиболее активным фракциям экзотоксина относятся:

1. Альфа-токсины, или лецитиназа С. Оказывает выраженное некротизирующее и гемолитическое действие.

2. Бета-токсин, или гемолизин. Дает выраженный некротизирующий эффект и является летальным вследствие специфического кардиотоксического действия.

3. Каппа-токсин, или коллагеназа. Является летальным вследствие способности лизировать белковые структуры.

4. Ну-токсин, или гиалуронидаза. Действует как фактор проникновения, фактор распространения.

5. Му-токсин. Поражает ДНК клеток.

6. Фибринолизин. Лизирует фибрин.

7. Нейраминидаза. Способствует разрушению иммунных рецепторов на эритроцитах.

8. Гемагглютинин. Инактивирует фактор А на эритроцитах и "циркулирующий фактор", ингибирует фагоцитоз (Hitchcock C. R. et al., 1975).

Всем клостридиям свойственны газообразование и появление отека.

При неклостридиальной инфекции наиболее часто встречаются следующие анаэробные микробы: грамотрицательные палочки рода *Bacteroides* и *Fusobacterium*, грамположительные кокки рода *Peptococcus* и *Peptostreptococcus*, грамположительные неспорообразующие палочки. Настороженность врача, знание клинических особенностей течения неклостридиальной инфекции мягких тканей в большинстве наблюдений позволяют заподозрить развитие этого опасного заболевания еще до проведения лабораторной экспресс-диагностики и начать соответствующее лечение. Надежным подспорьем в подтверждении клинического диагноза являются бактериоскопия и хроматографическое исследование, на выполнение которых не нужно значительного времени. Своевременная диагностика анаэробной неклостридиальной инфекции и правильное хирургическое лечение в сочетании с антибактериальной терапией позволяют значительно улучшить результаты лечения.

Среди гнойных ран часто встречается гнилостная инфекция - тяжелое инфекционное осложнение ран, характеризующееся распространяющимся некрозом тканей и последующим их гнилостным распадом. Чаще всего гнилостной инфекцией осложняются травматические раны с большим количеством размозженных, нежизнеспособных тканей, мочевые флегмоны при переломах костей таза, диабетические гангрены, флегмоны передней брюшной стенки после повреждения толстой кишки (каловые флегмоны), укушенные и огнестрельные раны. Обычно гнилостная флегмона сочетается с аэробной и неспорообразующейся анаэробной инфекцией. Если отсутствует обильное загрязнение раны, то гнилостная флегмона протекает без выраженных токсических проявлений. Именно этим обстоятельством можно объяснить отсутствие точных данных о частоте развития явлений гнилостного распада.

Трудность диагностики гнилостной инфекции обусловлена также изменяющимся видом и характером микрофлоры в различные периоды раневого процесса и характером самой раны. Так, в огнестрельной ране с момента ее возникновения среди прочих микроорганизмов присутствуют гнилостные микробы, как анаэробные, так и аэробные, как споровые, так и неспоровые. В "свежих" и травматических ранах с обширным некрозом тканей в первые часы таких микробов мало, но в последующие дни количество их столь же обильно, как и патогенных анаэробов, в частности *Cl. perfringens*.

Возбудителями гнилостной инфекции являются: *B. coli*, *B. pyocyaneus*, *B. putrificum*, *B. sporogenes*, *Spr. fecalis*, *Pr. vulgaris*, *B. gigas*, *B. emphysematicus* и др. Чаще всего выделяют *Pr. vulgaris*, *B. coli*, *Str. putrificus*.

## Хирургический сепсис

Сепсис, или "заражение крови", издавна считается одним из самых опасных и тяжелых осложнений хирургической раневой инфекции, уносящих множество жизней раненых и хирургических больных.

Несмотря на достижения современной медицины и значительные успехи в борьбе с хирургической инфекцией, сепсис остается одной из наиболее сложных и недостаточно изученных общеклинических и хирургических проблем. В этой проблеме до сих пор больше поставленных, чем разрешенных вопросов. Нет единой терминологии и классификации сепсиса. Существуют совершенно различные мнения о частоте развития

этого заболевания. Обсуждается роль микро- и макроорганизма в механизме развития сепсиса, остаются неясными многие другие вопросы его патогенеза. Нечетко определено само понятие "сепсис". До сих пор нет ясности в том, что это такое - осложнение гнойной инфекции или самостоятельное заболевание.

Диагностику сепсиса большинство клиницистов считают весьма трудной задачей, а симптоматику - расплывчатой и неопределенной.

Этиология и патогенез. Взгляды на этиологию и патогенез сепсиса на протяжении XX века претерпевали серьезные изменения: они эволюционировали от признания первостепенной роли микроба как главной причины развития сепсиса (теория Шоттмоллера о септическом очаге) до утверждения решающего значения состояния макроорганизма.

В последнее время эти крайние точки зрения в значительной мере сблизились, и по общепринятому теперь взгляду патогенез сепсиса определяется сложным и тесным взаимодействием четырех факторов:

- 1) возбудителя инфекции (вид микроба, доза, вирулентность);
- 2) состояния первичного и вторичного очагов инфекции (локализация, состояние тканей и кровообращения, лечение);
- 3) иммунной защиты организма (неспецифической и специфической);
- 4) степени интоксикации.

Взаимодействие перечисленных факторов, особенно воздействие на организм микробов, их токсинов и продуктов распада тканей, всасывающихся в кровь из первичного и метастатических гнойных очагов, приводит к тяжелой интоксикации больного, выраженным нарушениям метаболизма, дистрофии внутренних органов и обуславливает клиническую картину сепсиса.

Такое понимание этиологии и патогенеза сепсиса вытекает из представления об инфекционном процессе, как о некоей интегральной величине, складывающейся в результате взаимодействия микро- и макроорганизмов и зависящей от индивидуальных особенностей макроорганизма.

При сепсисе необходимо иметь в виду входные ворота, первичный и вторичный очаги инфекции, хирургический сепсис.

Входными воротами при сепсисе называют место внедрения инфекции. Обычно им являются поврежденные ткани.

Первичным очагом (первичным септическим очагом) считают участок воспаления, возникший на месте внедрения инфекции и служащий в дальнейшем источником возникновения сепсиса.

Первичный очаг обычно полностью совпадает с входными воротами, но иногда он возникает в отдаленных от места внедрения инфекции частях организма, например, в случае развития гнойного лимфаденита с образованием флегмоны (первичный очаг) вследствие инфицирования потертости или трещины отдаленных от первичного очага кожных покровов (входные ворота). Практически такие случаи встречаются редко.

В хирургической практике первичными очагами чаще всего являются различные раны (случайные, огнестрельные, операционные) и местные гнойные процессы (фурункулы, карбункулы, абсцессы, флегмоны, мастит и т.д.), реже хронические гнойные заболевания (трофические язвы, остеомиелит, тромбоз и т.д.).

Гнойный перитонит, нагноительные заболевания легких (абсцессы, бронхоэктазы, эмпиема плевры), по нашим наблюдениям, причиной развития сепсиса бывают крайне редко.

При распространении инфекции за пределы первичного очага возникают так называемые вторичные (метастатические) пиемические очаги в различных тканях и органах, отдаленных от места внедрения инфекции. Большинство клиницистов различают первичный и вторичный сепсис.

Сепсис считают первичным, если не находят входных ворот, первичного гнойного очага и если происхождение сепсиса остается неясным. Предполагается, что возникновение сепсиса в таких случаях связано с аутоинфекцией (дремлющая инфекция, зубы, миндалины); его называют также криптогенным.

Занимаясь много лет диагностикой и лечением таких больных, М.И. Кузин (1990) ни разу не видел сепсиса без первичного очага и поэтому считает, что хирургический сепсис практически всегда является вторичным, т.е. развивается обязательно при наличии первичного очага инфекции: гнойной раны вследствие острого или хронического гнойного хирургического заболевания, оперативного вмешательства и других причин.

### **Гнойно-воспалительные заболевания кожи и подкожной клетчатки (первичные)**

К этой группе относятся следующие заболевания:

- фурункулы;
- карбункулы;
- абсцессы;

- флегмоны;
- гидроаденит;
- пиодермии;
- панариций;
- рожа и другие более редкие формы.

Возбудители инфекции проникают из внешней среды через трещины, ссадины, царапины, уколы, расчески кожи, но могут быть занесены гематогенным и лимфогенным путями из инфицированных очагов в других частях тела. Абсцесс, флегмона, рожа нередко развиваются в результате заноса возбудителя при медицинских вмешательствах (инъекциях лекарственных препаратов, вакцин, биопсиях, заборе крови для анализа). Развитию гнойно-воспалительных заболеваний способствуют тяжелые общие заболевания, например, диабет, а также ожирение, авитаминозы, недостаточность белкового питания, низкий уровень личной гигиены и др.

Ведущими возбудителями являются золотистый и эпидермальный стафилококки. Реже их вызывают пиогенный стрептококк, кишечная палочка, протей, синегнойные бактерии, бактероиды, иногда микобактерии. Первичные закрытые процессы обычно вызываются однородной по своим признакам популяцией одного вида, чаще представителями микрофлоры кожи самого организма или бактериями, колонизовавшими участки кожи. После спонтанного или хирургического вскрытия часто возникает суперинфекция больничными штаммами этого же вида или вторичная инфекция другими видами, чаще грамотрицательными бактериями (кишечной палочкой, протеем, синегнойными бактериями и др.). Постинъекционные абсцессы и флегмоны вызываются больничными вариантами бактерий тех же видов, как и послеоперационные инфекции.

### **Гнойные воспаления других органов и тканей**

Для этой сборной группы характерны общие закономерности с рассмотренными выше гнойно-воспалительными заболеваниями. При эндогенной инфекции возбудителями являются аутохтонные для пораженного или смежных органов больного вида, относящиеся к внебольничным экovarам. При экзогенном инфицировании во внебольничных условиях гнойные процессы вызываются внебольничными экovarами гноеродных бактерий, в больничных стационарах - больничными экovarами тех же видов. В начальном периоде болезни инфекция вызывается чаще одним видом, в поздний период болезни видовой состав

возбудителей расширяется в основном за счет появления грамотрицательных и других больничных бактерий. Хронические процессы по сравнению с острыми и открытые процессы по сравнению с закрытыми имеют более широкий спектр возбудителей с более частым присутствием гетерогенных популяций больничных экovarов.

**Острый средний отит** является осложнением заболеваний верхних дыхательных путей или результатом гематогенного заноса возбудителя из других инфекционных очагов. У взрослых людей его вызывают стафилококки, пиогенный и пневмонийный стрептококки, у детей - стрептококк пневмонии, инфлюэнца-бактерия, клебсиелла пневмонии, кишечная палочка, а также анаэробные стрептококки. В большинстве случаев хронический средний отит вызывают ассоциации грамотрицательных бактерий, прежде всего протей, синегнойных бактерий, а также бактероидов, фузобактерий.

**Гайморит, фронтит** обычно являются осложнением ринита или периодонтогенного воспаления, но могут возникать и самостоятельно за счет гематогенного заноса возбудителей. При острых формах в содержимом пазух находят стафилококки, стрептококки, инфлюэнца-бактерию. В отделяемом хронических синуситов нередко обнаруживаются ассоциации видов, вызывающих острые формы. Однако здесь чаще и в большем количестве встречаются протей, клебсиелла пневмонии, кишечная палочка, синегнойные бактерии.

**Гнойный паротит** - воспаление (обычно одностороннее) железистой и интерстициальной ткани околоушной слюнной железы - развивается обычно при проникновении в железу микробов из полости рта и при нарушении процесса выделения слюны. Ограниченные гнойные очаги чаще вызывают стафилококки, флегмонозные и гангренозные процессы - пиогенный стрептококк.

**Гнойный медиастенит** чаще является осложнением оперативных вмешательств на сердце и легкие: вызывается анаэробными стрептококками и больничными экovarами стафилококков.

**Гнойный перикардит** - воспаление околосердечной сумки - обычно является осложнением ран сердца, воспалительных заболеваний средостения, легкого, брюшной полости, а также ревматизма, ангины и др. Внутригрудные операции также нередко осложняются перикардитом. Ведущими возбудителями являются золотистый стафилококк, пиогенный стрептококк, пневмококк, анаэробные стрептококки.

**Мастит** - воспаление железистой и интерстициальной ткани молочной

железы - частое осложнение послеродового периода и периода грудного вскармливания. В этиологии послеродового мастита ведущим возбудителем является золотистый стафилококк. В отдельных случаях его вызывают пиогенные стрептококки, грамотрицательные бактерии. После самостоятельного или хирургического вскрытия состав возбудителей резко расширяется за счет грамотрицательных бактерий. Не связанный с кормлением мастит, кроме названных видов, может быть вызван актиномицетами, микобактериями.

**Панариции** - гнойные воспаления пальцев. Выделяют кожный, подкожный, сухожильный (тендовагинит); суставной, костный, подногтевой панариций, паронихию (воспаление околоногтевого валика). Ведущая роль в этиологии болезни принадлежит золотистому и эпидермальному стафилококкам; иногда вызываются стрептококком, кишечной палочкой. После вскрытия гнойника состав возбудителей расширяется за счет присоединения грамотрицательных бактерий. В большинстве случаев заболевание возникает после производственной, реже бытовой травмы.

**Гнойный аппендицит** - воспаление червеобразного отростка - вызывается ассоциацией аутохтонных для кишечника микроорганизмов: кишечной палочкой, бактероидами, протеем, другими энтеробактериями. Во время оперативного вмешательства возможен экзогенный занос больничных штаммов стафилококков, кишечных палочек.

**Холецистит** - воспаление желчного пузыря. Желчь обладает бактерицидными свойствами, тем не менее в норме в ней, а также в желчных ходах нередко выявляют кишечную палочку, стафилококки, протей. Заболевание может развиваться за счет этих микробов или в результате гематогенного и энтерального заноса таких же или других видов бактерий. Для проявления патогенного действия микробов большое значение имеют нарушение кровообращения в стенках желчного пузыря, нарушение оттока желчи, присутствие камней и др. факторы.

**Гнойный панкреатит** - воспаление поджелудочной железы - вызывается при сочетании заноса микробов в железу (энтерального, гематогенного, контактного) с нарушением структуры и функции органа, особенно переваривание ткани железы собственными ферментами. Возбудителями панкреатита являются кишечная палочка, протей, стафилококк.

**Гнойный парапроктит** - воспаление клетчатки, окружающей прямую кишку. Вызывается ассоциацией грамотрицательных и

грамположительных, аэробных и анаэробных бактерий, в которой ведущая роль принадлежит кишечной палочке и бактероидам.

**Гнойный перитонит** - диффузное воспаление брюшины. Наиболее тяжелая после сепсиса форма гнойной инфекции. Собственной микрофлоры брюшная полость не имеет. Инфекционный процесс возникает в результате заноса микробов из органов брюшной полости в результате нарушения проницаемости или разрыва стенок этих органов, гематогенным и лимфогенным путем из других органов больного, а также во время оперативных вмешательств и при ранениях. Возбудителями перитонита при эндогенной инфекции являются ассоциации аутохтонных для кишечника бактерий: кишечной палочки, протей, энтеробактера, клебсиелл, фекального стрептококка, часто в ассоциациях присутствуют стафилококки, бактериоиды. В развитии послеоперационных перитонитов велика роль больничных штаммов: стафилококков, кишечных палочек и других грамотрицательных бактерий. Общий разлитой перитонит сопровождается выраженной интоксикацией, бактериемией и нередко осложняется сепсисом.

**Гнойный менингит** - гнойное воспаление мозговых оболочек. Встречаются первичный менингит, вызываемый менингококками, и вторичный, возбудителями которого являются золотистый и эпидермальный стафилококки, пиогенный и пневмонийный стрептококки, кишечная палочка, инфлюэнца-бактерия. Возбудители заносятся в субарахноидальное пространство из инфекционных процессов в других органах гематогенным, лимфогенным, контактными путями, а также при травмах.

**Остеомиелит** - воспаление костной ткани. Различают специфические (туберкулезный, сифилитический, лепрозный и др.) и неспецифические (оппортунистические) остеомиелиты. Возбудители проникают в костную ткань из инфекционных очагов в других частях организма, а также при травмах. Острый гематогенный остеомиелит вызывается золотистым стафилококком и пиогенным стрептококком, хронические и травматические - ассоциацией стафилококков с грамотрицательными бактериями, в которой часто присутствуют множественно устойчивые больничные варианты.

**Омфалит** - воспаление культи пуповины - развивается обычно в первые 10 дней после рождения в результате инфицирования пупочной ранки собственными бактериями кожи (эпидермальный и золотистый стафилококки) и кишечника (кишечная палочка, синегнойные бактерии), а также микрофлорой матери и медицинского персонала, обычно

относящейся к тем же видам, но к иным больничным вариантам. В связи с незрелостью иммунной системы новорожденных, особенно в локализации инфекционных процессов, омфалит часто осложняется сепсисом.

**Сальпингосфорит (аднексит)** - воспаление придатков матки. Возбудители проникают в трубы и яичники восходящим путем из воспалительных процессов в вагине, матке, при контакте с пораженными аппендиксом, сигмовидной кишкой, а также заносятся гематогенным путем. Способствуют заболеванию аборты, обильные менструации, нарушение питания, хроническое переутомление, переохлаждение. Выделяют специфические (гонококковый, туберкулезный) процессы и неспецифические (оппортунистические), вызванные кишечной палочкой, стафилококком, стрептококком.

## 2.0. ЭТИОЛОГИЯ ОПОРТУНИСТИЧЕСКИХ БРОНХОЛЕГОЧНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Оппортунистические инфекции бронхов и легких протекают в виде бронхита, пневмонии, абсцесса и гангрены легкого, эмпиемы плевральной полости. Ведущее место в этой группе заболеваний занимают хронический и острый бронхит.

Заражение возбудителями оппортунистических инфекций происходит главным образом воздушно-капельным путем из внешней среды или верхних дыхательных путей самого больного. Но возбудители нередко проникают также из крови (при сепсисе), при оперативных вмешательствах, эндоскопических процедурах, во время интратрахеального введения контаминированных микробами аэрозолей и растворов.

Верхние дыхательные пути и полость рта имеют собственную микрофлору. В преддверии носа, являющимся противопылевым фильтром, широко представлена микрофлора воздуха. В полости носа здоровых людей постоянно обитают дифтероиды, псевдодифтерийные бактерии, микрококки, нейссерии, эпидермальный стафилококк, негемолитические и бетагемолитические стрептококки. К факультативным обитателям носа относят золотистый стафилококк, стрептококк пневмонии, клебсиелла пневмонии, бранхамеллу, вейлонеллы, бактероиды, анаэробные кокки, актиномицеты, трепонема, микоплазмы. при заболеваниях носа, особенно хронических, а также развитии десмикробиоза в полостях носа и околоносовых пазух в больших количествах появляются кишечная палочка, протей, псевдомонада, что увеличивает риск развития бронхолегочных заболеваний. Микрофлора носоглотки в качественном отношении близка к микрофлоре носа, а ротоглотки - к микрофлоре полости рта. Некоторые из представителей микрофлоры носа и носоглотки обнаруживаются в гортани, трахее и крупных бронхах, но в относительно небольшом количестве. Из внешней среды в бронхи заносятся эпидермальный и золотистый стафилококки, пиогенный и пневмонийный стрептококки, клебсиелла пневмонии и реже другие грамотрицательные бактерии.

Занос условно-патогенных микробов в дыхательные пути не обязательно ведёт за собой развитие инфекции. У здоровых людей бронхи обладают выраженной способностью к самоочищению от микробов и чужеродных частиц, которое осуществляется кооперативным действием системы мукоцилиарного клиренса, альвеолярными и бронхиальными макрофагами, лизоцимом, секреторным иммуноглобулином А, комплементом,

лимфоидным аппаратом слизистых оболочек и перибронхиальных лимфатических узлов. Кроме того, слизистая оболочка дыхательных путей обладает выраженными барьерными свойствами против условно-патогенных микробов. Поэтому для возникновения инфекции необходимо попадание тем или иным путем высокой инфицирующей дозы возбудителя, нарушение целостности слизистой оболочки и снижение самоочищающей функции дыхательных путей. Повышают риск развития инфекций иммунодефицитные состояния, в том числе развивающиеся при СПИДе.

Этиологическая структура бронхолегочных заболеваний в значительной мере зависит от нозологической формы заболевания. Острые бронхиты в основном первоначально возникают как вирусные инфекции, вызванные обычно вирусами гриппа, парагриппа, пневмонии, адено- и риновирусами и др. Но в ряде случаев первичными этиологическими агентами могут быть стрептококк пневмонии, палочка инфлюэнцы и, возможно, другие бактерии. К вирусной инфекции в большинстве случаев вскоре присоединяются вторичная бактериальная, микоплазменная или реже грибковая инфекции, и процесс приобретает гнойно-воспалительный характер. В качестве вторичных инфекционных агентов чаще выступают стрептококк пневмонии, инфлюэнца-бактерия, золотистый и эпидермальный стафилококки, клебсиелла пневмонии, кишечная палочка.

Хронический бронхит, согласно современным данным, в начальной стадии с основным протекает как неинфекционное заболевание, которое в последующем по мере снижения самоочищающей функции бронхов и нарушения проходимости бронхов переходит в инфекционный процесс, вызванный разнообразными микробными ассоциациями. Ведущими сочленами ассоциаций являются стрептококк пневмонии, инфлюэнца-бактерия, золотистый и эпидермальный стафилококки. С большей или меньшей частотой в зависимости от целого ряда факторов совозбудителями хронического бронхита могут быть: кишечная палочка, клебсиелла пневмонии, протей, синегнойная бактерия, пиогенный стрептококк, бранхамелла, нейссерии, акинетобактерии, энтеробактер, бактероиды, фузобактерии, пептострептококки, кандиды и др. Количественный и качественный состав ассоциаций постоянно меняется. Если больной находится в больничном стационаре, то ведущее место в этиологии приобретают больничные штаммы условно-патогенных бактерий.

Абсцесс и гангрена легкого обычно являются осложнением острой и деструктивной пневмонии, острого и хронического, особенно гнойного, обструктивного бронхита. В этиологии абсцесса ведущее место занимают

гноеродные кокки (стафилококки, стрептококки) в ассоциации грамотрицательными бактериями (протей, кишечная палочка, инфлюэнца-бактерии, синегнойные бактерии), гангрены - анаэробные бактерии (бактероиды, пептострептококки, фузобактерии) в ассоциации с гноеродными кокками и грамотрицательными бактериями.

Эмпиема плевральной полости также чаще вызывается ассоциацией бактерий, среди которых ведущее место принадлежит анаэробным бактериям, гноеродным коккам, протее, синегнойным бактериям.

Острая пневмония чаще вызывается стрептококками пневмонии в монопопуляции или ассоциации с золотистым и эпидермальным стафилококками и грамотрицательными бактериями. Острые пневмонии у детей вызываются в 10 - 30% случаев респираторными вирусами и микоплазмами. Возбудителями тяжело протекающей пневмонии у детей в ряде вспышек является представитель простейших - *Pneumocysta carinii*, у взрослых - *Legionella pneumophilus* (болезнь легионеров).

Хроническая пневмония по сравнению с острой чаще имеет полимикробную этиологию, причем число ассоциаций и ассоциантов значительно больше. В основном это те же виды, которые встречаются при хроническом бронхите и острой пневмонии. Стрептококк пневмонии выделяется реже, а грамотрицательные бактерии и кандиды чаще, чем при острой пневмонии. По типу хронической пневмонии протекает заболевание, вызванное условно-патогенными микобактериями (легочный микобактериоз).

Структура возбудителей у больных острой и хронической пневмонией подвержена выраженным количественным и качественным изменениям.

### 3.0. ИНФЕКЦИЯ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ

Моча является объектом, наиболее часто предлагаемым для исследования на наличие микроорганизмов. При этом возникает множество проблем, связанных с правильным отбором проб, их транспортировкой, техники культивирования и интерпретацией полученных результатов.

Большая часть инфекций мочевого тракта локализована в мочевом пузыре и уретре. Из этих органов инфекция может подниматься по уретре (уретрит) и впоследствии поражать почки (пиелонефрит). Женщины наиболее склонны к инфицированию мочевого тракта, взятие у них проб мочи для исследования также представляет большие трудности.

Как у мужчин, так и у женщин инфекции мочевого тракта могут

протекать бессимптомно, остро или принимать хронический характер.

Бессимптомное течение может быть диагностировано при выделении культур микроорганизмов. Острое течение инфекционных процессов наиболее часто наблюдается у женщин всех возрастов. Такие пациенты, как правило, лечатся в условиях поликлиники и редко попадают в стационар.

Хронические инфекционные процессы как у женщин, так и у мужчин всех возрастов ассоциируются обычно с вызывающими их заболеваниями (например, пиелонефрит, простатиты или врожденные аномалии мочеполового тракта). Такие пациенты, как правило, лечатся в условиях стационара.

Бессимптомные, острые и хронические заболевания мочевого тракта являются совершенно различными состояниями, в связи с чем результаты лабораторного исследования мочи часто требуют различной интерпретации.

Бессимптомные пиелонефриты у женщин в течение определенного времени могут протекать нераспознанными и поддаются диагностике часто лишь при тщательном лабораторном исследовании большого количества мочи с выделением возбудителя.

На уроинфекции, по ориентировочным данным, приходится около 2% всех обращений к врачу. Среди них выделяют группы специфических и неспецифических (оппортунистических) инфекций. Специфические уроинфекции (гонорея, туберкулез, микобактериозы, актиномикоз, хламидиоз, микоплазма-инфекция) имеют специфических возбудителей и специфическую клиническую картину болезни. Такие общие инфекции, как бруцеллез, лептоспироз, сепсис, брюшной тиф сопровождаются выделением возбудителя с мочой - бактериоурией.

Оппортунистические уроинфекции различной этиологии протекают в виде гломерулонефрита, пиелонефрита, пиелита, околопочечных абсцессов, осложненной инфекцией почечнокаменной болезни, цистита, простатита, уретрита, послеоперационной инфекции, в том числе связанной с пересадкой почек. Течение перечисленных локальных инфекций нередко осложняется уретральной лихорадкой, уросепсисом и иногда бактериальным шоком. Длительное выделение с мочой больших количеств бактерий при отсутствии клинических проявлений обозначается как бессимптомная бактериурия.

**Этиология.** В дистальных отделах уретры и у краев входа в уретру в норме вегетируют *S. epidermidis*, *S. faecalis*, *Corynebacterium* sp., *E. coli*, *Proteus* sp., *Bacteroides* sp., *Treponema* sp. и др.

В выше расположенные отделы мочевой системы условно-патогенные бактерии проникают гематогенным путем, при травмах органов мочеполовой системы и т.д.

Особенно часты инфекции, вызываемые эшерихиями. Гемолизин *E. coli* действует на клеточные лизосомы, повышая их проницаемость. Такое неконтролируемое выделение энзимов нарушает функции клеток.

При наличии большого количества глюкозы в моче колибактерии и некоторые другие микроорганизмы вызывают ее распад с выделением газа ( $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ ).

Частыми возбудителями уроинфекции являются протеи. Первое место среди них занимает *Pr. mirabilis*, являющийся единственным индол-негативным микроорганизмом этой группы. Затем следуют *Pr. morgani*, *Pr. rettgeri*. Реже выделяют *Pr. vulgaris*.

Бактерии группы *Proteus* часто встречаются при так называемых осложненных формах пиелонефрита калькулезом, врожденными пороками развития, после хирургических операций. У этих больных прежде всего выделяют *E. coli*. Впоследствии по мере углубления и хронификации процесса в моче появляются протеи. Содержащаяся в протейх уреазы разлагает мочевины до аммиака. Аммиак токсичен для почек, вызывает некроз почечной ткани и образование микроабсцессов. Наступает инактивация комплемента, содержащегося хотя и в небольших количествах, в моче. Для бактерий предоставляется больше возможностей размножаться беспрепятственно в почечной ткани, то есть они более инвазивные.

Приведенные данные были недвусмысленно подтверждены появлением отрицательны к уреазе вариантов *Pr. mirabilis*. При одинаковом развитии вызванной протейами инфекции содержащие уреазу микроорганизмы вызывают гораздо более сильную интоксикацию и разрушение почечной ткани.

Кроме того в почках могут вегетировать:

*Providencia*. Вызываемые ими уроинфекции упорные, но в прогностическом отношении более благоприятные, так как эти бактерии не содержат энзимы уреазы.

Частыми возбудителями уроинфекций являются *Klebsiella*. Из мочи выделяют преимущественно *Kl. aerogenes*, *Kl. pneumoniae* и значительно реже другие микроорганизмы этой группы, например, *Kl. edwardsii*. Клебсиеллы характерны для хронических уроинфекций. На них трудно повлиять антибактериальными средствами, и поэтому эти микроорганизмы надолго задерживаются в моче, иногда годами. По-видимому, их токсическое

действие, особенно, если они не вызвали поражения паренхимы почек, сравнительно более слабое, что видно из функциональных исследований. Для их ликвидации необходимо проводить упорное комплексное лечение.

Похожими на клебсиелл являются микроорганизмы, относящиеся к группе *Enterobacter*, вызывающие уроинфекции с такой же характеристикой. Они встречаются немного реже клебсиелл.

Часто вызывает острые и хронические уроинфекции *Citrobacter*, которые по своему течению не отличаются от колиинфекций.

Особенное место среди возбудителей уроинфекций занимает *Pseudomonas aeruginosa* (*B. pyocyaneum*). Этот микроб выделяют из мочи преимущественно при хронических инфекциях. Предрасполагающими факторами для развития инфекции, вызываемой *Pr. aeruginosa*, являются калькулез, врожденные пороки развития, стойкие или повторяющиеся катетеризации, простатэктомии, литотрипсии. Характерно заражение в больничной обстановке. В урологических отделениях очень часто обнаруживают штаммы, которые вводятся в мочевого пузырь инструментами. Ввиду сильной устойчивости их к антибиотикам и пониженных сопротивительных сил такие инфекции очень трудно ликвидируются и длятся месяцами, иногда и годами, медленно нарушая функцию почек.

Энтерококки (*Str. faecalis*) представляют собой не очень частые возбудители упорных, но более благоприятно протекающих уроинфекций. Рекомендуется исследовать мочу 2-3 раза подряд, прежде чем подтвердить несомненность находки.

Энтерококки, зеленюющие стрептококки и другие стрептококки, в том числе и анаэробные, вызывают заболевания в паренхиме почек гематогенным путем как следствие эндокардита, сепсиса или другого типа инфекции.

Из мочи при тонзиллитах, фарингитах, скарлатине и других стрептококковых инфекциях изолируют *Streptococcus pyogenes*.

Ясно определенными и доказанными являются кандидозы почек, развившиеся как следствие вызванного кандидами сепсиса. Он наблюдается редко при кандидозном эндокардите, кандидозной бронхопневмонии, генерализованном слизисто-кожном кандидозе.

Урокандидоз может развиваться и у больных с сильно пониженными защитными силами вследствие тяжелого основного заболевания (лейкемия, неоплазмы, диабет), связанного с длительным постельным режимом, иммобилизацией, катетеризацией. Усиленное лечение антибиотиками, иммуносупрессивными и другими средствами, с целью вывести больных из тяжелого состояния, может косвенным путем вызвать развитие кандидоза.

Считается, что наличие 1000 кандидозных клеток в 1 мл мочи показательно для кандидозной инфекции, но при условии, что эта находка обнаружена несколько раз подряд. Неправильно считать, что выделение кандид вообще показательно для урокандидоза.

Заболевания, вызываемые плесневыми грибами (преимущественно аспергиллами), следует иметь в виду. Микроорганизм развивается в интерстиции почки или как клубок мицелиев в почечной лоханке. Нескольkokратное выделение одного и того же плесневого грибка у тяжело больных создает реальное подозрение на наличие уромикоза. Диагноз часто подтверждается при вскрытии почечной лоханки.

#### 4.0. БАКТЕРИОЛОГИЯ ПИЩЕВАРИТЕЛЬНОГО ТРАКТА

В нормальных условиях пищеварительный тракт можно рассматривать как сбалансированную экосистему, внутри которой существуют множественные полезные для хозяина связи между микроорганизмами.

Согласно современной экологической теории, в каждой экосистеме определяются среда обитания и экологическая «ячейка».

Среда обитания заселена стабильными сообществами аутохтонных микробных видов. Каждый из них занимает определенное место и тем самым вносит вклад в структуру всей системы. Видовой состав этих сообществ довольно постоянен во времени. В период развития человека его желудочно-кишечный тракт заселяется рядом различных бактериальных видов.

Индигенная аэробная и анаэробная микрофлора формирует в кишечнике человека естественный барьер бактериальной защиты, называемый колонизационной резистентностью. Ведущая роль в создании механизмов колонизационной резистентности принадлежит преобладающим в норме бифидум- и лактобактериям, а также эшерихиям. Число микроорганизмов в толстой кишке позвоночных достигает  $10^{10}$ - $10^{11}$  на грамм кишечного содержимого, а в тонкой кишке их число значительно меньше, в тощей и подвздошной кишке человека число микроорганизмов может доходить до  $10^8$ , хотя обычно их меньше. Эти микроорганизмы создают колонизационную резистентность благодаря интерференции микробной активности и созданию у хозяина иммунореактивности к различным видам патогенных агентов, индуцируя выработку естественных антител, которые дают перекрестную реакцию с антигенами возбудителей инфекции.

В любой среде обитания часто обнаруживаются аллохтонные микроорганизмы, однако они мало влияют на структуру экосистемы, что же касается пищеварительного тракта, то они могут поступать с пищей, водой или из других отделов пищеварительной трубки. Инородные микроорганизмы колонизируют определенный участок, если отсутствует какой-либо представитель аутохтонной микрофлоры, однако такое явление наблюдается только при разрушении экосистемы. С одной стороны, патогенные микроорганизмы могут таким образом временно заселять часть пищеварительного тракта, а с другой стороны, некоторые из них являются аутохтонными по отношению к пищеварительной системе и нормально сосуществуют с хозяином. Такие микробы становятся патогенными тогда, когда экосистема разрушается и микробы освобождаются от действия факторов, регулирующих их число и локализацию. Примером тому могут служить пролиферация микроорганизмов в тонкой кишке человека и образование абсцессов, когда кишечная флора получает доступ к парентеральным тканям.

Общепризнано, что число микроорганизмов в тонкой кишке человека относительно невелико: 10<sup>4</sup> на грамм ткани. Количественные и качественные характеристики микрофлоры тонкой кишки, по данным разных авторов, весьма различны, но эти различия можно объяснить особенностями получения материала для исследования и методов культивирования. Большинство исследователей согласны с тем, что в верхней и средней части тонкой кишки содержатся только небольшие популяции преимущественно грамположительных факультативных аэробов в сочетании с малым числом анаэробов, дрожжей и грибов. Число микроорганизмов умеренно увеличивается после приема пищи, но через несколько часов возвращается к исходному уровню.

Большое разнообразие видов анаэробов характеризует содержимое кишечника после илеоцекального клапана. Из испражнений можно вырастить примерно 10<sup>11</sup> микроорганизмов. В толстой кишке различные типы флоры взаимосвязаны со слизистой оболочкой. Преобладающими микроорганизмами в фекалиях являются не кишечные, а бесспорные анаэробные микробы.

Среди анаэробных бактерий доминируют кишечные палочки и различные виды энтерококков. Их количество в 1 грамме материала колеблется от 10<sup>6</sup> до 10<sup>12</sup> микробных клеток. Из других бактерий регулярно обнаруживаются лактобациллы (10<sup>6</sup>-10<sup>10</sup>), дрожжеподобные грибы (10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup>), стафилококки (10<sup>2</sup>-10<sup>5</sup>).

Разноречивость данных о превалировании аэробной или анаэробной микрофлоры обусловлена применением неадекватных методик для выращивания этих микробов. Рост кишечной палочки, высеянной на плотную среду (содержащую, кроме того, ингибиторы ее размножения), нельзя сравнить с интенсивным размножением анаэробов в среде Блаурокка.

При посеве фекалий на эту среду рост кишечной палочки во много раз превышал их рост на чашках с плотной средой. Спор по поводу превалирования тех или иных микробных видов в кишечнике несущественен и потому, что в жизнедеятельности макроорганизма имеют значение не только отдельные виды, но и ассоциации - симбиоз разных микробов.

Количественный и качественный состав кишечной микрофлоры в значительной мере определяется возрастом и характером питания человека. Микробы в меконии обнаруживаются бактериоскопически со второй половины первых суток жизни.

Сначала появляется кокковая флора. Количество бактерий в это время еще крайне мало. С конца первых суток жизни и в течение вторых суток в меконии преобладают крупные грамположительные палочки, в последующие дни с ясно видимыми спорами, а с третьих суток - бифидумбактерии. В небольшом количестве определяются и кишечные палочки. К 6-му дню высеваемость падает от 10-15%, а на 7-й день она уже не выделяется. Нормальная микрофлора устанавливается в кишечнике с пятого - шестого дня жизни, что совпадает с появлением стула типичного для грудного ребенка.

Флора кишечника у детей в возрасте 1 - 5,5 месяцев, находящихся на грудном вскармливании, представлена, в основном, бифидумбактериями, однако высеваются и кишечные палочки. Анаэробные гнилостные бактерии в этот период не обнаруживаются. При однократном прикорме ребенка в 5 - 6 месяцев с сохранением грудного вскармливания состав микрофлоры изменяется.

У детей в возрасте 9 - 11 месяцев при одно-двухразовом питании грудным молоком с преобладанием в рационе прикорма увеличивается содержание кишечных палочек, уменьшается количество бифидумбактерий. У детей этого возраста, не получавших грудного молока, кишечные палочки составляют 65-95% от общего количества микробов, выявляется энтерококк и крупные грамположительные бактерии. Общее количество микробов уже несколько больше, чем у детей, питающихся грудным молоком и прикормом. Для сохранения бифидумфлоры имеет значение количество получаемого ребенком женского молока: если оно

составляет не менее одну третью часть общего суточного рациона молока, то в кишечнике преобладает этот вид бактерий (табл.).

В старости происходят значительные изменения желудочно-кишечного тракта, которые выражаются в нарушениях состава и количества микробов, вплоть до полного их исчезновения, ослабевает ферментативная активность кишечной палочки, в ряде случаев наблюдается развитие гнилостной и гнойной флоры. При старении отмечается выраженное увеличение микробной флоры во всех отделах желудочно-кишечного тракта.

Таблица 4.

Характеристика микробных ассоциаций у детей раннего возраста  
в зависимости от алиментарного фактора и критерии  
дисбиотических отклонений  
(возраст - до года)

Группы	Эубиоз (Ig КОЕ/г)		Дисбиотические отклонения от нормы
	при грудном вскармливании	при искусственном вскармливании	
Анаэробная ассоциация 95 - 99%			
Общее количество анаэробов	9 - 10	8,5 - 10	ниже Ig 8,5
Бифидобактерии	9 - 10	8 - 9	Ig 7 и ниже
Бактероиды	7 - 8	8 - 9	Ig > 9 и Ig < 7
Клюстридии (сульфитредуцирующие)	отсутств. *	в отдельных случаях до Ig 3	Ig 3 и более
Аэробная ассоциация 1,5 - 5%			
Общее количество аэробов	7 - 8	7,5 - 8,5	Выше Ig 9
Лактобациллы	6 - 7,5	7 - 8	Ig 5 и ниже или сниженные кислотообразования
Киспечные палочки			
с типичными свойствами	7 - 8	7 - 8	Ig 8,5 и выше, Ig 6 и ниже
с измененными биологическими свойствами	отсутств.	не более 10%	20% и более
Стрептококки	6,5 - 7,5	7,5 - 8,5	гемолизующие штаммы
Энтерококки	5 - 7	7 - 8	доминирование в аэробной флоре
Общее количество	3 - 5	4 - 6	Ig 6,5 и выше

	флоре		
Общее количество стафилококков	3-5	4-6	Ig 6,5 и выше
Стафилококки, коагулирующие плазму	отсутств.	периодически до 1-3	Ig 4 и выше
Бактерии рода Proteus	отсутств.	До 1-3	Ig 4 и выше
Общее количества дрожжей и дрожжеподобных грибов	1-3,5	2-4	Ig 4 и выше
Грибы рода Candida	отсутств.	отсутств.	Ig 4 и выше

\* Не выявляется при посеве 1 мл разведения фекалий 1:10

Увеличение количества микроорганизмов у лиц пожилого и особенно старческого возраста происходит, в основном, за счет представителей гнилостной группы бактерий и носительства адаптированных штаммов, обладающих признаками патогенных и болезнетворных организмов.

Все это может способствовать появлению структурных изменений слизистых оболочек, снижению секреторной и ферментативной функций желудка и кишечника.

В условиях неизменной структуры щеточной каймы бактерии не могут попасть в зону мембранного пищеварения, так как их размеры больше, чем ультрапоры щеточной каймы. В результате этого мембранный гидролиз протекает в совершенно стерильных условиях, что предупреждает потерю конечных продуктов гидролиза питательных веществ из-за воздействия микроорганизмов.

При старении из-за ультраструктурных изменений щеточной каймы создаются более благоприятные условия для питания бактерий, так как появляется свободный доступ бактерий к таким продуктам гидролиза, как аминокислоты, моноокислоты, моносахароза и прочие. Безусловно, это один из моментов, способствующих увеличению в старости количества микроорганизмов в кишечнике.

С этих позиций не вызывает удивления тот факт, что при старении пищевые перегрузки способны переводит кишечную флору из состояния эубиоза в дисбиоз.

Из причин, ведущих к увеличению числа микроорганизмов в желудочно-кишечном тракте, следует также указать на возрастное снижение

секреторной функции слюнных желез, желудка, печени и кишечника, секрет которых обладает бактерицидным действием. Кроме того, при снижении секреторной функции органов пищеварения в полости кишки увеличивается количество продуктов неполного гидролиза, которые также способствуют размножению микроорганизмов.

Нормальная микрофлора кишечника, по мнению большинства исследователей, сложилась эволюционным путем, как результат взаимного действия множества факторов, связанных с воздействием внешней среды и состоянием микроорганизма, а также в зависимости от взаимоотношений различных видов микробов, входящих в биоценоз.

Эволюция отобрала и определила круг видов микробов, заселивших организм. Исследованиями последних лет убедительно установлено, что флора кишечного содержимого здорового человека имеет статистическую норму (в качественном и количественном отношении).

Таблица 5

Основной состав нормальной фекальной микрофлоры  
взрослого человека

Виды бактерий	Количество микробов в 1 г испражнений	Частота обнаружения в %
<u>Облигатная микрофлора</u>		
<u>Анаэробы:</u>		
Бифидобактерии	$10^7 - 10^9$	98 – 100%
Бактероиды	$10^7 - 10^9$	87 – 100%
Катенабактерии	$10^5 - 10^7$	нет данных
различные споровые бактерии	$10^3 - 10^5$	88 – 100%
<u>Аэробы:</u>		
Кишечная палочка	$10^6 - 10^7$	100%
Лактобактерии	$10^6 - 10^7$	91 – 100%
Энтерококки	$10^5 - 10^7$	95 – 100%
<u>Факультативная флора</u>		
Стафилококки	$0 - 10^3$	12 – 68%
Псевдомонады	$0 - 10^{98}$	20%
Клостридии	$0 - 10^4$	20 – 98%
Вейлонеллы	$10^4 - 10^6$	нет данных
Дрожжеподобные грибы	$0 - 10^2$	28 – 53%

Состояние равновесия хозяина с микрофлорой носит название зубиоза, а состояние, при котором микрофлора меняется, активизируется и тем самым ведет к нарушению равновесия, называется (в противоположность зубиозу) дисбактериозом. Термин «дисбактериоз» не новый. Он существует с 1915 года и предложен Ниссле. Дисбактериозу авторы в разное время давали разные характеристики. Определением «дисбактериоз» обозначалось уменьшение или полное исчезновение из состава кишечной микрофлоры «типичных», полноценных кишечных палочек и превалирование так называемых «малоактивных» (лактозоотрицательных) энтеробактерий. Под «типичными» понимались лактозоположительные эшерихии, обладающие антагонистическими свойствами в отношении патогенных бактериальных видов.

В дальнейшем параллельно с этими признаками стали учитывать наличие в кишечной флоре микроорганизмов, имеющих гноеродные и протеолитические свойства.

После признания большинством микробиологов доминантного положения в составе нормальной кишечной микрофлоры бифидобактерий стали относить к неблагоприятным признакам их элиминирование и, параллельно с этим, нарастание количества анаэробных видов, которые нередко занимают доминантное положение. Возникновение подобных сдвигов ведет к снижению защитной роли флоры, к извращению ее физиологической функции. Позднее одним из признаков дисбактериоза стали считать увеличение количества бактероидов. Наличие у многих видов бактероидов протеолитических свойств и установление факта их этиологической роли при ряде гнойно-воспалительных процессов подтверждает эту гипотезу.

При дисбактериозе патологические сдвиги в кишечной флоре могут охватить все основные группы. В первую очередь, они касаются облигатных для толстой кишки представителей, ответственных за «благополучие» в микробном ценозе, а затем - и факультативных для кишечника видов.

Эти соотношения изменяются либо в результате нарушения баланса аутофлоры, либо вследствие какого-либо препятствия для физиологического ее функционирования.

В понятие «дисбактериоз» также входит заселение факультативными бактериями тех отделов пищеварительного тракта, в которых они обычно не встречаются: в желудке, желчном пузыре, тонкой кишке.

Одной из причин нарушения симбионтного равновесия и развития дисбактериоза считают голод и неполноценное питание. Голодание влияет

на кишечный биоценоз путем нарушения функций органов пищеварения и сопротивляемости организма.

К дисбактериозу могут привести секреторные расстройства, например, при ахлоргидрии создаются условия для миграции кишечной палочки по всему желудочно-кишечному тракту. Поэтому дисбактериоз сопутствует гастриту с пониженной секретцией.

Нарушению симбионтного равновесия и переходу последнего в дисбактериоз благоприятствуют различные виды расстройств пищеварения. К наиболее частым причинам можно отнести недостаточность ферментов, нефизиологические продукты расщепления и бактериальные токсины, изменяющие функцию кишечной стенки и прилегающих желез, а также содержимого толстой кишки.

Дисбактериоз описан при многих патологических состояниях. В литературе имеются сведения о наличии дисбактериоза при некоторых соматических и инфекционных заболеваниях, при злокачественных новообразованиях, лучевой болезни, хирургических вмешательствах, особенно при операциях на брюшной полости.

Современный лечебный режим, при котором используют прогрессивные методы химиотерапии и постоянно развивающаяся медицинская техника способствовали увеличению продолжительности жизни хронических больных. Однако эффективность терапевтического применения антибиотиков привела к широкому использованию их без достаточных оснований как по назначению врача, так и путем самолечения.

Биологическая сущность дисбактериоза определяется характером качественных и количественных изменений в видовом составе ассоциации («микробный пейзаж»). Дисбактериоз чаще характеризуется резким уменьшением общего количества микробов, вплоть до полного исчезновения отдельных видов нормальной микрофлоры наряду с периодическим или длительным доминированием видов, в норме представленных минимальным количеством особей, иногда совсем не выявляемых стандартными методами бактериологического исследования.

Наиболее остро выражен и полнее других изучен дисбактериоз, развивающийся в кишечнике человека и животных на фоне ослабления неспецифических защитных сил и общего тонуса макроорганизма. В этих условиях происходит преимущественное размножение условно-патогенных микроорганизмов, постоянно обитающих в организме человека и животных, а возможно, и заново формирующихся типов этих представителей. К последним часто относятся представители рода

эшерихий, у которых наблюдаются широкие штаммовые различия - от позитивнополноценных комменсалов до патогенных, вызывающих тяжелые формы диспепсии. Преобладающими при дисбактериозе часто оказываются микроорганизмы, резистентные к широко применяемым антибиотикам или лекарственным веществам, способные распространяться в популяции близкородственных ассоциаций. В тех же условиях могут приобретать преимущественное распространение и гнилостные микробы, кокковые формы, вызывающие гнойные воспалительные процессы, синегнойные бактерии, часто являющиеся причиной послеоперационных осложнений, грибковая микрофлора, чаще с преобладанием дрожжеподобных грибов.

Схематическое развитие дисбактериоза И.Ф. Билибин представляет в виде следующих фаз.

Первая фаза - значительное уменьшение числа нормальных симбионтов в естественных местах их обитания. Вторая фаза - исчезновение некоторых симбионтов и увеличение содержания других, а также представителей микрофлоры, в норме вегетирующих в весьма скудном количестве или совсем не встречающихся. Третья фаза - появление аутофлоры в полостях, органах и тканях, в которых она обычно не встречается (например, кишечная палочка в желчных путях, пузыре или дрожжеподобные грибы в моче, кокковые формы в крови и т.п.), сопровождающиеся изменением токсигенности, вирулентности и патогенности отдельных представителей нормальных симбионтов, либо их ассоциаций.

На основании данных литературы и собственных наблюдений дисбактериоз классифицируется нами по этиологическому признаку:

#### *I. Дисбактериоз у практически здоровых лиц:*

- 1) возрастной;
- 2) сезонный;
- 3) пищевой;
- 4) профессиональный.

#### *II. Дисбактериоз у больных при:*

- 1) заболеваниях желудочно-кишечного тракта неинфекционной природы;
- 2) болезнях печени;
- 3) инфекционных и паразитарных заболеваниях желудочно-кишечного тракта;
- 4) атеросклерозе;
- 5) злокачественных новообразованиях.

### *III. Дисбактериоз медикаментозный.*

### *IV. Дисбактериоз после воздействия радиоактивных веществ.*

### *V. Дисбактериоз смешанный.*

Дисбактериоз - неспецифическое явление, которое имеет одну динамику развития от нормальной флоры через одновидовой дисбактериоз к ассоциативному. Наличие дисбактериоза не ведет непременно сразу к выраженным патологическим состояниям и может протекать бессимптомно.

Для клиницистов представляет интерес не факт констатации дисбактериоза, а его клинические проявления. Они преимущественно неспецифичны, так как к возникновению их может привести сложный комплекс патологических изменений. Клиника дисбактериоза определяется симптомами выпадения симбиотных свойств микрофлоры кишечника, нарушения обмена веществ макроорганизма, вызванными снижением реактивных и защитных сил организма, а также заболеванием, на фоне которого развился дисбактериоз. Клиническая картина дисбактериоза зависит от его формы и микробиологического варианта.

Не всегда клинические симптомы дисбактериоза обнаруживаются у больных. Так, у практически здоровых людей иногда можно наблюдать микробиологические признаки его при смене питания, климатических условий, переутомления. Такой дисбактериоз может исчезнуть, не проявившись клинически. Его признаки отмечаются, если действие повреждающих агентов продолжается.

Часто нарушение микрофлоры бывает пусковым моментом для развития хронического воспалительного процесса в кишечном тракте. Возникшее заболевание, меняя условия существования микроорганизмов кишечника, ведет к развитию новых проявлений. В других случаях, например, у больных с резецированным желудком, он возникает вторично. Наличие дисбактериоза при ряде заболеваний затрудняет решение, какая патология первична.

Итак, система пищеварения является главной в обеспечении жизнедеятельности и гомеостаза организма. В сложном барьерном механизме пищеварительного тракта большую роль качественной характеристики микрофлоры играет нормальная микрофлора. Наибольший контакт с разнообразными антигенами имеют слизистые оболочки полости рта. Качественная и количественная характеристика микрофлоры пищеварительного тракта в целом зависит от многих действующих одновременно факторов.

Показано, что аэробная и анаэробная микрофлора формирует в кишечнике человека естественный барьер, называемый колонизационной резистентностью. Устойчивость к бактериальной колонизации отражает состояние нормальной микрофлоры, эпителиоцитов, антиадгезивную активность секретов слизистых оболочек и меняется при различных нарушениях гомеостаза.

## **5.0. СИСТЕМНЫЕ ИНФЕКЦИИ. БАКТЕРИЕМИЯ И СЕПСИС**

Бактериемия представляет собой фазу патогенеза общих и системных инфекционных заболеваний, выполняющую функцию передачи возбудителя другим хозяевам или переноса его в иные места локализации и выделения. На определенном этапе патогенеза возбудитель из первичного очага локализации проникает в кровь, циркулирует в ней определенный срок, значительная часть возбудителя гибнет, вызывая интоксикацию, остальные захватываются клетками лимфоидной и макрофагальной систем и уничтожаются или персистируют в них. Размножение возбудителя в крови не происходит, поскольку кровь сохраняет свои антимикробные свойства.

Фаза бактериемии закономерна при заболеваниях, передающихся кровососущими насекомыми (например, сыпном и возвратном тифах, малярии) и с помощью иных механизмов (брюшном тифе, лептоспирозе, бруцеллезе, листериозе, менингококковой инфекции). Она нередко осложняет течение тяжелых форм инфекций, вызываемых условно-патогенными микробами. В этих случаях бактериемия часто переходит в сепсис.

Кратковременная (транзиторная) бактериемия возможна при голодании, переутомлении, перегревании, переохлаждении, травмах, некоторых медицинских вмешательствах (при удалении зубов, абортах, оперативных вмешательствах на инфицированных органах, иммуносупрессивной терапии и др.).

Сепсис - это тяжелое генерализованное самостоятельное острое или хроническое, инфекционное заболевание крови, обычно развивающееся на фоне глубокого иммунодефицита или сенсбилизации организма к антигенам возбудителя. Единственным или главным местом обитания и размножения возбудителя при сепсисе является кровь. Для 80-х - 90-х годов характерно нарастание заболеваемости сепсисом и утяжеление его течения,

что связывают с увеличением среди стационарных больных лиц с иммунодефицитами, широким распространением больничных штаммов условно-патогенных микробов и другими причинами, обусловившими рост числа оппортунистических инфекций. Выделяют две формы сепсиса: септицемию и септикопиемию.

При септицемии (первичном сепсисе) возбудитель сразу из входных ворот проникает в кровь, размножается в ней и вызывает сепсис. Первичный локальный очаг воспаления отсутствует, вторичные метастатические очаги нередко развиваются. Септикопиемия (вторичный, метастатический сепсис) возникает в результате генерализации локального инфекционного процесса. В зависимости от первичного локального очага, течение которого осложнилось сепсисом, выделяют раневой, послеродовой, пупочный, урогенный, стоматогенный, отогенный, ожоговый, генитальный и другие формы сепсиса. Сепсис часто развивается при тяжелых формах перитонита, менингита, при политравмах с шоком и большой потерей крови, при инфекционных процессах у новорожденных, у пожилых людей, у больных болезнями крови, декомпенсированными формами диабета, СПИДом, в предмортальный период многих болезней. Широко используются в учении о сепсисе понятия хирургический, внутрибольничный, острый и хронический сепсис.

Для сепсиса в отличие от бактериемии характерны утрата кровью антимикробных свойств и, как следствие этого, размножение возбудителя в крови, сочетание признаков инфекции, микробной интоксикации и повышенной реактивности организма, характерная температурная кривая, склонность к образованию вторичных очагов инфекции, геморрагический синдром, потеря веса, тахикардия, отсутствие склонности к самовыздоровлению и положительной динамики в первичном очаге. Исход сепсиса тяжелый. Средняя летальность при хирургической форме сепсиса составляет 30 - 40%, а при микробном, ятрогенном, абдоминальном сепсисе и сепсисе у новорожденных почти в 2 раза выше. По литературным данным, в России ежегодно умирают от сепсиса больше людей, чем от всех вместе взятых инфекционных болезней.

Этиология. Сепсис относится к полиэтиологичным заболеваниям. Ранее главным возбудителем сепсиса был *S. pyogenes*. В настоящее время в этиологии большинства форм сепсиса ведущее место занимают *S. epidermidis* и *S. aureus*, далее следует *E. coli*, *Proteus sp.*, *K. pneumoniae* и другие условно-патогенные виды энтеробактерий, *P. aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *pneumoniae*, *faecalis*, *Bacteroides sp.*, *Acinetobacter sp.*,

*Candida albicans*. Описаны случаи сепсиса, вызванные многими другими видами условно-патогенных микробов. Обычно сепсис вызывается каким-либо одним видом микроба, но примерно в 7 - 10 % случаев его причиной является ассоциация из двух и даже трех возбудителей.

Этиологическая структура септикопиемии в значительной мере отражает структуру возбудителей первичных очагов воспаления, которые осложнились сепсисом. Например, раневой сепсис чаще вызывается стафилококками, урогенный - грамотрицательными бактериями, стоматогенный - аспорогенными анаэробами, ожоговый - синегнойными бактериями.

Таблица 6.

Основные возбудители бактериемией

Синдром	Возбудители
1	2
Бактериemia, возникшая в связи с внесосудистой инфекцией	<i>Haemophilus influenzae</i> (-) A <i>Neisseria</i> spp. (-) A <i>Streptococcus</i> spp. (+) A <i>Brucella</i> spp. (-) A <i>Salmonella</i> spp. (-) A <i>Listeria</i> spp. (+) A <i>Staphylococcus aureus</i> (+) A <i>Leptospira interrogans</i> <i>Pseudomonas</i> spp. (-) A <i>Bacteroides</i> spp. (-) A <i>Clostridium</i> spp. (+) An <i>Peptostreptococcus</i> spp. (+) An <i>Borrelia</i> spp. <i>Acinetobacter</i> spp. (-) A <i>Shigella</i> spp. (-) A <i>Pasteurella multocida</i> (-) A <i>Campylobacter jejuni</i> (-) A <i>Corynebacterium diphtheriae</i> (+) A <i>Bordetella pertussis</i> (-) A <i>Mycobacterium</i> spp. <i>Legionella</i> spp. (-) A <i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Cardiobacterium</i> spp. (-) A <i>Aeromonas hydrophila</i> (-) A
Бактериemia, связанная с катетеризацией вен	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (+) A <i>Staphylococcus aureus</i> (+) A <i>Escherichia</i> spp. (-) A <i>Salmonella</i> spp. (-) A <i>Proteus</i> spp. (-) A <i>Serratia</i> spp. (-) A <i>Pseudomonas</i> spp. (-) A <i>Candida</i> spp.

Возбудители «первичных» септицемий у взрослых

*Neisseria gonorrhoeae* (-) A  
*Staphylococcus aureus* (+) A  
*Streptococcus pneumoniae* (+) A  
*Streptococcus pyogenes* (группы А-І) (+) A  
*Salmonella* spp. (-) A (кроме *S. typhi* и *S. paratyphi*)  
*Streptococcus faecalis* (+) A  
*Neisseria meningitidis* (-) A  
*Listeria monocytogenes* (+) A  
*Escherichia coli* (-) A  
*Pseudomonas* spp. (-) A  
*Klebsiella* spp. (-) A  
*Serratia* spp. (-) A  
*Bacteroides fragilis* (-) АН  
*Vibrio vulnificus* (-) A  
*Candida* spp.  
*Aspergillus* spp.  
*Mucor* spp.  
*Cryptococcus* spp.  
*Histoplasma* spp.  
*Sporothrix* spp.

## 6.0. АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫЕ СРЕДСТВА.

### 6.1. Ограничение жизнедеятельности бактерий.

Подавление роста или уничтожение патогенных бактерий осуществляют с помощью различных химических, физических факторов. Они оказывают **неизбирательное** (используются для обеззараживания помещений, бытовых предметов и медицинского инструментария и т.д.) или **избирательное** (применяются в качестве химиотерапевтических средств) **противомикробное действие**. Основу профилактики и борьбы с инфекциями составляют методы прямого (непосредственного) и косвенного (опосредованного) воздействия. Прямые методы включают комплекс физических и химических воздействий, направленных на уничтожение патогенов с помощью непосредственно повреждающих воздействий. В частности, **дезинфекция** может значительно уменьшить число патогенных микроорганизмов на объектах внешней среды, а **стерилизация** – полностью их элиминировать. Дезинфекцию можно проводить постоянно, с определенной периодичностью (**профилактическая дезинфекция**) либо при возникновении инфекционного заболевания или подозрении на него (**очаговая дезинфекция**).

### 6.2. Физические методы.

**Термическая обработка.** Имеется множество вариантов, но термическая обработка применима лишь в отношении термоустойчивых материалов. Наиболее простые и доступные методы – **прокаливание** и **кипячение**.

**Пастеризация.** Метод позволяет эффективно уничтожать микроорганизмы при 71,7 °С в течение 15 сек. с последующим быстрым охлаждением (**быстрая пастеризация**). Медленная пастеризация подразумевает более длительную экспозицию (30 мин.) при 60 °С. Не все микроорганизмы чувствительны к подобным воздействиям, однако пастеризацию широко применяют при обработке пищевых продуктов.

**Стерилизация сухим жаром.** Проводят в сухожаровых шкафах при 160 °С в течение 2 ч.; метод позволяет эффективно уничтожать не только вегетирующие клетки (погибают в течение нескольких минут), но

и споры микроорганизмов (необходима экспозиция в течение 2 ч.). Подобные воздействия разрушают структуру большинства органических соединений и ведут к значительному испарению жидкостей.

**Стерилизация паром под давлением (автоклавирувание)** включает обработку влажным паром (121 °С) под давлением (1,2-1,5 атм.); наиболее эффективен этот метод стерилизации жидкостей, содержащих споры микроорганизмов, которые погибают за 15 мин. Обработка значительных объемов (более 50 мл.) требует более длительной экспозиции. В бактериологических лабораториях для этих целей используют автоклавы. Текущий пар нельзя применять для стерилизации сред, содержащих углеводы, молоко и желатин.

**Стерилизация текучим паром** – при температуре 100 °С применяется в тех случаях, когда материал не выдерживает более высокой температуры (например, питательные среды с витаминами, углеводами, желатином и др.). Стерилизацию текучим паром проводят в автоклаве при открытом выпускном кране и незакрученной крышке или в аппаратах Коха.

**Тиндаллизация** – метод дробной стерилизации при низких температурах (предложен Тинделл) – включает ежедневное прогревание сред при 56-58 °С в течение 5-6 сут.; основан на поочередном уничтожении вегетативных клеток и проросших спор. Основной недостаток – невозможность полной элиминации микроорганизмов, т.к. некоторые споры не успевают прорасти в указанных временных интервалах, а некоторые вегетативные клетки успевают образовать термостабильные споры. Метод используют для стерилизации сыворотки асцитической жидкости и т.д.

**Облучение электромагнитными волнами** разной длины используют для дезинфекции, а также стерилизации термолabileльных материалов.

**Ультрафиолетовые (УФ) лучи** (в первую очередь длиной 250 и 270 нм) воздействуют на нуклеиновые кислоты. Микробицидное действие основано на разрыве водородных связей и образовании димеров тимина в молекуле ДНК, что приводит к появлению нежизнеспособных мутантов. Применение УФО для стерилизации ограничено его низкой проникаемостью и высокой поглотительной активностью воды и стекла.

**Гамма и рентгеновское излучение** эффективно используется для стерилизации большинства материалов, но требует строгого соблюдения правил безопасности. Облучение вызывает образование свободных радикалов, денатурирующих нуклеиновые кислоты и белки, что приводит к гибели клетки. Метод широко используют для стерилизации пластмасс,

перспективно применение для стерилизации пищевых продуктов.

**Микроволновое излучение** используют для быстрой повторной стерилизации длительно хранящихся сред. Стерилизующий эффект достигается за счет быстрого подъема температуры.

Деполяризацию органоидов микробных клеток и денатурацию составляющих их молекул вызывает **ультразвук** (в результате местного нагревания).

**Стерилизация фильтрованием** через различные природные (например, каолин, инфузорная земля) или искусственные материалы, обеспечивающая эффективную элиминацию бактерий и эукариотических микроорганизмов в жидкостях и газах.

Мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 нкм эффективно задерживают бактерии, но не вирусы, а поэтому не обеспечивают полной стерилизации жидкостей и газов.

На практике широкое применение метода фильтрации ограничивается вязкостью различных жидкостей, определяющей скорость их прохождения через фильтры.

### **6.3. Химические методы.**

Данные методы подавления жизнедеятельности микроорганизмов включают: 1) применение дезинфектантов и антисептиков, дающих неспецифический бактерицидный эффект; 2) использование антибиотиков и синтетических антимикробных препаратов, проявляющих избирательное противомикробное действие.

**Химические средства неспецифического действия**, применяемые для обработки помещений, оборудования и различных предметов, обозначают термином “**дезинфектанты**”, а вещества используемые для обработки живых тканей, - “**антисептики**”. Дезинфицирующие средства оказывают в используемых концентрациях бактерицидное действие, а антисептики в зависимости от концентрации – бактериостатическое или бактерицидное. Подобные препараты обычно действуют быстро.

**Хлоргексидина биглюконат** (гибитан) выпускается в виде 20% водного раствора; обладает сильным бактерицидным свойством, сохраняющимся в присутствии крови, гнойного отделяемого. Для обработки операционного поля, также для стерилизации инструментов (в течение 5 мин.) применяют 0,5% водно-спиртовой раствор, для обработки

ран, ожогов - 0,5% водный раствор, для дезинфекции рук - 0,5% спиртовой или 1% водный раствор. Для дезинфекции помещений и оборудования применяют 0,1% водный раствор. 0,05% раствор в специальной упаковке из полимерного материала по 100 мл применяют для индивидуальной профилактики венерических заболеваний. Мазь "Сибикорт" (содержит 1% хлоргексидина и 1% гидрокортизона) применяют при экземе, дерматитах в качестве противовоспалительного и антибактериального средства.

Альдегиды алкилируют amino-, сульфгидрильные и карбоксильные группы белков и более низкомолекулярных органических соединений, вызывая гибель микроорганизмов. Их широко используют как консерванты. Наиболее известные - формальдегид (8%) и глутаровый альдегид (2-2,5%) - проявляют раздражающее действие (особенно пары), что ограничивают их широкое применение.

Раствор формальдегида обладает дезинфицирующим и дезодорирующим свойствами. Применяют для мытья рук, дезинфекции инструментов, спринцеваний, обработки кожи ног при повышенной потливости. Входит в состав препаратов: формидрон, мазь формалиновая.

Лизоформ - мыльный раствор формальдегида. Применяют для спринцеваний в гинекологической практике, для дезинфекции рук и помещений.

Гексаметилентетрамин в кислой среде организма расщепляется с выделением формальдегида, который, выделяясь с мочой, оказывает антисептическое действие. Применяют при инфекционных процессах мочевыводящих и желчевыводящих путей, кожных заболеваниях. Входит в состав комбинированных препаратов: кальцекс, уробесал.

Циминаль применяют для лечения пиодермии, трофических язв, ожогов, ран, как дополнительное средство при лечении ран, инфицированных *Pseudomonas aeruginosa*.

Цимизоль - аэрозольный препарат, применяемый для лечения гнойных кожных заболеваний, трофических язв, ожогов, пролежней. Оказывает также обезболивающее действие.

Цидипол активен в отношении *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*. Применяют для индивидуальной профилактики венерических заболеваний после случайных половых связей; препарат вводят в уретру и обрабатывают кожу гениталий. Противопоказан при острых заболеваниях уретры и половых органов.

#### 6.4. Кислоты и щелочи.

**Борная кислота** обладает антисептической активностью. Наносят в виде растворов или порошка на кожу и слизистые оболочки, однако хорошо всасывание препарата и медленное выведение из организма ограничивают его применение.

**Бензойная кислота** оказывает противомикробное и фунгицидное действие и применяется в качестве антисептика, а также в качестве пищевого консерванта (0,1% раствор).

**Уксусная кислота** в виде 0,25-2% раствора находит применение как антисептик для обработки наружного уха и орошения нижних отделов мочевыводящих путей; особенно активна в отношении аэробных грамотрицательных бактерий (например, *Pseudomonas*).

**Салициловая кислота** – антисептик, применяемый в спиртовых растворах (1-2%), присыпках мазях, пастах (например, для лечения дерматомикозов в областях подверженных трению); оказывает также в зависимости от концентрации отвлекающее, раздражающее и кератолитическое действие.

К щелочам, кроме того, относится **раствор аммиака** (нашатырный спирт,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , содержит 9,5-10,5% аммиака). Относят к антисептикам из группы щелочей. Применяют для обработки рук хирурга (0,5% раствор).

#### 6.5. Тяжелые металлы.

Их антимикробный эффект основан на способности осаждать белки и прочие органические соединения. В качестве антисептиков широко используют нитрат серебра (ляпис), сульфат меди (медный купорос) и хромат ртути (мербромин). Не рекомендуют применять для дезинфекции соединения свинца, мышьяка и ртути, т.к. они способны аккумулироваться в организме человека.

**Ртути дихлорид** (сулема). Высокотоксичный препарат, всасывается через кожу. Иногда используют для дезинфекции белья, одежды, предметов ухода за больными, не применяют для обработки металлических предметов.

**Серебра нитрат** (ляпис). В небольших концентрациях обладает вяжущим и противовоспалительным свойствами, в высоких – прижигающим. Оказывает бактерицидное действие. Применяют при эрозиях, язвах, избыточных грануляциях, конъюнктивите, трахоме, гиперпластическом ларингите.

**Протаргол**. Содержит 7,8-8,3% серебра. Применяют для

смазывания слизистых оболочек верхних дыхательных путей, промывания уретры и мочевого пузыря, при конъюнктивите, блефарите, бленнорее.

**Колларгол.** Коллоидный раствор, содержащий 70% серебра. Применяют для промывания гнойных ран, уретры, мочевого пузыря.

**Меди сульфат** (медный купорос). Используют в виде 0,25% раствора для промывания при уретритах и вагинитах.

**Цинка окись.** Применяют в виде присыпок, мазей, паст как вяжущее, подсушивающее и дезинфицирующее средство при кожных заболеваниях.

**Свинцовый пластырь** (простой и сложный). Используют при гнойно-воспалительных заболеваниях кожи.

**Фенолы** и их замещенные производные широко применяют как дезинфектанты, в меньших концентрациях, как эффективные антисептики. Препараты денатурируют белки и нарушают структуру клеточной стенки. От применения непосредственно фенола отказались достаточно давно, но его производные (например, резорцин, хлорофен, тимол, салол) применяют сравнительно часто. Гексахлорофен наиболее активен в отношении стафилококков.

**Фенол** (карболовая кислота) применяют для дезинфекции помещений, дезинсекции. Легко всасывается через кожу и может вызвать токсические явления: головокружение, слабость, нарушение дыхания, коллапс.

**Трикрезол** применяют вместо фенола, а также для консервации инъекционных растворов.

**Резорцин** применяют при кожных заболеваниях (экзема, себорея, зуд, грибковые заболевания) в виде водных или спиртовых растворов, мазей.

**Катионные детергенты** оказывают бактерицидное действие, связанное с изменением проницаемости цитоплазматической мембраны. Их эффект уменьшает анионные поверхностно-активные вещества (следовательно, они не совместимы с мылами), низкие значения pH, некоторые органические соединения и ионы металлов. Катионные детергенты также адсорбируются в значительной степени пористыми и волокнистыми материалами. При нанесении на кожу они образуют пленку, под которой могут оставаться живые микроорганизмы.

**Циргель** применяют для обработки рук перед хирургическими операциями: наносят препарат на сухие руки и растирают по всей кожи кистей и нижней части предплечья. После высушивания на коже остается тонкая пленка, которую затем снимают этиловым спиртом.

Дегмицид используют в виде 1% раствора для обработки рук ( по 3 мин руки протирают 2 тампонами, смоченными раствором дегмицида) и операционного поля.

Этоний обладает бактерицидным и бактериостатическим свойствами, оказывает инактивирующее действие на экзотоксины стафилококка, местноанестезирующее действие, стимулирует заживление ран. Применяют при трофических язвах, трещинах сосков, зудящих дерматозах, язвах рогаговицы, кератитах.

Роккал применяют в качестве антисептика для обработки рук хирурга, операционного поля и ран, дезинфекции инструментов и помещений.

Газы как дезинфектанты известны с глубокой древности. В частности, двуокись серы широко использовали для обработки складов и предохранения пищевых продуктов еще в период античности. Не менее широкое распространение получила дератизация двуокисью серы. Для уничтожения спор микроорганизмов при стерилизации предметов из пластмасс используют окиси этилена и пропилена под давлением при 30-60°C. метод позволяет эффективно уничтожать большинство микроорганизмов, в том числе в тканях и жидкостях (кровь, гнойное отделяемое); механизм действия обусловлен способностью окиси этилена алкилировать белки, что приводит к блокаде реакционных групп промежуточных продуктов обмена. В частности, повреждению подвергаются сульфгидрильные группы вегетативных форм и карбоксильные группы оболочек спор.

В качестве антисептиков давно и эффективно применяют различные красители (например, бриллиантовый зеленый, метиленовый синий, риванол или основной фуксин).

**Метиленовый синий.** В виде 1-3% раствора применяют местно при ожогах, пиодермии, фолликулитах, в виде 0,2% раствора - для промывания мочевого пузыря.

**Бриллиантовый зеленый** используют при гнойных заболеваниях кожи. Входит в состав жидкости *Новикова*.

**Этакридина лактат** применяют для обработки ран (0,05-0,2% раствор), промывания плевральных и брюшной полостей, суставов, мочевого пузыря (0,05-0,1%), для промывания полости матки в после родовом периоде (0,1%), полоскания глотки (0,1%) и полости рта, смазывания слизистых оболочек (1%). Действие развивается медленно. Активен в отношении кокков.

## 6.6. Окислители.

Механизм антимикробной активности связан с окислением метаболитов и ферментов микроорганизмов либо денатурацией последних.

**Раствор перекиси водорода концентрированный** (пергидроль). Содержит 27,5-31%  $H_2O_2$ . Применяют в виде раствора для полосканий и смазываний, при ангинах, стоматитах, для лечения гнойных ран. В дерматологии применяют в качестве депигментирующего средства.

**Раствор перекиси водорода** содержит 3%  $H_2O_2$ . Применяют в основном для полоскания полости рта и очистки ран, можно использовать для дезинфекции контактных линз. Препарат также обладает дезодорирующим свойством.

**Гидроперит**. Комплексное соединение перекиси водорода с мочевиной. Содержит около 35%  $H_2O_2$ . Для приготовления раствора, соответствующего приблизительно 1% раствору  $H_2O_2$ , 2 таблетки [1 таблетка соответствует 15 мл. 3% раствора перекиси водорода (0,45 г.)] растворяют в 100 мл воды.

**Калия перманганат** образует темно-фиолетовые водные растворы, способные окрашивать ткани и одежду в коричневый цвет. Растворы калия перманганата в разведении 1:5000 - 1:10000 в течение 1 ч. вызывают гибель многих микроорганизмов. Применяют для промывания ран (0,1-0,5% раствора), полоскания полости рта и горла (0,01-0,1%).

## 6.7. Прочие препараты.

**Деготь березовый** содержит фенол, толуол, ксилол, смолы и другие вещества. Оказывает антимикробное инсектицидное, раздражающее действие. Входит в состав линимента бальзамического по *А.В. Вишневскому*.

**Ихтиол** содержит 10,5% органически связанной серы. Обладает противовоспалительным, местноанестезирующим и слабо выраженным асептическим свойствами.

**Хлорофиллин** – смесь хлорофиллов, содержащихся в листьях эвкалипта (*Eucalyptus globulus*) семейства миртовых (*Myrtaceae*). Применяют местно при лечении ожогов и трофических язв. 1% спиртовой и 2% масляный растворы используют при эрозии шейки матки, внутрь принимают при носительстве стафилококка, внутривенно – при септических состояниях и пневмониях, в полость брюшины – при перитонитах.

## **6.8. Вещества избирательно подавляющие жизнедеятельность микроорганизмов.**

Основная цель применения подобных агентов – подавление размножения или уничтожение возбудителя при отсутствии токсического действия на клетки организма. В настоящее время арсенал антибактериальных средств составляют **антибиотики** и **химиотерапевтические препараты** различных классов. Известно несколько десятков тысяч подобных агентов, но фармакологические свойства лишь нескольких соединений позволяют применять их в качестве лекарственных средств.

**Природные антибиотики** продуцируют различные организмы, их образование направлено на ингибирование жизнедеятельности или уничтожение других организмов. По существу, антибиотики – конечные продукты направленного синтеза и не имеют отношения к метаболитам (в общем понимании). Феномен образования антибиотиков обусловлен в первую очередь антагонистическими взаимоотношениями между организмами. Продуценты антибиотиков – бактерии, актиномицеты, грибы и лишайники, а также высшие растения (продукты известные как фитонциды) и животные. Среди перспективных классов именно природные соединения являются базовыми для получения их полусинтетических аналогов. В медицине наибольшее распространение нашли продукты жизнедеятельности бактерий, актиномицетов и грибов. В настоящее время они представляют наиболее обширный и интенсивно расширяющийся класс антимикробных веществ, используемых на практике уже более полувека.

**Мишени антибиотиков** – только вегетирующие клетки, но не споры. Выбор антибиотика для химиотерапии определяет его спектр активности; соответственно выделяют препараты узкого и широкого спектра действия.

Препараты узкого спектра активности в основном в отношении грамположительных микроорганизмов, особенно кокков (в том числе и грамотрицательных кокков – менингококков и гонококков), некоторых бактерий (коринобактерий и др.) и бацил (клостридии).

## **6.9. Общие принципы антибактериальной терапии.**

Препараты не следует применять эмпирически. Предпочтительнее предварительно выявить его чувствительность, а потом назначить

соответствующее лечение. Столь распространенное эмпирическое применение антибиотиков широкого спектра ведет к селекции множество устойчивых штаммов.

При невозможности определить чувствительность инфекционного агента можно воспользоваться данными эпидемиологических исследований резистентности к антибиотикам микрофлоры и характера микробных сообществ данного региона.

При состояниях, угрожающих жизни больного, либо при необходимости наиболее раннего проведения микробной терапии можно назначить препарат широкого спектра действия, не дожидаясь результатов теста на чувствительность. Тем не менее, следует провести взятие образцов до начала лечения, осуществить полный объем бактериологических исследований при необходимости заменить препарат. Бесконтрольное применение новых антибиотиков быстро приводит к появления резистентных штаммов, особенно в условиях стационаров.

Лечение бактериальных инфекций следует проводить интенсивно. Первичная доза инфекционного агента обычно достаточно мала, и быстрое подавление его размножения (предпочтительно применение бактерицидных препаратов) существенно снижает риск хронизации процесса и образования абсцессов. По возможности максимально раннее начало антибактериальной терапии позволяет ограничиться кратковременными курсами. Что препятствует развитию суперинфекций. Следует помнить, что последние обычно вызваны избыточной колонизацией резистентной аутомикрофлоры на фоне длительного применения антибиотиков широкого спектра действия.

#### **6.10. Антибактериальные лекарственные средства.**

Антимикробные средства принято классифицировать по химической структуре либо по механизмам действия на микробную клетку.

Антибиотики классифицируют и характеризуют по их:

- происхождению;
- химической структуре;
- механизмам действия;
- спектру активности;
- частоте развития лекарственной устойчивости и т.д.

большинство антибиотиков оказывает бактерицидное действие, но препараты, оказывающие бактерицидное действие (например,

левомицетин, тетрациклины и макролиды), также применяют при лечении инфекционных болезней. Кроме того, иногда длительное применение бактериостатических препаратов приводит к гибели микроорганизмов (например, левомицетин при менингококковых инфекциях).

### **Ингибиторы синтеза компонентов клеточной стенки.**

**Пенициллины** - первые из внедренных в практическую медицину антибиотиков. **Природные пенициллины продуцируют грибы рода *Penicillium***; препараты проявляют **бактерицидное действие**, направленное против грамположительных и ограниченного числа грамотрицательных микроорганизмов. Основные мишени пенициллинов — пенициллинсвязывающие белки, число которых весьма значительно (например, у *Escherichia coli* их насчитывают 9). Основным среди них является транспептидаза, опосредующая соединения аланина и глицина на терминальных участках пептидной цепи. Инактивация транспептидаз и активация аутолитических энзимов приводят к быстрому разрушению пептидогликанов, делающему клетку чувствительной к любому изменению осмотического давления с последующим лизисом. В некоторых условиях бактерия может выживать, образуя L-формы с дефектной клеточной стенкой. В медицинской практике применяют **природные и полусинтетические пенициллины**.

**Природные пенициллины.** Из них применяют бензилпенициллин (пенициллин G) — первый антибиотик, оказавшийся эффективным при лечении генерализованных инфекций, а также бициллины и феноксиметилпенициллин (пенициллин V).

Терапевтические возможности природных пенициллинов ограничены их неспособностью проникать в клетки большинства грамотрицательных бактерий, лабильностью к действию бактериальных лактамаз (пенициллиназ) и невозможностью назначения внутрь (чувствительны к кислой среде желудка).

### **Полусинтетические пенициллины.**

Среди них есть:

- препараты 1-го поколения — устойчивые к действию пенициллиназы (метициллин, оксациллин, клоксациллин, нафциллин) и аминопенициллины широкого спектра действия (ампициллин, циклоциллин и др.);
- 2-го и 3-го поколения — карбокспенициллины (карбенициллин, тикарциллин и др.);

- пенициллины 4-го поколения – уреидо- и аминопенициллины (мециллины).

**Препараты узкого спектра действия** (метициллин, оксациллин, клоксациллин, флуфлоксациллин) активны преимущественно в отношении грамположительных микроорганизмов, включая штаммы, продуцирующие пенициллиназу.

**Препараты широкого спектра действия.** Аминопенициллины (ампициллин, амиксациллин, пивампициллин, талампициллин и др.) активны в отношении грамположительных кокков, грамотрицательных бактерий аэробных микроорганизмов. Неактивны в отношении пенициллиназообразующих штаммов. **Карбоксипенициллины**, например, карбенициллин (пиопен) и тикарциллин, а также **уреидо или ацилампициллины** (азлоциллин, мезлоциллин, пиперациллин) активны в отношении грамположительных и грамотрицательных аэробных и анаэробных микроорганизмов, особенно видов *Pseudomonas* и *Proteus*.

**Потенцированные пенициллины.** В связи с увеличением числа бактерий, продуцирующих  $\beta$ -лактамазы, и возрастанием их роли в патологии человека были разработаны потенцированные пенициллины. Помимо пенициллинового кольца, эти препараты включают ингибиторы  $\beta$ -лактамаз. Ингибиторы содержат  $\beta$ -лактамовое кольцо, высоко аффинное к пенициллинам (что защищает молекул антибиотика от инактивации этими ферментами), но не проявляют бактерицидной активности. Наибольшее распространение нашли **клавулановая кислота и сульбактам**. Среди потенцированных пенициллинов хорошо зарекомендовали себя, например, комбинации ампициллина с сульбактером, амоксициллина или тикарциллина с клавулановой кислотой.

**Клавулановая кислота** расширяет антибактериальный спектр  $\beta$ -лактамовых антибиотиков путем необратимого связывания и ингибирования многих бактериальных  $\beta$ -лактамаз. Комбинацию амоксициллина и клавулановой кислоты применяют при лечении инфекций, вызванных продуцирующими  $\beta$ -лактамазу штаммами *H. Influenza*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, видами *Klebsiella* и *Enterobacter*. Комбинацию тикарциллина и клавулановой кислоты применяют при инфекциях, вызванных полимикробной флорой.

**Цефалоспорины** – наиболее популярные антибактериальные препараты, вместе с пенициллинами образуют группу  $\beta$ -лактамовых антибиотиков.

**Продуценты природных цефалоспоринов** - грибы рода *Cephalosporium*

– *S. acremonium*, *S. salmosynnematum* и др. цефалоспорины оказывают бактерицидное действие.

Природные соединения легко модифицируются, и в настоящее время известно более 30 препаратов. Наиболее распространена классификация, отражающая последовательность их внедрения: цефалоспорины 1-го поколения (цефазолин, цефалотин, цефалексин, цефрадин, цефепирин, цефадроксин и др.); 2-го поколения (цефуроксим, цефукситин, цефмандол, цефотетан, цефаклор, цефоницид, цефоранид и др.); 3-го поколения (цефотаксим, цефтриаксон, цефтазидим, цефперазон, цефтизоксим, цефиксимин, моксалактам); 4-го поколения (цефепим, цефпиром). По антимикробной активности их также разделяют на 4 основные группы (спектр активности большинства цефалоспоринов не ограничен перечисленными микроорганизмами).

Цефалоридин, цефазолин (кефзол), цефалотин активны против грамположительной микрофлоры, в том числе против продуцентов  $\beta$ -лактамаз (цефалоспориная); к ним могут быть отнесены резистентные энтерококки.

Цефутоксим (кетцеф), цефамандол, цефотаксим (клафоран) эффективно подавляют представителей *Enterobacteriaceae*, а также гемофилы и нейссерии.

Цефтазидим, цефсулодин, цефоперазон активны против *Pseudomonas aeruginosa* и других неферментирующих бактерий.

Цефокситин, ламатоксеф, цефотетан эффективны при инфекциях, вызванных бактероидами; цефотетан проявляет пролонгированный эффект. Цефалоспорины 4-го поколения более активны в отношении грамположительных кокков, многих штаммов *Enterobacter*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii* и *P. aeruginosa* устойчивых к цефтазидиму, цефотаксиму или азтреонаму.

Бацитрацины – пептидные антибиотики, продуцируемые *Bacillus subtilis* и *B. licheniformis* перед спороборазованием. Выделено не менее 10 близкородственных пептидов. Применяемый в медицинской практике препарат содержит в основном бацитрацин А, проявляющий бактерицидный эффект, связанный с нарушением полимеризации пептидогликанов за счет подавления функций фосфорилированных липидов. Активность препарата направлена против грамположительной микрофлоры (грамотрицательные бактерии, исключая нейссерии, обычно резистентны). Бацитрацин сравнительно токсичен, но плохая резорбтивная способность позволяет использовать препарат при лечении

инфицированных ран.

Ванкомицин – гликопептид, продуцируемый различными видами *Streptomyces*, в настоящее время вид классифицирован как *S. orientalis*. Ванкомицин блокирует синтез пептидогликанов клеточной стенки (вязывается с D-аланил-D-аланином); эффективен против многих грамположительных бактерий. Вследствие сложного строения молекул структура изучена недостаточно. Поскольку препарат плохо всасывается в кишечнике, внутримышечные инфекции сопровождаются болевыми ощущениями, его обычно применяют внутривенно. Ванкомицин, как и ристомицин, клиндамицин и линкомицин, антистафилококковые антибиотики.

Циклосерин продуцирует различные виды *Streptomyces*. Препарат воздействует на ферменты биосинтеза, индуцируя синтез L-циклосерина вместо D-аланина; конечный продукт не способен встраиваться в межпептидные мостики молекулы пептидогликана. Циклосерин проявляет бактериостатическое действие в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий; его особенность - способность ингибировать рост *M. tuberculosis* (действует на штаммы, резистентные к стрептомицину, фтивазиду и тубазиду).

Препараты, нарушающие функции цитоплазматической мембраны микроорганизмов.

Полимиксины. Группа гомологичных продуктов, образуемых *Bacillus polux* и некоторыми другими бактериями. По химической структуре являются сложными соединениями, включающими дериваты полипептидов с активностью катионных детергентов. Бактерицидное действие связано с нарушением осмотической резистентности цитоплазматической мембраны. Спектр антимикробного действия включает грамотрицательную микрофлору (эшерихии, шигеллы, протей, клебсиеллы, псевдомонады и др.).

Полиеновые антибиотики включают нистатин, леворин и амфотерицин В, продуцируемый видами *Streptomyces*. Используют как противогрибковые препараты; механизм действия - связывание эргостерола цитоплазматической мембраны с последующим выходом низкомолекулярных соединений из клетки. Развитие резистентности наблюдается сравнительно редко.

Нистатин применяют как наружно (для лечения кандидозных поражений кожи и слизистых оболочек), так и внутрь (при кандидозе ЖКТ).

Амфотерицин В назначают при системных микозах; следует помнить о

достаточно выраженном нефротоксическом действии препарата, обусловленном способностью связываться с холестерином клеточных мембран.

**Грамицидины** – полипептиды, продуцируемые *Bacillus brevis*, вызывают нарушения целостности цитоплазматической мембраны; ограниченно применяют как бактериостатики при инфекциях, вызванных грамположительными кокками и бациллами.

**Ингибиторы синтеза белка** – самая многочисленная и разнообразная по химической структуре группа антибиотиков – представлены главным образом природными соединениями. Основной механизм действия большинства препаратов – **нарушение функциональных свойств рибосом.**

**Аминогликозиды** – один из наиболее давно известных классов антибиотиков. Известно более 50 препаратов, разделяемых, как и цефалоспорины, на поколения. **Препараты 1-го поколения** – стрептомицин, канамицин, мономицин, неомицин; **2-го поколения** – гентамицин; **3-го поколения** – сизомицин, тобрамицин, амикацин, нетилмицин и дидезоксиканамицин В.

Аминогликозиды реагируют с 30S субъединицей рибосомы, образуя необратимый комплекс с одним из рибосомальных белков. Тем самым блокируя функции рибосомы в целом. Известно 3 пути нарушения синтеза белка:

- Блокируется формирование пептидных связей, что опосредует основной путь реализации бактерицидного действия.
- Блокируется взаимодействие транспортной РНК с комплексом матричная РНК-рибосома.
- Появляются дефектные полипептиды вследствие искажения кода матричной РНК и нарушение считывания генетической информации.

**Спектр активности** включает многие грамположительные и грамотрицательные бактерии; к аминогликозидам малочувствительны некоторые стрептококки (гноенный и зеленящий) и пневмококки, абсолютно резистентны энтерококки, провиденсии, бактероиды и прочие анаэробы. Некоторые аминогликозиды (стрептомицин, канамицин) подавляет рост туберкулезной палочки, а также простейших – амев, лейшманий, токсоплазм (мономицин, канамицин).

**Применение.** Аминогликозиды показаны при резистентности микроорганизмов к другим препаратам или при необходимости быстрого достижения бактерицидного эффекта. Они проявляют синергизм с

другими антибиотиками, в первую очередь с  $\beta$ -лактамовыми, но почти не всасываются при приеме внутрь.

**Побочные эффекты.** Нейро- нефротоксическое действие; стрептомицин может вызвать потерю слуха (оказывает токсическое действие на VIII черепные нервы); при применении препаратов необходим контроль за их содержанием в сыворотке.

**Тетрациклины** - антибиотики широкого спектра действия, продуцируемые грибами вида *Streptomyces*. Оказывают бактериостатическое действие. Механизм действия: взаимодействие с бактериальными 30S рибосомами с последующим блокированием присоединения транспортной РНК к комплексу рибосом - матричная РНК и нарушением встраивания новых аминокислот в полипептидную цепь. В настоящее время природные тетрациклины (хлортетрациклин, окситетрациклин, тетрациклин) практически не применяют, их вытеснили полусинтетические препараты (наиболее известны доксициклин и миноциклин). Тетрациклины активны в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также микоплазм и внутриклеточных паразитов - риккетсий, легионелл и хламидий. Однако препараты не проникают в бактериальные клетки, содержащие специфические - R-плазмиды. Тетрациклины сохраняют также свое значение в качестве средств лечения холеры, бруцеллеза, туляремии и др. Основные побочные реакции желудочно-кишечные расстройства (часто развивается дисбактериоз), депонирование в костных тканях (не следует назначать беременным и детям до 8 лет); аллергические реакции наблюдаются редко. Левомецетин (хлорамфеникол) - продуцент этого антибиотика *Streptomyces venezuelae*; единственный природный антибиотик, молекула которого содержит нитробензин, опосредующий его токсичность для клеток бактерий и млекопитающих.

**Спектр активности:** многие грамотрицательные и грамположительные бактерии, риккетсии, спирохеты, хламидии. Один из немногих химиотерапевтических средств, к которому чувствительны грамотрицательные анаэробы; остается препаратом выбора при лечении сыпного тифа, лихорадки Скалистых гор, менингитов, вызванных *H. influenzae*.

**Действие бактериостатическое.** Механизм действия: взаимодействие с 50S субъединицей рибосомы с последующим ингибированием активности пептидилтрансферазы (локализована в 50S субъединице), ответственной за образование пептидных связей. Может инактивироваться

хлорамфениколтрансферазой, содержащейся в некоторых R-плазмида. Хорошо всасывается и легко проникает в клетку.

**Побочные эффекты** - осложнения со стороны ЖКТ, нарушения функций костного мозга, возможно развитие синдрома "серого ребенка".

**Нарушения функции костного мозга** проявляются развитием анемии, лейко- и тромбоцитопении, вплоть до апластического криза. В некоторых случаях проявления апластической анемии возникают после однократного приема препарата. Больным с синдромами Жильбера – Майленграхта и Криглера-Найяра назначать левомецетин нельзя.

**Синдром "серого ребенка"** . Левомецетин метаболизирует в печени , образуя глюкурониды. При врожденном дефиците глюкуронил трансферазы (например, при синдромах Жильбера – Майленграхта и Криглера-Найяра) применение препарата приводит к накоплению его в крови в токсической концентрации, развиваются общая слабость, рвота, серый оттенок кожных покровов, боли в сердце, отеки и гепатомегалия, возможен летальный исход.

**Макролиды** содержат макроциклическое лактонное кольцо с присоединенными комбинациями необычных сахаров (аминосахара, безазотистые сахара или одновременно те и другие). Широкое клиническое применение нашли природные макролиды: эритромицин, олеандомицин и спирамицин. В настоящее время становятся популярными полусинтетические макролиды – рокситромицин, диритромицин, кларитромицин и флуритромицин.

**Спектр активности:** преимущественно активны в отношении пенициллин- и тетрациклинрезистентных штаммов, бактерий , а также внутриклеточных паразитов – риккетсий, хламидий и др. макролиды – препараты выбора при наличии гиперчувствительности к  $\beta$ -лактамовым антибиотикам.

**Действие бактериостатическое, механизм действия** – подавление пептидилтрансферазной активности. Могут быть неэффективны у бактерий с мутациями в 50S субъединицы рибосом или содержащих R-плазмиды, способные метилировать 23S субъединицы РНК.

**Азалиды.** В настоящее время большие перспективы имеет близкий к макролидам класс азалидов, содержащих 15-членное лактонное кольцо. Так известен азитромицин (реализуется под торговыми марками "сумамед" и "цитромакс"), сочетающий широкий спектр активности с чрезвычайно благоприятными фармакокинетическими свойствами, позволяющими ему депонироваться в фагоцитах и проявлять эффект в отношении поглощенных

бактерий, также легко проникать в различные клетки организма. Препарат может вызвать поражения ЖКТ; его не следует назначать больным с серьезной патологией печени и почек.

**Линкозамиды.** Типичный представитель – линкомицин. Спектр активности, характер антибактериального действия, а также механизмы его ингибирования сходны с таковыми у макролидов. Интересным фактором является резистентность всех штаммов кишечной палочки к действию препарата. В терапии инфекций, вызванных анаэробными бактериями, применяют синтетический аналог клиндамицин (7-хлор-7-дезоксилинкомицин), но его использование сопряжено с риском чрезмерного роста *Clostridium difficile*, что может привести к появлению диареи и псевдомембранозного колита.

**Ингибиторы транскрипции и синтеза нуклеиновых кислот** включают вещества, подавляющие синтез ДНК (репликацию) и РНК (транскрипцию).

**Хинолоны** – антибактериальные препараты широкого спектра действия; механизм активности опосредован ингибированием топоизомеразы (ДНК-гиразы), что препятствует спирализации молекулы ДНК. Эффективны при инфекциях, вызванных видами *Pseudomonas* и *Proteus*. Основное клиническое достоинство – возможность приема внутрь. Наиболее известный препарат – налидиксовая кислота; позднее были созданы мочевые хинолоны – оксолиниевая и проимидиевая кислоты, циноксацин, милосксацин и др. прорывом в разработке новых лекарственных средств явилось получение фторированных хинолонов. В настоящее время фторихинолоны – перспективная группа новых препаратов широкого спектра действия; действие бактерицидное, в большей степени на грамотрицательную микрофлору. Большинство анаэробов резистентно или умеренно чувствительно к препаратам. Наиболее известны ломефлоксацин, норфлоксацин, пефлоксацин, офлоксацин и цитрофлоксацин.

**Производные нитромидазола** (например, метронидазол) проявляют селективный бактерицидный эффект в отношении некоторых анаэробов и простейших. Механизм действия – восстановление нитрогруппы препарата ниторозогидроксиламингогруппы путем переноса электронов осуществляемые белком, аналогичны ферредоксону теплокровных. Подобные превращения препятствуют выходу метронидазола из клетки и приводит к его накоплению в концентрациях, 10-100 раз превышающие таковые во внеклеточной среде. Депонированный метаболит вызывает множественные нарушения структуры ДНК. Токсический эффект не реализуется на клетках теплокровных так как они не содержат

соответствующего фермента.

Ингибиторы синтеза (транскрипции) – **рифамицины**. Являются смесью антибиотиков, определяемых как рефомициновый комплекс, среди которых наиболее перспективным является **рифамицин В**. Однако необходимость создания специальных условий для его получения и лабильность к различным воздействиям послужили причиной для создания на его основе полусинтетического аналога – препарата рифамина (в отечественной практике - рифамицин).

Молекула рифамицина содержит бициклическую структуру, с длинным алифатическим мостиком и нитрифицированной боковой цепью. Действие бактерицидное, опосредовано ингибированием ДНК-зависимой РНК-полимеразы. На клетках теплокровных подобного эффекта не наблюдают. Взаимодействие с РНК-полимеразой блокирует синтез любых видов бактериальной РНК. Спектр действия включает грамположительные и грамотрицательные бактерии, легионеллы, хламидии, бруцеллы и микобактерии. Основное показание – туберкулез. Назначают также при различных респираторных инфекциях, лепре, болезни легионеров.

**Ингибиторы синтеза нуклеотидов** составляют большую группу антимикробных агентов, механизм действия связан с ингибированием синтеза фолиевой кислоты за счет нарушения метаболизма пуринов и пиримидинов.

**Сульфаниламиды** - большая группа антибактериальных препаратов для системного применения; механизм действия связан с подавлением синтеза тимидина и всех пуринов. Все соединения (более 100), включая основное – р-маинобензенсульфонамид, получают замещением радикалов в сульфаниломидной группе. Оказывают **бактериостатическое действие**. **Спектр активности** сульфаниламидов включает многие грамположительные бактерии, например *Streptococcus pyogenes* или *S. pneumoniae*, виды *Actinomyces*, *Nocardia*, *Bacillus anthracis*. Многие грамотрицательные бактерии резистентны к сульфаниламидам, тем не менее к их действию чувствительны *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* виды *Shigella* *Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis* и *Chlamydia trachomatis*.

**Механизм действия.** Препараты – структурные аналоги парааминобензойной кислоты, связывают дигидроптероатсинтетазу, препятствуя образованию интермедиатов синтеза фолиевой кислоты (тетрагидроfolатов и дигидрофолиевой кислоты), служащей коферментом в переносе атома углерода между молекулами.

Кроме того, препараты проявляют слабо ингибирующее действие на активность дигидрофолатредуктазы, а также ингибируют синтез тимидина, пуринов, метионина и серина.

Клетки человека мало чувствительны к действию препарата, т.к. не способны к синтезу фолиевой кислоты (основные потребности удовлетворяются за счет поступления с пищей).

**Побочные эффекты.** Сульфаниламиды способны вызвать развитие реакций гиперчувствительности, преимущественно замедленного типа (от многоформной экссудативной эритемы до синдрома Лайелла), а также различные васкулиты. Наиболее часто поражение наблюдают при наружном их применении, поэтому выпуск лекарственных форм для наружного применения, исключая глазные капли прекращен. Высокие дозы способны вызвать гематологические расстройства, обусловленные иммунными механизмами (например, иммунные лейкопении вплоть до агранулоцитоза), а также образование кристаллов в мочевыводящих путях.

**Диаминопиримидины.** Из многочисленных соединений этой группы в медицинской практике применяют лишь триметоприм и пириметамин. Первоначально препараты синтезировали как аналоги тимидина; в настоящее время установлено ингибирующее влияние на синтез ДНК, опосредованное нарушениями синтеза фолиевой кислоты.

Триметоприм является структурным аналогом дигидрофолиевой кислоты и связывает дигидрофолатредуктазу.

Комбинация триметоприм – сульфаметоксазол (бисептол, септрин) оказывает бактерицидное действие, хотя оба компонента – бактериостатики. Применяют при инфекциях мочеполовой системы и ЖКТ; наиболее часто используют длительными курсами для профилактики бактериальных инфекций у пациентов с иммунодефицитами (например, для профилактики пневмоцистозов у пациентов с ВИЧ-инфекцией).

**Механизм действия антибиотиков.**

Все антибиотики обладают избирательностью действия. Их относительная безвредность для человека определяется прежде всего тем, что они специфически подавляют такие метаболические процессы в микробной клетке или у вируса, которые отсутствуют в эукариотной клетке или недоступны для них. Действие антибиотики оказывают как на структурные элементы клеток, так и на конститутивные ферменты.

Так, антибиотики, оказывающие воздействие на стенку, нарушают преимущественно структуру мукопептидного слоя.

Cycloserin. Циклозерин блокирует элементы клеток, необходимые для

синтеза прекурсоров бактериальной стенки. Это происходит внутри цитоплазмы. Циклозерин должен проникнуть через клеточную стенку и мембрану.

Vancomycin, Bacitracin, Ristocetin. Эти антибиотики подавляют присоединение пептидов к формирующемуся мукопептидному слою. Этот процесс также происходит в цитоплазме, поэтому и эти антибиотики должны проникнуть в клетку.

Penicillin, цефалоспорины действуют на последнюю стадию формирования мукопептидного слоя, блокируя энзимный процесс, посредством которого осуществляется конечное перекрестное связывание определенных молекул. Вследствие этого мукопептидный слой не может достичь окончательной твердости и нерастворимости. Процесс происходит вне клеточной мембраны. Антибиотики не должны проникать внутрь цитоплазмы, т.е. они не зависят от проницаемости мембраны. Клеточная стенка сохраняет свою эластичность и отчасти растворимость. Так как осмотическое давление в цитоплазме грамположительных бактерий достигает 20-30 атмосфер, появляются разрывы, наступает истечение цитоплазмы и лизис клеток. В известных условиях, когда осмотическое давление вне клетки достаточно высокое, чтобы уравновешивать внутреннее давление, клетка может сохраниться как протопласт (без остатков стенки) или как сферопласт (с остатками стенки). Подобны протопластам L-формы бактерий и микоплазм, которые известны как комменсальные и патогенные микроорганизмы.

*Пенициллин* не оказывает эффективного влияния на стенку грамотрицательных бактерий, т.к. мукопептидный слой, который он ингибирует, составляет лишь небольшую часть всей клеточной стенки. В низких концентрациях пенициллин трудно проникает через липополисахаридный слой грамотрицательных бактерий. Это также является важной причиной, которая обуславливает отсутствие его активности в отношении этих микроорганизмов.

Полусинтетические пенициллины, как *ампициллин*, *карбенициллин*, а также *цефалоспорины* способны проникать через липополисахаридный слой клеточной мембраны и этим объясняется их активность против грамотрицательных бактерий.

**Действие на синтез белков.** Схематически синтез белков осуществляется следующим образом:

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК – фактор наследственности) передает информацию для синтеза определенного белка мРНК

(messenger-РНК). В рибосомах клетки (внутриклеточных органеллах, в которых происходит систематизация аминокислот для образования определенного белка) мРНК вступает в контакт с тРНК (transfer-РНК). Последнее доставляет свободные аминокислоты, находящиеся в цитоплазме, из которых должен образоваться белок. Сообразно получаемой информации от ДНК, мРНК выбирает необходимые аминокислоты.

*Тетрациклины* препятствуют связыванию тРНК, несущей аминокислоты, с рибосомой.

*Хлорамфеникол* нарушает включение аминокислот в создаваемую полипептидную цепь. Допускают, что он ингибирует также и связывание мРНК с рибосомой, так что рибосома "не знает", какие аминокислоты необходимо подобрать для синтезирования белка. Белковый синтез нарушается также и под действием эритромицина и линкомицина.

Разные антибиотики по-разному блокируют синтез белка. *Тетрациклины* блокируют связывание aa-тРНК на А-участке рибосомы 70S. *Хлорамфеникол* подавляет пептидилтрансферазную реакцию. *Стрептомицины* препятствуют превращению инициаторного комплекса в функционально активную рибосому. *Эритромицин* блокирует реакцию транслокации. *Пурамицин*, присоединяясь к растущему концу синтезируемой полипептидной цепи, вызывает преждевременное отделение ее от рибосомы. Механизм действия *вторхинолов* связан с их избирательным подавлением бактериальных ферментов ДНК-гераз, участвующих в репликации ДНК. Вторхинолоны связываются со специфическими участками ДНК, которые создаются воздействием ДНК-геразы, и подавляют ее активность.

*Рифампицины* угнетают активность ДНК-зависимых РНК-полимераз, вследствие чего у бактерий подавляются процессы транскрипции.

*Стрептомицин, каномицин, гентамицине, неомицин и налидиксовая кислота* мешают правильному функционированию мРНК. Следствием этого является неправильное распределение аминокислот, т.е. синтезируется фальшивый, функционально негодный белок.

Все перечисленные выше антибиотики действуют на функционирующие клетки, т.к. их влияние связано с нарушением какой-то функции.

**Действие на цитоплазматическую мембрану.** Мембрана состоит из 3 слоев: среднего липидного и двух – наружного и внутреннего – белковых. Молекула *полимиксина* проникает между слоями мембраны, т.к. на одном конце она липидно растворима, а на другом – водо растворима. Наступает

продольный и поперечный разрыв – разрыхление мембраны. Она утрачивает свое свойство как регулятора проницаемости. Клетка погибает. *Полимиксин* прежде всего воздействует на липопротеиновый слой, после чего проявляется его основное действие на мембрану. Этот препарат действует бактерицидно, независимо от состояния покоя или активности клетки, но полимиксин не может проникать через магниеворибонуклеиновую оболочку грамположительных бактерий, а поэтому он эффективен только против грамотрицательных штаммов. Однако, полимиксин не может проникнуть в клеточную мембрану отдельных энтеробактерий (например, *Pr.mirabilis*).

**Действие на ДНК и РНК.** *Налидиксовая кислота* нарушает синтез ДНК, препятствуя включению тимина в ее молекулу.

*Рифамицин* и сродные ему антибиотики нарушают синтез РНК. Следствие того, что антибиотики оказывают свое воздействие на различные участки бактериальной клетки, то следует рассмотреть синергическое или антогонистическое действие сочетаний антибиотиков.

Так, действие пенициллина подавляется всеми антибиотиками, которые угнетают синтез белка. Если этот синтез прекращен, клетка находится в состоянии покоя, энзимы, созидающие клеточную стенку, на которые влияет пенициллин, не функционируют.

*Пенициллин* и *стрептомицин* при воздействии на микроорганизмы действуют в 2 направлениях. Пенициллин создает щели в клеточной стенке, способствующие проникновению стрептомицина, нарушающего синтез белка.

## 6.11 МЕХАНИЗМЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Основой терапевтического действия антибактериальных препаратов является подавление жизнедеятельности возбудителя инфекционной болезни в результате угнетения более или менее специфичного для микроорганизмов (прокариот) метаболического процесса. Угнетение происходит в результате связывания антибиотика с мишенью, в качестве которой может выступать либо фермент, либо структурная молекула микроорганизма.

Резистентность микроорганизмов к антибиотикам может быть природной и приобретенной.

- Истинная природная устойчивость характеризуется отсутствием у

микроорганизмов мишени действия антибиотика или недоступности мишени вследствие первично низкой проницаемости или ферментативной неактивации. При наличии у бактерий природной устойчивости антибиотики клинически неэффективны. Природная резистентность является постоянным видовым признаком микроорганизмов и легко прогнозируется.

- Под приобретенной устойчивостью понимают свойство отдельных штаммов бактерий сохранять жизнеспособность при тех концентрациях антибиотиков, которые подавляют основную часть микробной популяции. Возможны ситуации, когда большая часть микробной популяции проявляет приобретенную устойчивость. Появление у бактерий приобретенной резистентности не обязательно сопровождается снижением клинической эффективности антибиотика. Формирование резистентности во всех случаях обусловлено генетически: приобретением новой генетической информации или изменением уровня экспрессии собственных генов.

Известны следующие биохимические механизмы устойчивости бактерий к антибиотикам:

1. Модификация мишени действия антибактериальных препаратов.
2. Инактивация антибактериальных препаратов.
3. Активное выведение антибактериальных препаратов из микробной клетки (эф-флокс).
4. Нарушение проницаемости внешних структур микробной клетки.
5. Формирование метаболического "шунта".

## 6.12 МЕХАНИЗМЫ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ ОТДЕЛЬНЫХ ГРУПП в-лактамы антибиотиков

**Ферментативная инактивация.** Наиболее распространенным механизмом устойчивости микроорганизмов к в-лактамам является их ферментативная инактивация в результате гидролиза одной из связей в-лактамного кольца ферментами в-лактамазами. К настоящему времени описано более 200 ферментов, различающихся по следующим практически важным свойствам:

Субстратный профиль (способности к преимущественному гидролизу тех или иных в-лактамов, например пенициллинов или цефалоспоринов, или тех и других в равной степени).

Локализация кодирующих генов (плазмидная или хромосомная). Эта характеристика определяет эпидемиологию резистентности. При

плазмидной локализации генов происходит быстрое внутри- и межвидовое распространение резистентности, при хромосомной - наблюдаются распространение резистентного клона.

Чувствительность к применяющимся в медицинской практике ингибиторам: клавулановой кислоте, сульбактаму и тазобактаму.

$\beta$ -лактамазы встречаются у подавляющего большинства клинически значимых микроорганизмов, важным исключением являются микроорганизмы рода *Streptococcus*. Наиболее важные ферменты и их свойства приведены в таблице 8.

Таблица 8.

**Наиболее распространенные  $\beta$ -лактамазы и их свойства.**

Ферменты	Характеристика
Плазмидные $\beta$ -лактамазы класса А стафилококков	Гидролизуют природные и полусинтетические пенициллины кроме метициллина и оксациллина. Чувствительны к ингибиторам.
Плазмидные $\beta$ -лактамазы широкого спектра класса А грамотрицательных бактерий	Гидролизуют природные и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины I поколения. Чувствительны к ингибиторам.
Плазмидные $\beta$ -лактамазы расширенного спектра класса А грамотрицательных бактерий	Гидролизуют природные и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины I-IV поколения. Чувствительны к ингибиторам.
Хромосомные $\beta$ -лактамазы широкого спектра класса С грамотрицательных бактерий	Гидролизуют природные и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины I-III поколения. Чувствительны к ингибиторам.
Хромосомные $\beta$ -лактамазы широкого спектра класса А грамотрицательных бактерий	Гидролизуют природные и полусинтетические пенициллины, цефалоспорины I-II поколения. Чувствительны к ингибиторам.

Широкое распространение  $\beta$ -лактамаз широкого спектра среди грамотрицательных бактерий не связано с серьезными проблемами

в лечении, поскольку имеется достаточное количество высокоактивных в-лактамовых антибиотиков (ингибиторозащитные пенициллины, цефалоспорины II-IV поколений). Аналогичная ситуация складывается и с широким распространением стафилококковых в-лактамаз.

В настоящее время наибольшее значение для клинической практики имеют плазмидные в-лактамазы расширенного спектра грамотрицательных бактерий, поскольку они способны разрушать цефалоспорины III и, в меньшей степени, IV поколения. Рутинные методы оценки антибиотикочувствительности очень часто не выявляют этот механизм устойчивости. в-лактамазы расширенного спектра встречаются у микроорганизмов рода *Klebsiella*, достаточно часто у *E. coli* и *Proteus* spp., реже у других грамотрицательных бактерий. В России и отдельных учреждениях частота распространенности этих ферментов среди клебсиелл достигает 90 %.

При тяжелых нозокомиальных инфекциях, вызванных *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. и некоторыми другими микроорганизмами, в процессе лечения цефалоспорины III поколения примерно в 20 % случаев формируется резистентность к этим антибиотикам, обусловленная гиперпродукцией хромосомных в-лактамаз класса C. В таких ситуациях эффективность сохраняют цефалоспорины IV поколения и карбапенемы.

Хромосомные в-лактамазы класса B, разрушающие карбапенемные антибиотики, распространены среди редких видов микроорганизмов, например, *S. maltophilia*.

**Модификация мишени действия.** Мишенями действия в-лактамов являются ферменты — ПСБ, участвующие в синтезе клеточной стенки бактерий. В результате модификации у некоторых ПСБ уменьшается сродство к в-лактамам, что проявляется в повышении МПК этих препаратов и снижении клинической эффективности. Реальное клиническое значение имеет устойчивость среди стафилококков и пневмококков. Гены модифицированных ПСБ локализованы на хромосомах.

Устойчивость стафилококков (*S. aureus* и коагулазонегативных стафилококков) обусловлена появлением у микроорганизмов дополнительного ПСБ (ПСБ2а). Маркером наличия ПСБ2а является устойчивость к метициллину или оксациллину.

Независимо от результатов оценки *in vitro* при инфекциях, вызываемых метициллинорезистентными стафилококками, все в-лактамы следует считать клинически неэффективными и не использовать в терапии.

Частота распространения метициллинорезистентных стафилококков в некоторых отделениях реанимации, онкологии и гематологии в России превышает 50-60 %, что создает крайне серьезные проблемы для терапии.

Устойчивость пневмококков обусловлена появлением в генах, кодирующих ПСБ, чужеродной ДНК, происхождение которой связывают с зелеными стрептококками. При этом перекрестная устойчивость между отдельными *β*-лактамами неполная. Значительная часть штаммов, устойчивых к пенициллину, сохраняет чувствительность к цефалоспорином III поколения и карбапенемам. Данные о частоте распространения в России пенициллинорезистентных пневмококков ограничены, скорее всего, этот показатель не превышает 4-5 %.

Среди грамотрицательных бактерий устойчивость, связанная с модификацией ПСБ встречается редко. Определенное значение этот механизм устойчивости имеет у *H. influenzae* и *N. gonorrhoeae*. Микроорганизмы, проявляют устойчивость не только к природным и полусинтетическим пенициллинам, но и к ингибиторозащищенным препаратам.

**Активное выведение *β*-лактамов из микробной клетки** - Ранее считалось, что *β*-лактамы активно не выводятся из микробной клетки, однако, в последние годы появились сообщения о наличии у *P. aeruginosa* транспортных систем, осуществляющих активное выведение карбапенемов.

#### Аминогликозиды

**Ферментативная инактивация.** Основным механизмом устойчивости к аминогликозидам является их ферментативная инактивация путем модификации. Модифицированные молекулы аминогликозидов теряют способность связываться с рибосомами и подавлять биосинтез белка. Описаны три группы АМФ, осуществляющих инактивацию аминогликозидов, путем их связывания с различными молекулами: ААС — присоединяющие молекулу уксусной кислоты, АРН — присоединяющие молекулу фосфорной кислоты, нуклеотидил- или АНТ — присоединяющие молекулу нуклеотида аденина.

Общее число описанных АМФ превышает 50, каждый из них характеризуется более или менее уникальным субстратным профилем. Гены ферментов локализуются, как правило, на плазмидах, что приводит к быстрому внутри- и межвидовому распространению устойчивости. Среди грамположительных и грамотрицательных бактерий распространены различные ферменты (табл. 9).

Таблица 9.

## Характеристика наиболее распространенных АМФ.

Ферменты	Устойчивость к антибиотикам
Грамположительные микроорганизмы	
АРН (3)-III	КАН, НЕО, АМК
АНТ (4) - I	ТОБ, АМК
АНТ (6) - I	СТР
ААС (6) - АРН (2)-III	ГЕН, ТОБ, НГЛ, АМК
Грамотрицательные микроорганизмы	
АНТ (2)	КАН, ГЕН, ТОБ
ААС (2)	ГЕН, ТОБ, НГЛ,
ААС (3) - V	ГЕН, ТОБ, НГЛ,
ААС (3) - I	ГЕН
ААС (6) - I	ТОБ, НГЛ, АМК
АРН (3)-I	КАН, НЕО
АРН (3)-II	КАН, НЕО
АРН (3)-VI	КАН, АМК
КАН – канамицин	НЕО – неомидин
СТР - стрептомицин	ГЕН - гентамицин
ТОБ - тобрамицин	НГЛ - нетилмидин
АМК - амикацин	

На практике среди грамотрицательных бактерий могут встречаться все комбинации устойчивости к отдельным аминогликозидам. Это связано с разнообразием субстратных профилей отдельных ферментов и возможностью наличия у бактерий одновременно нескольких генов АМФ.

Для России характерна высокая частота распространения устойчивости среди грамотрицательных бактерий к гентамицину и тобрамицину, что, вероятно, связано с необоснованно широким применением гентамицина. Частота устойчивости к нетилмицину, как правило, несколько ниже. Устойчивость к амикацину встречается достаточно редко.

Число АМФ, встречающихся у грамположительных бактерий, не столь

велико. Определенное клиническое значение имеет распространение среди грамположительных бактерий бифункционального фермента ААС(6')-АРН(2') разрушающего большинство клинически значимых аминогликозидов, кроме стрептомицина и спектиномицина. Как следует из табл. 2, маркером наличия этого фермента является устойчивость к гентамицину, другие ферменты, распространенные среди грамположительных бактерий, не инактивируют этот антибиотик.

**Снижение проницаемости внешних структур.** Проникновение аминогликозидов через внешнюю и цитоплазматическую мембраны бактерий является сложным процессом. Низкая природная чувствительность к аминогликозидам некоторых микроорганизмов (например, *B. cerusia*) связана именно с недостаточной проницаемостью для антибиотиков внешней мембраны этих микроорганизмов. Мутации, приводящие к изменению структуры липо-полисахарида у *E. coli* и *P. aeruginosa*, могут обусловить значительное повышение устойчивости к аминогликозидам.

**Природная устойчивость к аминогликозидам анаэробов** объясняется тем, что транспорт этих антибиотиков через цитоплазматическую мембрану связан с системами переноса электронов, которые у анаэробов отсутствуют. По этой же причине факультативные анаэробы в условиях анаэробноза, становятся значительно более устойчивыми к аминогликозидам, чем в аэробных условиях.

Практически важным фактом является природная устойчивость к аминогликозидам стрептококков и энтерококков, связанная и преимущественно анаэробным метаболизмом этих бактерий и, соответственно, невозможностью транспорта антибиотиков к чувствительным мишеням. При совместном воздействии на микробную клетку аминогликозидов и в-лактамов последние нарушают структуру цитоплазматической мембраны бактерий и облегчают транспорт аминогликозидов. В результате этого между в-лактамами и аминогликозидами проявляется выраженный синергизм.

Появляются данные о том, что аминогликозиды могут подвергаться активному выведению из микробной клетки.

**Модификация мишени, действия.** Основной мишенью действия аминогликозидных антибиотиков является 30S субъединица бактериальной рибосомы, в некоторых случаях устойчивость может быть связана с ее модификацией. Распространение и клиническое значение устойчивости, связанной с модификацией мишени незначительно.

## Хинолоны/Фторхинолоны

**Модификация мишени действия.** Ведущим механизмом устойчивости к хинолонам/фторхинолонам является модификация мишеней — двух бактериальных ферментов ДНК-гиразы и топоизомеразы IV, опосредующих конформационные изменения в молекуле бактериальной ДНК, необходимые для ее нормальной репликации. Каждый из ферментов состоит из четырех субъединиц. ДНК-гираза состоит из двух *gyrA* и двух *gyrB* субъединиц (соответствующие гены *gyrA* и *gyrB*). Топоизомераза IV — из субъединиц *parC* и *parE* (соответствующие гены *parC* и *parE*). Гены обоих ферментов локализованы на бактериальной хромосоме.

Основой формирования резистентности к хинолонам являются мутации в генах *gyrA* и *parC*.

Принципиальным моментом является то, что мутации в одном или двух генах могут накапливаться, что сопровождается ступенчатым снижением сродства ферментов к хинолонам и повышением МПК. Единичные мутации приводят к развитию устойчивости только к нефторированным хинолонам (налидиксовой кислоте и др.) и сопровождаются незначительным, с клинической точки зрения повышением МПК (в 2—4 раза) фторхинолонов. Высокий уровень устойчивости грамотрицательных микроорганизмов к фторхинолонам (МПК > 64,0 мг/л) обычно связан с двумя и более мутациями в одном или обоих чувствительных ферментах.

**Активное выведение.** В последние годы накапливаются данные о широком распространении среди грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов устойчивости, связанной с активным выведением хинолонов. У штаммов с высоким уровнем устойчивости к фторхинолонам этот механизм часто сочетается с модификацией мишеней.

В России устойчивость к фторхинолонам (ципрофлоксацину и офлоксацину) является реальной проблемой при лечении нозокомиальных инфекций. Быстрее всего резистентность формируется у штаммов *P. aeruginosa*. Появляются данные о росте устойчивости к фторхинолонам среди пневмококков.

## Макролиды и линкосамиды

**Модификация мишени действия.** Основной мишенью действия макролидных и линкосамидных антибиотиков является 50S субъединица бактериальной рибосомы. Несмотря на различия в структуре, все эти антибиотики имеют общий участок связывания с рибосомой. У большинства бактерий устойчивость возникает в результате метилирования 23S-субъединицы рРНК. Известно около 20 генов (*erm* — erythromycin

ribosome methylation), кодирующих фермент метилазу, они ассоциированы с транспозонами и могут локализоваться как на плазидах, так и на хромосомах. Метилазы широко распространены среди многих аэробных и анаэробных грамположительных и грамотрицательных бактерий. Описано два варианта синтеза метилазы:

конститутивный и индуцибельный. При конститутивном типе синтез фермента не зависит от внешних условий. Соответственно, бактерии проявляют устойчивость ко всем макролидам и линкосаидам. При индуцибельном типе синтез фермента для его начала необходима индукция. Синтез стрептококковых метилаз индуцируется всеми макролидами и линкосаидами, соответственно микроорганизмы проявляют устойчивость ко всем перечисленным антибиотикам. В отличие от этого, синтез стафилококковых метилаз способен индуцировать только 14- и 15-членные макролиды, соответственно микроорганизмы проявляют устойчивость к перечисленным антибиотикам, но сохраняют чувствительность к 16-членным макролидам и линкосаидам. Таким образом, в клинической практике могут встречаться стафилококки устойчивые как ко всем макролидам и линкосаидам, так и только к 14- и 15-членным макролидам.

У ряда микроорганизмов (*H. pylori*, *M. avium*, *M. Intracellulare*, *Propionibacterium spp.*) известен и другой механизм модификации мишени для макролидов и линкосаидов — в результате мутаций в 23S-субъединицы рРНК снижается сродство к антибиотикам и формируется клинически значимая устойчивость. При этом механизме наблюдают перекрестную резистентность ко всем макролидам и линкосаидам.

**Активное выведение.** Активное выведение макролидов и линкосаидов осуществляют несколько транспортных систем. Основное клиническое значение имеет система выведения, кодируемая *mef*-геном, распространенная среди *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* и многих других грамположительных бактерий. Соответствующий белок-транспортер выводит 14- и 15-членные макролиды и обеспечивает не высокий уровень резистентности. Значение этого механизма резистентности окончательно не установлено. Линкосаиды и 16-членные макролиды сохраняют активность.

Гены *mef* локализованы на хромосомах в составе конъюгативных элементов, что обеспечивает достаточно эффективное внутри- и межвидовое распространение.

**Ферментативная инактивация.** Ферменты, инактивирующие макролиды и линкосаиды, описаны среди грамположительных и

грамотрицательных микроорганизмов. Некоторые из них обладают широким субстратным профилем (макролидфосфотрансферазы *E. coli* и *Staphylococcus* spp.), другие инактивируют только отдельные антибиотики (эритромицин-эстеразы, распространенные среди семейства *Enterobacteriaceae*, линкомицинацетилтрансферазы стафилококков и энтерококков). Распространение и клиническое значение ферментов, инактивирующих макролидные антибиотики, невелико.

В России устойчивость к макролидам и линкосамидам закономерно распространена среди метициллинорезистентных стафилококков. Среди метициллиночувствительных стафилококков частота устойчивости, как правило, не превышает 10 %.

В Европе в последние годы наблюдается тенденция к росту устойчивости к макролидам среди *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, что связывают со значительным увеличением объема применения современных макролидов (азитромицина, кларитромицина, рокситромицина) в качестве препаратов первого выбора. Целесообразность такого расширения показаний вызывает дискуссии.

Надежных данных о многолетней динамике устойчивости *S. pneumoniae* и *S. pyogenes* к макролидам в России нет. Однако фиксируемый в последние годы уровень частоты устойчивости 8-12 %, должен вызывать настороженность.

### **Тетрациклины**

**Активное выведение.** Этот механизм является наиболее распространенным среди грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов. Детерминанты резистентности обычно локализованы на плазидах, что обеспечивает их быстрое внутри- и межвидовое распространение. Часть генов и соответствующие белки (TetA — TetE) распространены среди грамотрицательных бактерий, другие (TetK, TetL) среди грамположительных.

**Защита рибосомы.** Известно семейство защитных белков, которые позволяют бактерии синтезировать белок, несмотря на связывание с рибосомой молекулы тетрациклина. Механизм подобной защиты неизвестен. Описано, по меньшей мере, 5 генов, кодирующих защитные белки, они распространены среди грамотрицательных и грамположительных бактерий и детерминируют устойчивость ко всем тетра-циклинам.

Частота устойчивости к тетрациклинам среди клинически наиболее значимых микроорганизмов достаточно высока, что не позволяет рассматривать их как средства выбора для лечения большинства инфекций.

## Гликопептиды

**Модификация мишени, действия.** Механизм действия гликопептидов заключается в блокировании завершающей стадии синтеза пептидогликана путем связывания молекулы антибиотика с концевыми аминокислотами и боковой пептидной цепочке (D-аланин-D-аланин).

Механизм устойчивости к гликопептидам наиболее детально изучен у энтерококков, он связан с синтезом бактериями модифицированной боковой полипептидной цепи.

Известны три фенотипа устойчивости: VanA, VanB и VanC. Детерминанты устойчивости фенотипа VanA локализируются на плазидах, а фенотипа VanB — в основном на хромосомах. Для фенотипа VanA характерен высокий уровень устойчивости к ванкомицину и тейкопланину, для VanB — переменная резистентность к ванкомицину и чувствительность к тейкопланину. Фенотип VanC характерен для *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* и *E. faecalis*, проявляющих природно низкий уровень устойчивости к ванкомицину.

Устойчивость энтерококков к гликопептидам является серьезной проблемой в отделениях интенсивной терапии в США и Западной Европе. Чаще всего устойчивость отмечают у штаммов *S. faecium*, ее частота может достигать 15-20 %. Достоверных данных о выделении ванкомицинорезистентных энтерококков в России нет.

Сообщения о выделении единичных штаммов метициллинорезистентных и метициллиночувствительных *S. aureus* со сниженной чувствительностью к ванкомицину (GISA) появились в Японии и США только в последние годы. Для штаммов со сниженной чувствительностью характерно утолщение клеточной стенки, уменьшение аутолитической активности. Обсуждается возможность избыточной продукции мишеней действия гликопептидов. Снижение чувствительности к гликопептидам было описано ранее среди коагулазонегативных стафилококков.

На практике при выделении ванкомицино-резистентных энтерококков и стафилококков необходимо проявлять настороженность, тщательно проверять чистоту исследуемой культуры и точность ее идентификации. Так, необходимо иметь в виду, что некоторые грамположительные бактерии обладают природной устойчивостью к гликопептидам: *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp.

### **Сульфаниламиды и ко-тримоксазол**

Сульфаниламиды и триметоприм блокируют различные этапы одного метаболического пути бактерий — синтез фолиевой кислоты, благодаря чему между ними отмечается выраженный синергизм. Сульфаниламиды, являющиеся структурным аналогом пара-аминобензойной кислоты, являются конкурентными ингибиторами дигидроптеоратсинтетазы. Триметоприм подавляет активность дигидрофолатредуктазы.

**Формирование метаболического шунта.** Устойчивость к триметоприму может являться результатом приобретения генов дигидрофолатредуктазы, нечувствительной (или малочувствительной) к ингибции, а устойчивость к сульфаниламидам — генов дигидроптеоратсинтетазы. Известно несколько типов каждого из устойчивых ферментов, но их происхождение не совсем ясно.

Гены ферментов, устойчивых к ингибированию, часто находятся в составе подвижных генетических элементов (транспозонов) в ассоциации с генами, детерминирующими устойчивость к другим антибиотикам.

**Модификация мишени, действия.** Устойчивость может также сформироваться в результате мутаций в генах указанных ферментов.

### **Хлорамфеникол**

Ферментативная инактивация (ацелирование) является основным механизмом устойчивости к хлорамфениколу. Гены ферментов — хлорамфениколацетил-трансфераз, как правило, локализуются на плазидах. и входят в состав транспозонов в ассоциации с генами устойчивости к другим антибиотикам.

### **Полимексины**

Полимексины оказывают бактерицидное действие на грамотрицательные бактерии, нарушая целостность цитоплазматической мембраны, действуя подобно поверхностно активным веществам. Приобретенная устойчивость отмечается редко.

### **Нитрофураны**

Механизм действия нитрофуранов изучен недостаточно полно. Считается, что приобретенная устойчивость к этим препаратам встречается крайне редко, о ее механизмах можно судить лишь предположительно.

### **Нитроимидозолы**

Нитроимидазолы активируются в микробной клетке ферментом нитроредуктазой, возникающие при этом свободные радикалы, повреждают

ДНК бактерий. Устойчивость у подавляющего большинства анаэробных бактерий отмечается крайне редко и не имеет практического значения.

Реальные клинические проблемы возникают при развитии устойчивости у *H. pylori*, обусловленной инактивацией нитроредуктазы в результате мутаций в соответствующих генах.

### **МНОЖЕСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ, СВЯЗАННАЯ СО СНИЖЕНИЕМ ПРОНИЦАЕМОСТИ**

Снижение проницаемости внешних структур бактериальной клетки является наименее специфичным механизмом устойчивости и, обычно, приводит к формированию устойчивости одновременно к нескольким группам антибиотиков.

Чаще всего причиной этого явления становится полная или частичная утрата пориновых белков. Кроме этого, относительно хорошо изучена система MAR (multiple antibiotic resistance — множественная устойчивость к антибиотикам). На фоне применения тетрациклинов или хлорамфеникола формируется устойчивость не только к этим антибиотикам, но и к в-лактамам и хинолонам. Активация MAR системы приводит к одновременному снижению количества одного из пориновых белков (OmpF) и повышению активности одной из систем активного выведения.

Снижение проницаемости за счет утраты или снижения количества пориновых белков встречается в ассоциации с продукцией в-лактамаз расширенного спектра. Утрата одного из пориновых белков (D2) *P. aeruginosa* приводит к избирательному снижению чувствительности микроорганизма к имипенему.

#### **Возбудители внебольничных инфекций**

*Staphylococcus* spp. — устойчивость к природным и полусинтетическим пенициллинам, связанная с продукцией в-лактомаз.

*S. pneumoniae* — устойчивость различного уровня к пенициллину (часть штаммов устойчива к цефалоспорином III поколения), связанная с модификацией ПСБ; высокая частота ассоциированной устойчивости к макролидам, тетрациклинам, ко-тримоксазолу.

*Shigella* spp. — устойчивость к ампициллину, тетрациклином, ко-тримоксазолу, хлорамфениколу.

*Salmonella* spp. — устойчивость к ампициллину, ко-тримоксазолу, хлорамфениколу. Появление устойчивости к цефалоспорином III поколения и фторхинолонам.

*E. coli* — при внебольничных инфекциях МВП — возможна

устойчивость к ампициллину, ко-тримоксазолу, гентамицину.

**Возбудители, ноюкомиальных инфекций**

*Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *S. mal-tophilla* — ассоциированная устойчивость к цефалоспорином, аминогликозидам, фторхинолонам, иногда карбапенемам.

*Enterococcus* spp. — ассоциация устойчивости к пенициллинам, высокого уровня устойчивости к аминогликозидам, фторхинолонам и гликопептидам.

*Staphylococcus* spp. (метициллинорезистентные) — ассоциированная устойчивость к макролидам, аминогликозидам, тетрациклинам, ко-тримоксазолу, фторхинолонам.

## 7.0 СОСТОЯНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ В РОССИИ

На протяжении последних лет во всем мире отмечается значительный рост устойчивости возбудителей внебольничных и нозокомиальных инфекций к антибактериальным препаратам. При этом следует принимать во внимание уровень проблемы: глобальный, региональный или локальный (стационар, отделение).

Прежде всего, необходимо учитывать глобальные тенденции в развитии антибиотикорезистентности. Например, появление и широкое распространение метициллинорезистентных стафилококков, пенициллинорезистентных пневмококков, устойчивости у клебсиелл вследствие продукции в-лактамаз расширенного спектра действия. При этом следует помнить, что антибиотикорезистентность не является тотальной, не распространяется на все микроорганизмы и препараты. Так, *S. pyogenes* всегда чувствительны к в-лактамным антибиотикам; *H. influenzae* - к цефотаксиму или цефтриаксону.

При всей важности учета глобальной картины при планировании политики антибиотикотерапии более рационально опираться на данные, полученные в конкретной стране (региональные данные). Несомненно, что в такой огромной стране, как Российская Федерация, существуют различные уровни антибиотико-резистентности на отдельных территориях. В связи с этим неоспоримо значение территориального мониторинга резистентности и целевое доведение его результатов до врачей различных специальностей.

В России определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам сопряжено с большим числом проблем, главной из которых является отсутствие стандартизированных методик тестирования. Единственные существующие в нашей стране официальные рекомендации — “Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков” Минздрава СССР (1983 г.) — не описывают методики определения чувствительности “прихотливых” микроорганизмов, в частности *S. pneumoniae*, *H. Influezae* и *N. gonorrhoeae*, не включают критерии интерпретации для современных антибиотиков (цефалоспорины, фторхинолоны, карбапенемы). Более того специальные исследования показали, что рекомендуемая в этих документах среда АГВ непригодна для определения чувствительности к ряду антибактериальных препаратов.

В связи с этим значительное число данных о различиях чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, полученных в микробиологических лабораториях страны, не могут быть оценены и проанализированы. С осторожностью также следует относиться к публикациям, в которых отсутствует информация о методах определения чувствительности и критериях интерпретации.

В данной главе приведены результаты только тех исследований, которые выполнялись в соответствии с наиболее часто используемыми в мире стандартами NCCLS. Для удобства восприятия и учитывая сложившуюся клиническую практику, рассматриваемые микроорганизмы были подразделены на внебольничные и нозокомиальные.

### 7.1 Возбудители внебольничных инфекций

*Streptococcus pneumoniae*. В последнее десятилетие отмечается появление и распространение в ряде стран пенициллинорезистентных пневмококков, а также штаммов, устойчивых к макролидным антибиотикам, хлорамфениколу, тетрациклинам и ко-тримоксазолу. При этом в некоторых регионах резистентность к макролидам превалирует над устойчивостью к пенициллину.

У здоровых детей дошкольного возраста из организованных коллективов (Москва, Смоленск и Ярцево) в среднем 7,5 % пневмококков, выделенных из носоглотки, были умеренно резистентны к пенициллину (МПК 0,12—1 мг/л). Не было обнаружено штаммов с высоким уровнем резистентности (МПК > 2 мг/л). Все штаммы с умеренной устойчивостью к пенициллину были чувствительны к амоксициллину/клавуланату. Уровень

резистентности к макролидным антибиотикам составил 4,6 % . Наиболее высокий уровень резистентности был отмечен к ко-тримоксазолу — 56,8 % пневмококков.

По предварительным данным многоцентрового исследования "ПеГАС-1" умеренно резистентные к пенициллину штаммы составили 9 % , также не были обнаружены пневмококки с МПК > 2 мг/л. Все штаммы с промежуточной устойчивостью к пенициллину сохраняли чувствительность к цефалоспорином. Частота резистентности к эритромицину составила 3,6 % . Наиболее существенной проблемой является устойчивость *S. pneumoniae* к тетрациклину (64,9 %) и к ко-тримоксазолу (62,2 %).

*Streptococcus pyogenes*. БГСА высокой и полной чувствительностью к пенициллинам и цефалоспорином. в-лактамы остаются единственным классом антибиотиков, к которым у *S. pyogenes* не развилась резистентность. Актуальной Проблемой является устойчивость к макролидам, которая в некоторых регионах мира превышает 30 %.

В России резистентность к макролидам составляет 12,6 % (таб. 10). Основное клиническое значение имеет резистентность к тетрациклинам, превышающая 60 %.

Таблица 10.

Антибиотик	Чувствительность	Умеренность, %	Резистентность, %	МПК	Диапазон МПК мг/л
Пенициллин	100,0	0,0	0,0	0,016	0,012 – 0,032
Амоксициллин	100,0	0,0	0,0	0,023	0,016 – 0,032
Цефуроксим	100,0	0,0	0,0	0,023	0,016 – 0,125
Тетрациклин	38,8	1,0	00,2	1,28	0,125 – 256
Эритромицин	87,4	2,9	9,7	0,79	0,16 – 3
Клиндамицин	98,1	1,9	9,0	0,125	0,017- 0,38

*Haemophilus influenzae*. Основным механизмом устойчивости *H. influenzae* к аминопенициллинам (ампициллину и амоксициллину) является продукция плазмидных  $\beta$ -лактамаз. Согласно данным, полученным при исследовании в Москве, Смоленске и Ярцево (таблица 11), продукция  $\beta$ -лактамаз пока не является существенной проблемой.

Таблица 11.

Чувствительность *H. influenzae* к антибактериальным препаратам (1998 г.)

Антибиотик	Чувствительность, %	Умеренность, %	Резистентность, %	МПК	Диапазон МПК мг/л
Ампициллин	97,7	1,3	1,0	0,38	0,016 - 128
Амоксициллин /клавуланат	99,3	0,0	0,7	1	0,016 - 8
Цефаклор	97,7	1,3	1	3	0,25 - 32
Эритромицин	-	-	-	8	1 - 16
Ко-тримоксазол	79,1	0,6	20,3	32	0,016 - 32

Наиболее логично имеет резистентность *H. influenzae* к ко-тримоксазолу, которая составляет 20,3 %.

*Neisseria gonorrhoeae*. Определение чувствительности гонококков представляет трудную задачу и требует использования специальных питательных сред, поэтому в России практически отсутствуют достоверные данные об антибиотикорезистентности этих микроорганизмов.

В пилотном исследовании (Смоленск, 1999) резистентность гонококков к пенициллину составила 77,9 % , к доксициклину — 96,1 %. К ципрофлоксацину были умеренно резистентны 1,3 % штаммов. Не было выявлено резистентности гонококков к цефтриаксону.

*Escherichia coli*. Наиболее частым возбудителем внебольничных инфекций МВП являются *E. coli*. В 1998 году в Москве, Смоленске и Новосибирске было проведено исследование МВП у женщин находящихся на амбулаторном лечении (рис. 2).

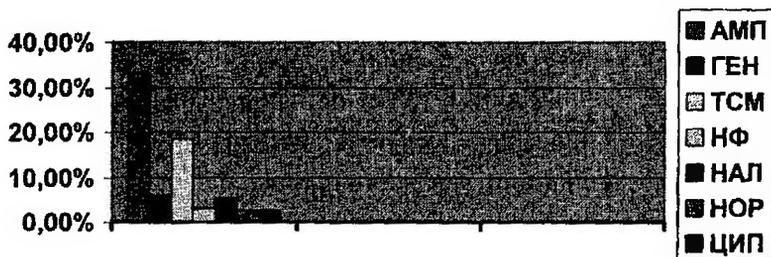


Рисунок 2 Резистентность к антибиотикам *E. coli* в России: АМП-ампицилин, ГЕН-гентамицин, ТСМ-ко-тримоксазол, НФ-нитрофурантоин, НАЛ-налидиксовая кислота, НОР-норфлоксацин, ЦИП-ципрофлоксацин.

Как следует из представленных данных, наиболее высокий уровень резистентности наблюдался к ампициллину (33,3 %) и ко-тримоксазолу (18,4 %). Наименьшая устойчивость отмечалась к фторхинолонам — норфлоксацину (2,6 %) и ципрофлоксацину (2,6 %).

*Shigella flexneri* и *Shigella sonnei*. Было проведено исследование чувствительности *Shigella* spp., выделенных в Смоленской области в 1998-1999 гг. Штаммы *S. flexneri*, полученные в 1998 г., были практически полностью устойчивы к ампициллину (95 %), ампициллину/сульбактаму (95 %), ко-тримоксазолу (98 %), хлорамфениколу (98%) и тетрациклину (98 %).

*S. sonnei*, выделенные в том же исследовании, отличались меньшей резистентностью к ампициллину (7 %), однако устойчивость к другим антибиотикам существенно не отличалась: ко-тримоксазол — 100 %, хлорамфеникол — 72 % и тетрациклин — 93 %. Все штаммы *Shigella* spp. были чувствительны к налидиксовой кислоте и ципрофлоксацину.

Результаты исследования чувствительности шигелл, выделенных в 1999 г. в Смоленске и Москве, представлены в табл. 12.

Таблица 12.

Резистентность (%) *Shigella* spp. к антибактериальным препаратам (Смоленск, Москва, 1999 г.)

Микроорганизмы	АМ	АМС	ТСМ	ХФ	ТЕТ	НАЛ	ЦИН
	П						
<i>S. flexneri</i>	95,7	94,6	97,9	92,5	98,9	1,1	0,0
<i>S. sonnei</i>	34,7	34,7	95,1	38,6	93,1	0,0	0,0

Сокращения: АМП — ампициллин, АМС — ампициллин/сульбактам, ТСМ — ко-тримоксазол, ХФ — хлорамфеникол, ТЕТ — тетрациклин, НАЛ — налидиксовая кислота, ЦИП — ципрофлоксацин.

Как видно из табл. 12, существенных изменений в уровне антибиотикорезистентности *S. flexneri* не произошло. Исключением является значительный рост резистентности *S. sonnei* к ампициллину и ампициллину/сульбактаму — с 7 % в 1998 г. до 35 % в 1999 г.

Представленные в табл. 14. данные о резистентности шигелл, выделенных в Екатеринбурге, также показывают, что *S. sonnei* были менее резистентны к пенициллинам и тетрациклину по сравнению с *S. flexneri*. Исключение представляет ко-тримоксазол, к которому резистентность у *S. sonnei* была значительно выше. Особый интерес представляют данные о резистентности шигелл к ципрофлоксацину.

Таблица 13.

Резистентность (%) *Shigella* spp. к антибактериальным препаратам (Екатеринбург, 1999 г.)

Микроорганизмы	АМ	АМС	ТСМ	ЦФТ	ТЕТ	ЦИН
	П					
<i>S. flexneri</i>	98,1	98,1	73,6	0,0	91,8	3,8
<i>S. sonnei</i>	7,3	7,3	97,6	0,0	66,7	4,9

Сокращения: АМП — ампициллин, АМС — ампициллин/сульбактам, ТСМ — ко-тримоксазол, “ЦФТ - цефтриаксон, ТЕТ — тетрациклин, ЦИП - ципрофлоксацин.

*Salmonella* spp. Как видно из табл. 14. антибиотикорезистентность у сальмонелл пока не представляет реальной угрозы. Не было выявлено штаммов, устойчивых к цефотаксиму, ципрофлоксацину и ко-тримоксазолу.

Наибольшая резистентность наблюдалась к тетрациклину (10,5 %) и хлорамфениколу (9,5 %)

Таблица 14.

Резистентность (%) *Salmonella* spp. к антибактериальным препаратам (Смоленск, 1999 г.)

Микроорганизмы	АМ П	АМС	ЦТМ	НАЛ	ЦИП	ХФ	ТЕТ	ТСМ
<i>S. enteritidis</i>	2,7	2,7	0	2,7	0	6,7	4	0
<i>Salmonella</i> spp.	6,3	6,3	0	3,2	0	9,5	10,5	0

Сокращения: АМП—ампициллин, АМС—ампициллин/сульбактам, ЦТМ—цефотаксим, НАЛ—нальдиксовая кислота, ЦИП—ципрофлоксацин. ХФ—хлорамфеникол, ТЕТ—тетрациклин, ТСМ—ко-тримоксазол.

Однако представленные данные не отражают всей картины антибиотикорезистентности в России. Так в Санкт-Петербурге в 1996 г. были выделены клинические штаммы *S. typhi*-тигитум и изоляты из окружающей среды, резистентные к цефотаксиму. В Екатеринбурге в 1999 г. 16,7 % сальмонелл были резистентны к ампициллину и ампициллину/сульбактаму, 13,8 % к тетрациклину и 6,1 % к ко-тримоксазолу. Все исследованные штаммы были чувствительны к фторхинолонам. Кроме того, выделен клинический штамм, устойчивый к цефалоспорином III поколения, но чувствительный к фторхинолонам и ко-тримоксазолу.

Таким образом исследование показало, что в последние годы наблюдается выраженная тенденция роста множественной устойчивости в целом и, особенно к двум основным препаратам для лечения туберкулеза: изониазиду и рифампицину.

## 7.2 Возбудители госпитальных инфекций

В многоцентровом исследовании чувствительности стафилококков в Москве и Санкт-Петербурге (1998 г.) были выявлены выраженные различия в распространении метициллинорезистентных стафилококков в отдельных стационарах, при этом устойчивость к оксациллину значительно чаще

встречалась среди КНС (от 0 до 65,9 %), чем среди *S. aureus* (от 0 до 40 %). В целом в Москве частота выделения метициллинорезистентных стафилококков составила 33,4 %, в Санкт-Петербурге — 4,1 %. Все резистентные к оксациллину стафилококки были чувствительны к ванкомицину, а 95 %, 84 % и 70 % штаммов MRSA были чувствительны к фузидиевой кислоте, рифампицину и цiproфлоксацину соответственно (по сравнению с 80 %, 85 % и 61 % для КНС соответственно).

*Enterococcus spp.* В исследовании, проведенном в Москве и Санкт-Петербурге в 1995-1996 гг., было выявлено 16 % *S. faecalis*, резистентных к ампициллину, при этом наблюдались значительные различия частоты устойчивости между отдельными лечебными учреждениями. Высокий уровень резистентности к аминогликозидам составил 44 % к стрептомицину и 25 % к гентамицину. Не было выявлено умереннорезистентных или резистентных к ванкомицину штаммов энтерококков. В отличие от *S. faecalis*, 75 % штаммов *S. faecium* было устойчиво к ампициллину, чувствительность к другим антибиотикам существенно не отличалась.

Эпидемиологической целью было проведено определение чувствительности штаммов энтерококков, выделенных из кала у детей, находящихся в отделении выхаживания недоношенных новорожденных. Результаты определения *in vitro* активности антибиотиков приведены в табл. 15.

Таблица 15.

Активность антибиотиков.

Антибиотик	<i>S. faecalis</i> (N=33)	<i>S. faecium</i> (N=61)
Ампициллин	3	77
Гентамицин	0	64
Стрептомицин	3	56
Ванкомицин	9	10
Хлорамфеникол	39	54
Рифампицин	38	93
Хинупристин/дальфопристин	15	3

В целом *S. faecium* отличались более высокой резистентностью к тестируемым антибиотикам, за исключением ванкомицина, активность которого в отношении всех энтерококков была сравнимой, и хинупристина/дальфопристина (3 % резистентных против *S. faecium* 15 % *S. faecalis*). Только 3 % *S. faecalis* были устойчивы к ампициллину, в отличие от 77 % *S. faecium*. Большинство *S. faecium* демонстрировали высокий уровень резистентности к аминогликозидам (64 % к гентамицину и 56 % к стрептомицину).

**Семейство Enterobacteriaceae.** Резистентность бактерий семейства *enterobacteriaceae* широко варьирует между отдельными стационарами, во многом являясь отражением политики назначения антибактериальных препаратов.

Резистентность к антибактериальным препаратам наиболее частых грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций, подученная в исследовании NPRS-1997 (Москва, Санкт-Петербург, Смоленск, Краснодар, Казань, Нижний Новгород, Екатеринбург, Новосибирск, Красноярск), представлена в табл. 16.

Таблица 16.

Резистентность к антибактериальным препаратам (%) грамотрицательных бактерий в отделениях интенсивной терапии

Антибиотик	Россия (NPRS-1997 г.)				
	E.coli	K. pneumoniae	P. mirabilis	Enterobacter spp.	Acinetobacter spp.
Пиперациллин	44	85	59	70	88
Пиперациллин/тазобактам	11	51	22	63	82
Амоксициллин/клавуланат	27	52	20	88	73
Цефуроксим	19	52	32	82	96
Цефотаксим	6	32	20	60	88
Цефтриаксон	5	33	17	57	94
Цефтазидим	3	26	1	56	78
Имиценом	0	0	0	0	0

Гентамицин	13	58	56	42	91
Амиксацин	1	0	1	4	7
Ципрофлоксац ин	1	2	5	5	53
Ко- тримоксазол	27	51	62	12	88

Уровень резистентности к пиперацилину колебался от -14 % у *E. coli* до 88 % у *Acinetobacter* spp.; к пиперациллину/тозабактаму — от 11 % у *E. coli* до 82% у *Acinetobacter* spp. Обращает внимание довольно высокая устойчивость к цефалоспорином III поколения у *K. pneumoniae* (26 33 %), вследствие продукции в-лактамаз расширенного спектра действия, и *Enterobacter* spp. (56 - 60 %). Необходимо отметить очень высокую частоту резистентности к гентамицину, варьирующую от 13 % у *E. coli* до 91 % у *Acinetobacter* spp. Наименьшая резистентность отмечалась к ципрофлоксацину, амикацину и имипенему.

В исследовании «Micromax» (табл. 17.), выполненном в 1998 г. в 8 стационарах Москвы, Смоленска, Екатеринбурга, была обнаружена низкая частота устойчивости *E. coli* и *Proteus* spp. к в-лактамным антибиотикам с незначительными различиями между отдельными центрами. В то же время для *Klebsiella* spp. отмечалась высокая резистентность к цефалоспорином III поколения (в среднем 40 % к цефтриаксону и 31 % к цефтазидиму). Резистентность к цефепиму была почти в два раза меньше — 16 %.

Таблица 17.

**Резистентность к антибактериальным препаратам (%)  
нозокомиальных грамотрицательных бактерий (исследование  
“Micromax”, 1999 г.)**

Антибиотик	<i>E. coli</i>	<i>Proteus</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.
Пиперациллин/таз обактам	3	1	17
Цефтриаксон	13	10	40
Цефтазидим	5	3	31

Цефтазидим	5	3	31
Цефепим	3	3	16
Имипенем	0	0	0
Ципрофлоксацин	12	15	14

Не было выявлено штаммов кишечных палочек, протеев и клебсиелл, устойчивых к имипенему.

*Pseudomonas aeruginosa*. В многоцентровом исследовании NPRS-1997 до 50 % штаммов *P. aeruginosa* были устойчивы к пиперациллину, 41 % — к пиперациллину/тазобактаму и более 10 % — к цефтазидиму. Резистентность к имепинему была сравнительно низкой (0-11 %) во всех участвовавших центрах. К гентамицину резистентность составила 75 % по сравнению с 7 % к амикацину. От 6 % до 42 % (в среднем 15 %) штаммов синегнойной палочки были устойчивы к ципрофлоксацину.

Исследование в Москве показало высокую частоту устойчивости *P. aeruginosa* к антисинегнойным в-лактамам: 45 % к пиперациллину/тазобактаму, 55 % к цефтазидиму, 47 % к цефепиму. Наименьшая резистентность была зарегистрирована к карбапенемам (имипенем — 18 %, меропенем — 19 %). Следует отметить высокую частоту устойчивости *P. aeruginosa* к ципрофлоксацину (45 %). Из аминогликозидов наибольшей активностью отличался амикацин (11% резистентных штаммов), тогда как более 60 % штаммов были устойчивы к гентамицину.

В заключение следует отметить, что приведенные в настоящей главе сведения, разумеется, не могут считаться исчерпывающими и далеко не в полной мере отражают состояние антибиотикорезистентности бактерий в России. Поэтому так важно проводить постоянный мониторинг антибиотикорезистентности с обобщением методически корректных данных.

## 8.0 ОБЩИЕ ПРАВИЛА ЗАБОРА, ХРАНЕНИЯ И ПЕРЕСЫЛКИ МАТЕРИАЛА

Результаты диагностики многих микробами обусловленных заболеваний во многом зависят от правильного выбора материала и соблюдения следующих условий его забора, доставки, хранения и обработки.

1. Вид материала определяется клинической картиной заболевания, т.е.

он должен соответствовать локализации предполагаемого возбудителя на данном этапе патогенеза болезни. Например, при бронхолегочных заболеваниях для исследования берут мокроту, при поражениях мочевой системы - мочу. В случаях отсутствия или неясности локальных очагов для исследования берут кровь.

2. Собирают достаточное количество материала (например, при исследовании крови берут 5 - 10 мл крови).

3. Материал берут по возможности в начальном периоде болезни, так как именно в этот период возбудители выделяются чаще, их больше, они имеют более типичную локализацию. Ранний этиологический диагноз предполагает более раннее и, следовательно, более эффективное лечение и профилактику новых случаев болезни.

4. Забор материала должен осуществляться до начала антимикробной терапии. Если такая терапия начата, то ее при необходимости надо прервать на 1-2 дня, а потом производить забор материала. Также поступают при повторных исследованиях.

5. Необходимо предупредить возможную контаминацию материала собственной нормальной микрофлорой больного и микробами окружающей среды. Для этого получение материала должно проводиться в асептических условиях, в процедурном кабинете, стерильными инструментами, в стерильную посуду. Кроме того, пути, через которые выделяется или берется материал, должны быть максимально освобождены от нормальной микрофлоры, например, прополаскивание полостей рта и глотки при взятии мокроты, промывание входа в уретру при заборе мочи, удаление поверхностных масс язвы, гнойной раны и др.

6. Следует предупредить возможность попадания в материал антимикробных препаратов (дезинфектантов, антисептиков, антибиотиков); а также исключить контакт с металлами, обладающими олигодинамическим действием, с ватой, содержащей свободные жирные кислоты.

7. Любой клинический материал должен расцениваться как потенциально опасный для человека. Поэтому при его заборе, хранении, доставке, обработке во избежание заражения должны соблюдаться такие же меры техники безопасности, как в бактериологической лаборатории.

Таблица 18.

**Показания к бактериологическим исследованиям различного  
клинического материала**

Исследуемый материал	Показания к исследованию	Сроки взятия проб
1	2	3
<i>Испражнения</i>	Ранняя диагностика острых кишечных заболеваний, в том числе с целью подтверждения диагноза при клиническом диагнозе брюшного тифа, паратифов. Контроль при выписке из лечебного учреждения, подтверждение клинического диагноза. По эпидемиологическим показаниям, профилактические обследования декретированных контингентов.	С начала заболевания. Период реконвалесценции.  По усмотрению эпидемиолога и санитарного врача.
Кровь	Ранняя диагностика брюшного тифа, паратифов. <b>Лихорадочные состояния неустановленной этиологии.</b> <b>Клиническая картина сепсиса.</b> Ранняя диагностика сальмонеллезов.	С начала заболевания.  По указанию клинициста.  По указанию клинициста. По усмотрению клинициста и эпидемиолога.
Моча	При клиническом диагнозе брюшного тифа и паратифов с целью подтверждения диагноза. Выявление бактерионосителей.  Острые и хронические гнойно-воспалительные заболевания мочевыводящей системы неустановленной этиологии.	С конца 2-ой недели.  По указанию эпидемиолога.  По усмотрению клинициста.
Желчь и дуоденальное содержимое	Выявление носителей сальмонелл.  Острые и хронические гнойно-воспалительные заболевания желчевыводящей системы неустановленной этиологии.	По указанию эпидемиолога.  По усмотрению клинициста.
Рвотные массы и промывание воды	Клинические проявления гастроэнтерита.	В остром периоде.
Соскоб розеол	Для подтверждения клинического диагноза брюшного тифа и паратифов, как вспомогательный метод (при отсутствии гемо-, копро- и уринокультур).	При наличии розеол.

Гной, пунктаты органов, экссудат	Наличие местных гнойно-воспалительных процессов в организме, осложняющих течение основного заболевания или в отсутствии такового.	По указанию клинициста.
----------------------------------	---	-------------------------

Собранный материал необходимо доставлять в лабораторию без промедления. При транспортировке материала надо следить, чтобы жидкость не смачивала пробки. Каждый образец материала этикеткируют.

В предварительном документе излагаются следующие данные:

- наименование учреждения, направляющего материал;
- фамилия, имя, отчество, возраст обследуемого;
- адрес;
- место работы;
- должность (если материал взят у ребенка, то указать какое детское учреждение посещает);
- дата заболевания, диагноз и другие показания к анализу;
- дата и время сбора материала;
- фамилия и должность лица, собиравшего материал.

Должны быть точно указаны задачи исследования, чтобы в лаборатории были применены соответствующие методы обработки и питательные среды.

Следует помнить, что успех бактериологического исследования зависит, прежде всего, от правильного забора и своевременной доставки в лабораторию исследуемого материала.

Тесная связь между бактериологом, клиницистом и эпидемиологом, направляющим материал для анализа, обеспечивает сознательное, плодотворное отношение к работе.

## 8.1. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 8.1.1 Кровь

Кровь исследуют для определения и идентификации бактериальных или других микроорганизмов (дрожжи, нитевидные грибы), свидетельствующих о бактериемии или фунгемии, что всегда является патологией. В норме у здорового человека кровь стерильна. Вместе с тем имеется несколько исключений: транзиторная бактериемия довольно часто на короткое время возникает после экстракции зуба или других

манипуляции, а также хирургических вмешательств на слизистых оболочках, контаминированных микроорганизмами, бронхоскопии или катетеризации уретры. Этот тип транзиторной бактериемии обусловлен в основном комменсалами и всегда купируется спонтанно в результате фагоцитоза.

Септицемия - клинический термин, используемый для описания бактериемии, вызванной инфекцией, клинические симптомы которой могут включать сильный озноб, лихорадку, недомогание, токсикоз и гипотензию; высшая форма проявления бактериемии - шок. Шок может быть обусловлен эндотоксином, продуцируемым грамотрицательными палочками.

### **Причины бактериемии**

1. Бактериемия является характерной особенностью некоторых инфекционных заболеваний, таких, как брюшной тиф, бруцеллез, лептоспироз.

2. Достаточно большое число локальных инфекций (локальных инфекционных процессов) часто сопровождается транзиторной бактериемией: менингиты, пневмонии, пиелонефриты, остеомиелиты, артриты, перитониты, холециститы, энтероколиты, травмы или постоперационные инфекции, открытые поражения кожи, язвы и др.

3. Бактериемия (фунгемия) может быть результатом поступления микроорганизмов при проведении внутривенных трансфузий с использованием контаминированных растворов, катетеров, игл.

4. Транзиторная бактериемия может быть результатом различных хирургических манипуляций, но всегда купируется спонтанно при условии, что оперируемый больной не страдает иммунодефицитом.

5. Длительная бактериемия является характерной чертой эндovasкулярных инфекций, таких, как эндокардит, инфицированная аневризма, тромбофлебит.

6. Бактериемия и фунгемия могут развиваться при использовании лекарственных препаратов, применяемых внутривенно. Они наиболее часто обусловлены "оппортунистическими" микроорганизмами и могут иметь серьезные последствия.

### **Взятие проб крови**

#### **Выбор времени взятия проб крови**

По возможности взятие крови следует проводить до назначения

антибиотиков. Лучше всего брать пробы, когда у пациента наблюдается озноб или пик температурной реакции. Рекомендуется забирать две или лучше три пробы с интервалом примерно в 1 ч (или меньше, если лечение нельзя откладывать). Более трех проб назначают исключительно редко. Преимущества повторного взятия проб крови:

- снижение риска упустить транзиторную бактериемию;
- возможность подтверждения этиологической роли выделенной из крови "сапрофитной микрофлоры" (например, *Staphylococcus epidermidis*), если эта микрофлора обнаруживается во множестве проб венозной крови.

После взятия проб крови и выделения микрофлоры следует провести эмпирический подбор антибиотиков для терапии. При необходимости после определения чувствительности культуры к различным антибиотикам можно выбрать наиболее эффективный препарат.

### Количество крови

Поскольку количество бактерий в 1,0 мл крови всегда незначительно, очень важно взять ее достаточное количество: у взрослых - 10,0 мл из вены; у детей - 2,0-5,0 мл; у новорожденных и детей неонатального периода чаще можно получить не более 1,0-2,0 мл крови из мочки уха, пяточки.

### Дезинфекция кожи

Участок кожи над веной, откуда будут брать кровь, должен быть тщательно обработан бактерицидным препаратом (настойки йода, 70% спирта или 0,5% хлоргексидина в 70% спирте), Дезинфектант должен испариться с поверхности кожи до взятия пробы крови. Если использовалась йодная настойка, ее следует стереть 70% спиртом для того, чтобы избежать раздражения кожи.

Даже после тщательной обработки кожных покровов некоторые бактерии остаются в глубоких слоях и могут проникнуть в кровь, например *S. epidermidis*, *Propionibacterium acnes* и даже споры клостридий. Псевдобактериемия (ложноположительные находки микробов в крови) может быть обусловлена использованием контаминированных антисептических растворов, шприцев или игл. Повторное выделение из крови "нетрадиционного, нехарактерного" микроорганизма (например, *Pseudomonas cepacia*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia spp.*) в одном и том же больничном учреждении может вызвать подозрение о внутрибольничной инфекции и стать поводом для проведения расследования. Другим источником контаминации является контакт иглы

с нестерильной ампулой (флаконом), если тот же самый шприц использовался вначале для химических анализов крови или им проводили манипуляции для определения скорости оседания эритроцитов.

#### **Антикоагулянт**

Кровь транспортируют в лабораторию в пробирке с добавлением стерильного антикоагулянта (цитрат, гепарин, ПСК - полианитол-сульфат калия). Как только такая кровь доставлена в лабораторию, она должна быть немедленно посеяна во флаконы со средой для культивирования в строго асептических условиях. Если не добавлялись антикоагулянты, сгустки крови в лаборатории можно в асептических условиях перенести в бульон, а сыворотку использовать для серологических исследований (например, реакция Видаля).

### **Среды для культивирования крови**

#### **Выбор жидкой питательной основы**

Жидкая питательная основа должна обеспечить наилучшие условия роста всех видов клинически значимых бактерий.

#### **Количество питательной основы.**

В идеале кровь смешивают с бульоном в соотношении 1:10 (5,0 мл крови и 50,0 мл питательного бульона); это делается для того, чтобы разбавить присутствующие в крови антибиотики и уменьшить бактерицидный эффект человеческой сыворотки.

#### **Флаконы для культивирования крови**

При культивировании крови флаконы заполняют средой и затем наполовину отворачивают крышки. Сверху крышки покрывают квадратиками алюминиевой фольги или коричневой бумаги. Флаконы помещают в автоклав на 20 мин при температуре 120 °С. Немедленно после автоклавирования, пока еще среда остается горячей, осторожно плотно закрывают флаконы крышками, не снимая с них фольгу или коричневую бумагу (в противном случае крышки окажутся нестерильными). Как только среда остынет, во флаконе образовывается неглубокий вакуум, который будет способствовать проницаемости мембран (крышек) для образцов крови.

Верхнюю часть крышки следует осторожно продезинфицировать до инокуляции флакона.

Перед использованием флаконов их внимательно проверяют на прозрачность. Если питательная среда окажется мутной, то она не подлежит использованию.

Когда предполагается обнаружить только аэробных бактерий (*Pseudomonas*, *Neisseria*) или дрожжи, флаконы, то их следует разгерметизировать, как только они будут получены из лаборатории. Для этого крышки меняют на стерильные ватно-марлевые пробки или протыкают предварительно простерилизованную мембрану снабженной ватно-марлевой заглушкой иглой. Иглу вынимают из пробки, как только во флаконе оно достигнет величины атмосферного давления. Флаконы со средой с кровью для культивирования, выпускаемые промышленным способом, также часто содержат углекислый газ, который обладает стимулирующим рост микроорганизмов действием.

### **Методика культивирования микроорганизмов , находящихся в крови**

#### ***Время инкубирования***

Флаконы для культивирования крови следует инкубировать при температуре 35-37 °С и дважды в день (хотя бы в течение первых трех дней) проверять на наличие микробного роста. О стерильности свидетельствует красный слой крови на дне флакона, покрытый бледно-желтым бульоном. О наличии микробного роста свидетельствует:

- помутнение либо всей среды, либо ее поверхностной части;
- хлопьевидный осадок на поверхности слоя крови;
- гемолиз;
- коагуляция бульона;
- пленка на поверхности;
- газообразование;
- белые крупинки на поверхности или внутри кровяного слоя. Как только визуально будет обнаружен микробный рост, флаконы следует асептически открыть; стерильной бактерицидной петлей или пастеровской пипеткой взять небольшое количество бульона, приготовить окрашенный по Граму мазок и исследовать его на наличие микроорганизмов.

Субкультивирование осуществляют путем посева полной бактериологической петли проросшего бульона на соответствующую питательную среду.

На грамотрицательную флору: среда Эндо, агар Клигlera с железом, полужидкий агар для определения подвижности, продукции индола и уреазной активности цитрат.

- Для стафилококков: кровяной агар, солевой агар с маннитом.
- На стрептококки: кровяной агар с оптохином, бацитрацином и диски с теллуридом, желчно-эскулиновый агар.

Для рутинных исследований нет необходимости проводить инкубацию крови более 7 дней. В некоторых случаях культивирование может быть продолжено еще в течение 7 дней; это целесообразно, если имеется подозрение на наличие бруцелл или других весьма требовательных к питательным средам микроорганизмов, в случаях эндокардитов или если пациент получает антибиотики.

#### “Слепое” культивирование и его окончание.

Рост некоторых микроорганизмов не сопровождается помутнением или другими видимыми изменениями бульона. Другие микроорганизмы, такие, как пневмококки, имеют тенденцию к аутолизу и быстро погибают. Для обнаружения таких микробов некоторые лаборатории проводят субкультивирование на шоколадном агаре путем инкубации посевов в течение 18-24 ч. “Слепое” субкультивирование может быть осуществлено по окончании 7-дневной инкубации путем переноса нескольких капель хорошо перемешанной кровяной среды (используя стерильную пастеровскую пипетку) в пробирку с тиогликолевым бульоном, который в свою очередь инкубируют и наблюдают в течение 3 дней.

#### Контаминанты

Загрязнения крови посторонней микрофлорой можно избежать, тщательно обрабатывая кожу пациента и скрупулезно соблюдая правила асептики при выполнении всех лабораторных процедур. Тем не менее даже в идеальных условиях 3-5% проб крови оказываются загрязненными посторонней микрофлорой, при этом с кожи могут попадать *S. epidermidis*, *P. acnes*, *Clostridium spp.*, *Cor. diptheroides*, из внешней среды - *Acinetobacter*, *Bacillus spp.* Однако, такие микроорганизмы иногда могут быть этиологическими факторами заболевания, даже таких, как эндокардиты. Для дифференциации истинной патогенетической роли микроорганизмов необходимо учитывать следующие факторы.

- Рост микроорганизма в обоих флаконах при посеве пробы крови от одного пациента.

• Обнаружение одного и того же микроорганизма в посевах двух и более проб крови.

• Быстрый рост микроорганизма (в течение 48 ч).

• Проявление одинаковых биологических свойств и профилей чувствительности к антибиотикам у разных изолятов, полученных из одной пробы крови.

Клиницистам следует сообщать о всех выделенных из крови культурах, в том числе о возможных контаминантах. Однако, для последних антибиотикограмма не требуется, а в отчете о результатах исследования необходимо указать, например, *Propionibacterium acnes* (комменсал кожи), *Staphylococcus epidermidis* (возможно, посторонняя микрофлора). Установление тесных взаимоотношений между лечащими врачами и персоналом лаборатории принесет пользу всем.

Таблица 19.

**Наиболее значимые в возникновении бактериемии и фунгиемии микроорганизмы и грибы**

Грамотрицательные	Грамположительные
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Klebsiella</i> spp.	<i>S. epidermidis</i>
<i>Enterobacter</i> spp.	-гемолитический стафилококк
<i>Proteus</i> spp.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>E. faecalis</i> (группа D)
<i>Salmonella</i> spp., отличные от <i>S. typhi</i>	<i>S. pyogenes</i> (группа А)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>S. agalactiae</i> (группа В)
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Bacteroides fragilis</i> (анаэроб)	<i>Peptococcus</i> spp. (анаэробы)
<i>Brucella</i> spp.	<i>Peptostreptococcus</i> spp. (анаэробы)
<i>Pseudomonas pseudomallei</i> (в отдельных Районах)	<i>Candida albicans</i> и другие дрожжеподобные грибы (например, <i>Cryptococcus neoformans</i> )

Выделение двух и более агентов может свидетельствовать как о полимикробной бактериемии, характерной для ослабленных пациентов, так и о контаминации пробы патогенной микрофлорой. "Анаэробная" бактериемия чаще обусловлена множественными патогенами; например, один или несколько анаэробов может быть ассоциирован с одним или несколькими аэробами при молниеносной бактериемии, связанной с тяжелой травмой или хирургическим вмешательством на толстом кишечнике.

## 8.2 СПИННОМОЗГОВАЯ ЖИДКОСТЬ

Исследование спинномозговой жидкости (СМЖ) является одним из существенных этапов диагностики бактериальных или грибковых менингитов и должно рассматриваться в качестве приоритетного анализа, на который лабораторный персонал должен обращать повышенное внимание.

В норме СМЖ стерильна и прозрачна, в 1,0 мл содержится три или менее лейкоцитов, эритроциты отсутствуют. При менингеальных или церебральных воспалениях, таких, как менингиты или энцефалиты, химический и цитологический состав СМЖ подвергается изменениям.

В настоящем разделе обсуждаются лишь вопросы, касающиеся микробиологических исследований, хотя подсчет числа лейкоцитов в пробах СМЖ наравне с микробиологическими аспектами имеет первостепенное значение.

Наиболее важные этиологические агенты менингитов, с учетом возраста пациента, перечислены в табл. 4. Необходимо иметь в виду, что некоторые другие микроорганизмы также могут служить возбудителями этих заболеваний.

### Взятие и транспортировка проб

Применяя люмбальную или межпозвонокую пункцию, врач стерильно отбирает 5-10 мл СМЖ в две пробирки. Ввиду опасности ятрогенного инфицирования пациента перед пункцией соответствующий участок кожи должен быть тщательно продезинфицирован. Одну часть СМЖ следует использовать для химического и цитологического исследования, другую - для микробиологического анализа. Отобранные образцы СМЖ сразу же следует доставлять в лабораторию, где к их исследованию приступают немедленно, поскольку форменные элементы подвергаются быстрой дезинтеграции. Любая задержка может привести к уменьшению числа содержащихся в СМЖ клеток, что в свою очередь не позволит получить точного представления о реальной клинической картине.

Таблица 20.

### Этиологические агенты бактериальных или грибковых менингитов

Неонатальный период (от рождения до 2 мес.) *Escherichia coli*  
Другие энтеробактерии: *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp.

*Streptococcus agalactiae* (группа В)  
*Listeria monocytogenes*

**Другие возрастные группы**

*Haemophilus influenzae* (капсула типа b)<sup>a</sup>  
*Neisseria meningitidis*  
*Streptococcus pneumoniae*  
*Mycobacterium tuberculosis*  
*Listeria monocytogenes*<sup>b</sup>  
*Cryptococcus neoformans*<sup>b</sup>  
Стафилококки<sup>c</sup>

---

a нетипично для возраста старше 5 лет.

б При иммунодефицитах у пациентов, в том числе при СПИДе.

в В связи с нейрохирургическими вмешательствами или послеоперационными дренажами.

**Макроскопическое исследование**

Полученную пробу СМЖ следует оценить визуально и описать, используя следующие определения: чистая, слегка мутная, мутная, гнойная, желтая или ксантохромная (в результате гемолиза или желтухи), кровавистая, с паутинкой фибрина или пленкой.

**Микроскопическое исследование**

**Приготовление препаратов**

Если предстоит исследование очень мутной пробы СМЖ, к ее анализу приступают немедленно, без предварительного центрифугирования. Во всех других случаях пробы СМЖ подвергают центрифугированию в стерильных пробирках (предпочтительно в конических пробирках с завинчивающимися крышками емкостью 15,0 мл) в течение 5-10 мин. Надосадочную жидкость отбирают с помощью резиновой груши и переносят в другую пробирку для химических и(или) серологических исследований, осадок используют для микробиологических исследований.

### **Прямое микроскопирование**

Под микроскопом (объектив х40) исследуют осадок, поместив каплю на предметное стекло и накрыв сверху покровным стеклом. С помощью этого метода выявляют:

- лейкоциты (полиморфизм нейтрофилов или лимфоцитов);
- эритроциты;
- бактерии;
- дрожжи.

Если имеется подозрение на наличие дрожжеподобных грибов *Candida albicans*, на предметном стекле следует смешать осадок (в объеме, равном содержимому бактериологической петли) с метиленово-синим красителем, сверху положить покровное стекло и исследовать под микроскопом на предмет выявления типичных, инкапсулированных, сферических, почкующихся дрожжевых форм.

### **Окраска препаратов по Граму**

Поскольку этиологические агенты бактериальных менингитов часто обнаруживаются в окрашенных по Граму мазках, такое исследование весьма важно. Высушенный на воздухе мазок осторожно фиксируют на пламени горелки и окрашивают по Граму. Микроскопическое исследование проводят при увеличении х90 (обязательно с использованием иммерсионно-масляного объектива) в течение 10 мин.

### **Окраска кислотоустойчивых микроорганизмов (по Цилю-Нильсену)**

Несмотря на то, что этот метод не относится к высокочувствительным, исследование на наличие кислотоустойчивых микробов путем приготовления из осадочной жидкости мазка по Цилю-Нильсену является весьма показательным в том случае, если лечащим врачом заподозрен менингит туберкулезной этиологии. Приготовленный препарат в течение 15 мин внимательно исследуют под микроскопом. Если результат отрицательный, микроскопию следует повторить на следующий день со свежим анализом СМЖ.

### **Культивирование**

Если при микроскопическом исследовании были обнаружены микроорганизмы, СМЖ высевает на соответствующую питательную среду.

Если микроорганизмы не обнаружены или микроскопия по Граму не дала четких результатов, желательно сделать посев СМЖ на полный набор питательных сред, включая кровяной агар. Кровяной и шоколадный агар, разлитые в чашки Петри, инкубируются при 37 °С в присутствии двуокиси углерода. Все среды инкубируют в течение 3 дней, ежедневно просматривая посевы.

В тех случаях, когда предполагается туберкулезный менингит, засевают по капле осадка (центрифугата) СМЖ по крайней мере в три пробирки с завинчивающимися крышками со средой Левенштейна-Йенсена, которые инкубируют в течение 6 нед. Первые 2-3 дня пробирки следует держать в горизонтальном положении с крышками, открученными на пол-оборота. Проверку на наличие роста осуществляют еженедельно. При подозрении на микробный рост из пробирки берут материал, делают мазок на предметном стекле, высушивают на воздухе, фиксируют в смеси Никифорова и окрашивают по Цилю-Нильсену (все эти процедуры желательно проводить в специально оборудованном помещении с соблюдением соответствующих мер предосторожности). Наличие кислотоустойчивых палочек согласуется с диагнозом туберкулеза.

### Предварительная идентификация

Рост на среде Эндо является основанием для предположения принадлежности культур к энтеробактериям; для их идентификации следует использовать методы и питательные среды, рекомендуемые для патогенных кишечных бактерий.

Колонии грамположительных кокков с узкой зоной р-гемолиза могут принадлежать *S. agalactiae* (стрептококки группы В). Это следует подтвердить постановкой САМП теста.

Плоские колонии с втянутым центром и умеренной зоной гемолиза зеленого цвета (α-гемолиз) скорее всего являются колониями *S. pneumoniae*. Для подтверждения кладут диск диаметром 6,0 мм с оптохином на кровяной агар, на который была посеяна чистая культура исследуемого штамма. После суточной инкубации у пневмококков вокруг диска проявится зона ингибирования размером более 14 мм. Если результаты посева на первичном кровяном агаре не позволяют сделать окончательных выводов, этот тест следует повторить с использованием субкультуры.

Грамотрицательные диплококки, вырастающие на кровяном или шоколадном агаре и дающие положительную реакцию на оксидазный тест, могут рассматриваться как менингококки. Подтверждение получают путем

постановки реакции агглютинации на стекле с соответствующими антисыворотками *N. meningitidis* (A, B, C). Отрицательные результаты реакции агглютинации - это еще не гарантия отсутствия менингококков, поскольку существуют по крайней мере еще четыре серогруппы этих микроорганизмов. Если результаты реакции агглютинации отрицательны, следует провести исследование на утилизацию углерода, а культуру направить в центральную справочную лабораторию. Предварительные результаты следует сообщать лечащим врачам после завершения каждого этапа идентификации (окраска по Граму, рост, агглютинация и др.), предупреждая, что последует окончательный результат.

Колонии грамположительных палочек, которые дают узкую зону б-гемолиза на кровяном агаре, могут быть колониями *Listeria monocytogenes*. К тестам, позволяющим получить подтверждение ожидаемых результатов, относятся положительная реакция на каталазу, подвижность в бульонной культуре или полужидком агаре, рост и обесцвечивание черных колоний на желчно-эскулиновом агаре.

#### **Определение чувствительности к антибиотикам.**

Для грамотрицательных палочек и стафилококков следует использовать стандартный дискодиффузионный метод.

Для *S. agalactiae* или *N. meningitidis* определять чувствительность не требуется.

Все штаммы пневмококков должны быть исследованы на кровяном агаре в отношении чувствительности к хлорамфениколу и пенициллину. В настоящее время рекомендуется определять чувствительность к пксациллину с помощью дисков (содержание вещества 1,0 мкг в одном диске).

Штаммы *H. influenzae* следует исследовать на шоколадном агаре или дополнительно на кровяном в отношении чувствительности к хлорамфениколу. Большинство ампенициллинрезистентных штаммов продуцируют ?- лактомазу, что может быть продемонстрировано путем постановки экспресс-анализа для скрининга ?- лактомазопродуцирующих штаммов гонококков.

#### **МОЧА**

Моча является объектом, наиболее часто предлагаемым для исследования на наличие микроорганизмов. При этом возникает множество проблем, связанных с правильным отбором проб, их тран

спортивной, техникой культивирования и интерпретацией полученных результатов. Как и в отношении любых других направляемых в лабораторию проб, чем больше информации предоставит врач, направляющий пробу, тем легче будет лаборатории получить объективные и исчерпывающие результаты культивирования.

Большая часть инфекций мочевого тракта локализована в мочевом пузыре и уретре. Из этих органов инфекция может поднимать по уретре (уретрит) и впоследствии поразить почки (пиелонефрит). Женщины более склонны к инфицированию мочевого тракта, взятие проб мочи для исследования также представляет у них большие сложности.

Как у мужчин, так и у женщин инфекции мочевого тракта (ИМТ) могут протекать бессимптомно, остро или принимать хронический характер. Бессимптомное течение диагностируется только при выделении культур микроорганизмов. Острое течение инфекционных процессов наиболее часто наблюдается у женщин всех возрастов. Хронические инфекционные процессы как у женщин, так и у мужчин ассоциируются обычно с вызывающими их заболеваниями (например, пиелонефриты, простатиты или врожденные аномалии мочеполового тракта); такие пациенты, как правило, лечатся в условиях стационара. Бессимптомные, острые и хронические заболевания мочевого тракта являются совершенно различными состояниями, в связи с чем результаты лабораторных исследований мочи часто требуют различной интерпретации.

Бессимптомные пиелонефриты у женщин в течение определенного времени могут протекать нераспознанными и поддаются диагностике часто лишь при тщательном лабораторном исследовании большого количества мочи с выделением возбудителя. Хронические простатиты у мужчин широко распространены и трудно поддаются лечению, они часто являются причиной повторных заболеваний мочевого тракта. Этиологическими агентами большинства инфекций мочевого тракта являются банальные кишечные бактерии: *Escherichia coli* выделяются из мочи чаще, чем любые другие микроорганизмы. Приблизительно у 10% пациентов, страдающих заболеваниями мочевого тракта, в моче могут присутствовать два микроорганизма, оба из которых могут рассматриваться как возбудители заболевания. Наличие в моче трех или более различных микроорганизмов является серьезным основанием для предположения об ошибках при взятии проб мочи или последующих манипуляциях. Вместе с тем в моче пациентов с инфекциями мочевого тракта, которым установлен постоянный катетер мочевого пузыря, часто отмечается множество различных микроорганизмов.

### Взятие материала для исследования

Невозможно переоценить значение правильно выполненных отбора и доставки биологических субстратов их в лабораторию, а также первоначального скрининга и культивирования проб в лаборатории. В обязанности лаборатории входит обеспечение лечащих врачей (которые будут отбирать пробы мочи) простерилизованными стеклянными колбами, лабораторными стаканами, мерной или другой подходящей лабораторной посудой. Все эти емкости до стерилизации должны быть хорошо укупоренными или закрыты сверху коричневой бумагой, стерилизацию осуществляют путем обработки сухим жаром или автоклавированием.

Сбор проб мочи может быть осуществлен с помощью хирургической процедуры, например надлобковой пункции мочевого пузыря, цитоскопии или катетеризации. В других случаях лаборатория должна настаивать на сборе чистой средней порции мочи, особенно у женщин и детей. В связи с тем, что моча сама по себе является хорошей питательной средой, все пробы следует доставлять в лабораторию в течение 2 ч. после отбора или хранить в холодильнике при 4 °С до момента доставки в лабораторию и начала исследования, однако, срок не должен превышать 18 ч.

Предпочтительно отбирать утренние порции мочи.

#### Женщины

Женщина в амбулаторных условиях должна выполнить следующие действия.

1. Тщательно вымыть руки с мылом и вытереть их чистым полотенцем.
2. Раздеться в специальной комнате, тщательно вымыть наружные половые органы, используя для этих целей марлевый тампон и теплую мыльную воду. Мокот тело, перемещая тампон спереди назад.
3. Тщательно прополаскивают промежность теплой водой и высушивают стерильным марлевым тампоном. Во время этой процедуры большие половые губы должны быть разведены, к вымытым частям тела запрещается прикасаться руками.
4. Начинают мочеиспускание: первую порцию мочи не берут, оставшуюся собирают в стерильную емкость; как только сбор мочи закончен, сразу же закрывают емкость стерильной крышкой.
5. Закрытую емкость чистой средней порции мочи передают среднему медицинскому персоналу для быстрой доставки в лабораторию.

Для тяжело больных (прикованных к постели) пациентов процедура должна быть аналогичной с той лишь разницей, что медицинская сестра

оказывает помощь такому пациенту или, если необходимо, проделать всю процедуру, а затем попросить пациента начать мочеиспускание.

И в той и в другой ситуации усилия должны быть сосредоточены на том, чтобы обеспечить взятие чистой порции мочи в стерильную емкость и быструю доставку в лабораторию пробы и информации о пациенте, клиническом диагнозе, требуемом объеме исследования.

### **Мужчины**

Мужчина в амбулаторных условиях должен выполнить следующие действия.

1. Вымыть руки.
2. Оттянуть назад крайнюю плоть (если она не обрезана) и выпустить небольшое количество мочи.
3. Продолжая оттягивать крайнюю плоть назад, направить струю мочи в стерильную емкость. Это и есть средняя порция мочи.
4. Емкость закрывают сверху крышкой и передают среднему медперсоналу для ее безотлагательной доставки в лабораторию.

### **Оценка результатов количественного определения микроорганизмов в моче.**

В течение многих лет считалось, что только наличие не менее  $10^5$  бактерий в 1,0 мл чисто взятой средней порции мочи может считаться убедительным лабораторным подтверждением диагноза инфекции мочевого тракта. Недавно это положение было поставлено под сомнение: некоторые эксперты полагают, что выявление  $10^4$  или даже менее микроорганизмов в 1,0 мл мочи является адекватным индикатором инфекции. Другие считают, что наличие полиморфно-ядерных лейкоцитов играет важную роль в патологии и клинических проявлениях инфекций мочевого тракта. Существует также случай бессимптомного течения инфекции, когда в моче пациентов имеются или отсутствуют лейкоциты, однако у них, несомненно, отмечается значительная бактериурия. Невозможно с высокой степенью вероятности установить минимальное число бактерий в 1 мл мочи, которое является неоспоримым свидетельством инфекции мочевого тракта, так же как нельзя считать неоспоримым признаком инфекции присутствие в моче лейкоцитов. Ниже приведены общие рекомендации относительно оценки результатов количественных тестов.

*Категория 1.* Обнаружение менее  $10^4$  бактерий в 1,0 мл мочи свидетельствует о “вероятном отсутствии” инфекции мочевого тракта. (Исключение: присутствие менее  $10^4$  бактерий в 1,0 мл мочи, взятой непосредственно из мочевого пузыря путем надлобковой пункции или цистоскопии. В этом случае сообщают данные о результатах тестов по идентификации культуры и чувствительности к антибиоткам).

*Категория 2.* Обнаружение  $10^4$ - $10^5$  бактерий в 1,0 мл. Если у пациента отсутствуют проявления заболевания, необходимо взять еще один анализ и повторить подсчет бактерий. Когда у пациента отмечаются симптомы инфекции мочевого тракта, проводят как идентификацию, так и определение чувствительности культуры к антибиотикам, если на питательных средах обнаружен рост одного или двух разных типов колоний. Наличие такого количества бактерий в моче является серьезным основанием для предположения о наличии инфекции мочевого тракта у пациентов с симптомами болезни или лейкоцитурией, когда количество микробов, качество пробы мочи или особенности течения заболевания вызывают сомнения, следует получить другую пробу мочи для повторного исследования.

*Категория 3.* Обнаружение более  $10^5$  бактерий в 1,0 мл мочи. Лечащему врачу сообщают об обнаруженном количестве микроорганизмов; если из мочи выделены колонии одного или двух разных типов, проводят идентификацию бактерий и определяют чувствительность к антибиотикам. Обнаружение такого количества микроорганизмов является серьезным основанием для предположения о наличии инфекции мочевого тракта у всех пациентов, включая женщин без симптомов заболевания.

### **Идентификация**

Идентификацию следует проводить как можно быстрее.

### **8.3. Испражнения.**

Пробы кала могут потребовать химических, бактериологических, вирусологических и паразитологических исследований. Иногда возникают проблемы, связанные со взятием и транспортировкой проб фекалий, и тогда следует использовать ректальные тампоны. Проба, аккуратно отобранная с помощью ректального тампона, является предпочтительной для выделения бактерий, обитающих в слизи толстого кишечника (это особенно важно для шигелл).

### **Взятие проб испражнения.**

Взятие проб кала должно осуществляться на ранних этапах болезни, до начала лечения антибиотиками, пока патогенные микробы содержатся в стуле в большом количестве. Испражнения отбирают в стерильный сосуд соответствующего размера с плотно закрывающейся, исключающей возможность загрязнения окружающей среды, пробкой. Со взятым материалом следует начать работу как можно быстрее после доставки его в лабораторию, по крайней мере не позже, чем через 2 ч после взятия. Если не возможно приступить к исследованию в течение 2 ч, следует отобрать небольшое количество материала с помощью тампона, который помещают внутрь каловых масс и слегка поворачивают. Затем его следует поместить в соответствующую транспортную среду вместе со слизью и частицами эпителия, если они имеются. Подходящей транспортной средой для всех энтеропатогенных бактерий является среда Кери-Блера, для вибрионов-щелочная пептонная вода.

### **Методика бактериологического исследования фекалий.**

Максимально допустимый срок хранения испражнений при температуре 4°C - 4-5 часов с момента забора. В холодное время года материал необходимо утеплять при транспортировке.

Исследование на дисбактериоз проводится не ранее, чем через 7-10 дней после прекращения антибиотико- и химиотерапии по поводу как основного, так и интеркуррентных заболеваний.

1. Фекалии (0,1г) без консерванта помещают в стерильную пробирку с 9,9 мл 0,85% раствора NaCl, но лучше использовать тиогликолевый буфер (Haenel, Muller-Benthow, 1963), обеспечивающий оптимальные условия для сохранения анаэробной микрофлоры.

2. Содержимое пробирки тщательно перемешивают стерильной стеклянной палочкой и оставляют на 5-10 мин при комнатной температуре для осаждения крупных частиц.

3. Далее готовят десятикратные разведения надоосадочной жидкости в 0,85% растворе NaCl или тиогликолевом буфере в объеме 4,5 мл  $10^5$ - $10^9$ , используя при приготовлении каждого разведения отдельную пипетку.

Для определения количества микроорганизмов из разведения производят высевы (по 0,1 мл) на соответствующие пластинчатые среды (с распределением исследуемого материала стеклянным шпателем по поверхности среды) или в высокий столбик.

С целью экономии посуды и питательных сред для определения бактероидов, лактобактерий, стафилококков и дрожжеподобных грибов можно использовать капельный метод посева исследуемого материала, согласно которого в чашки Петри помещают 9-15 колец высотой 10 мм и диаметром 18 мм, нарезанных из стеклянной трубки, и стерилизуют сухим паром. В каждую чашку наливают приблизительно 15-20 мл питательной среды. Исследуемый материал из соответствующего разведения засевают в кольцо по 0,5 мл, причем на каждое разведение берут 3 кольца.

Для выращивания бактероидов и анаэробных лактобактерий используют микроанаэроостаты (МИ-752, МРТУ 42-546-63), заполненные светильным газом или  $\text{CO}_2$ ; при отсутствии их можно выращивать в полиэтиленовых пакетах, заполненных бытовым газом.

#### **8.4 ВЕРХНИЕ ПЕРЕДНИЕ ДЫХАТЕЛЬНЫЕ ПУТИ**

Верхние дыхательные пути - полые органы, расположенные от глотки до ноздрей, к ним относятся ротоглотка и носоглотка со связывающими полостями, синусами и средним ухом. Верхние дыхательные пути поражают такие инфекционные заболевания, как:

- фарингит, иногда с вовлечением тонзилл, что может привести к "воспалению горла";
- назофарингит;
- воспаление среднего уха;
- синусит;
- эпиглотит;
- ларингит;
- бронхит.

Бактериологическая диагностика верхних дыхательных путей затруднена тем, что нормальная микрофлора ротоглотки содержит очень много разных видов аэробных и анаэробных бактерий. Обычно нормальная микрофлора по численности превосходит патогенную, роль бактериолога заключается в том, чтобы установить различия между комменсалами и патогенными микробами. По возможности лечащему врачу следует сообщать лишь о последних.

##### **Взятие материала и его доставка**

В идеале взятие материала должен осуществлять врач или другой обученный этой процедуре персонал. Пациента следует усадить на стул

против источника света. Как только язык будет фиксирован языкодержателем, быстро проводят стерильным ватно-марлевым тампоном по обеим миндалинам, задней стенке глотки и другим воспаленным областям. При выполнении этой процедуры ни в коем случае нельзя прикасаться к языку или слизистым щек. Предпочтительно отбирать материал двумя тампонами. Один используют для приготовления мазка, а другой помещают в стеклянную или пластиковую емкость и отсылают в лабораторию.

## **8.5 НИЖНИЕ ОТДЕЛЫ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ**

Нижние дыхательные пути, как правило, поражаются острым и хроническим протекающим процессом (пневмонией).

### **Взятие материала**

Взятие материала производят или при бронхоскопии или при кашле. Мокроту помещают в стерильную чашку Петри и доставляют в лабораторию.

## **8.6 ГНОЙНЫЕ ЭКССУДАТЫ, РАНЫ И АБСЦЕССЫ**

Одним из самых распространенных инфекционных процессов, наблюдающихся в настоящее время, является продукция гнойного (иногда серозно-гнойного) экссудата как результат бактериального инфицирования полости, ткани или органа тела. Такие инфекции могут проявляться в виде достаточно простых и безобидных "папул" или множественных гнойных карманов в абсцессах в одном или нескольких анатомических участках. Экссудат состоит из белых кровяных телец, преимущественно полиморфно-ядерных лейкоцитов, инородных организмов и смеси трансудата с фибрином. При некоторых заболеваниях экссудат может быть обнаружен как "оболочка" на поверхности органа, например, на поверхности мозга, при остром бактериальном менингите. В одних случаях экссудат может накапливаться в межклеточном пространстве в пределах ткани, например, фурункул или подкожный нарыв, в то время как в других случаях экссудат образуется в связи с открытыми ранами, из которых вытекают мутная жидкость или гной.

Как анатомические участки, вовлеченные в экссудативные процессы, так и организмы, вызывающие эти процессы, могут быть весьма

разнообразными. В действительности любой микроорганизм - представитель нормальной микрофлоры, или любой другой бактериальный агент, который имеет возможность проникнуть в организм, может быть вовлечен в процесс "продуцирования" экссудата. Некоторые грибы, особенно те виды, которые способны размножаться в тканях тела, также могут быть вовлечены в процесс выработки экссудата. Возбудители вирусных инфекций в отличие от грибов и бактерий очень редко являются продуцентами гнойного экссудата.

Микробиолог должен быть осведомлен о разнообразии анатомических зон и микроорганизмов, которые могут быть вовлечены в инфекционный процесс, быть готовым к проведению соответствующего макроскопического и микроскопического исследования материала, а также уметь проводить первичный посев с правильным подбором питательных сред, чтобы вырастить большинство микроорганизмов, способных участвовать в выработке экссудата. Вслед за выделением возбудителя в чистой культуре необходимо как можно быстрее провести его идентификацию и определить чувствительность к антибиотикам.

Взаимосвязь между лечащим врачом и микробиологом особенно важна при постановке диагноза и выборе тактики лечения больного при наличии заболевания, сопровождающегося гнойной инфекцией. Микробиолог должен сотрудничать с лечащим врачом, чтобы обеспечить взятие материала по всем правилам и незамедлительную его доставку в лабораторию для безотлагательного проведения необходимых исследований.

### **Наиболее распространенные клинические состояния и наиболее часто встречающиеся этиологические агенты**

#### **Хирургический материал**

Хирургический материал может быть получен при пунктировании местных абсцессов или во время других хирургических процедур. Хирургу следует посоветовать отбирать несколько маленьких кусочков различных тканей и имеющиеся образцы гнойного экссудата.

#### **Проникающие раны**

Различные поражения проникающего характера, которые связаны с повреждением кожных покровов, как правило, содержат смесь микроорганизмов, эти микроорганизмы обычно являются частью

микрофлоры кожи или нормальной микрофлоры почвы или воды. При проникающих ранениях может повреждаться кишечник, что вызывает необходимость принятия серьезных лечебных мер, поскольку кишечная микрофлора может способствовать инфицированию раны.

### **Взятие и транспортировка материала**

Не представляется возможным описать в этом разделе детали методики взятия материала из каждого типа раны, абсцесса и т.д. Должно быть совершенно ясно, что эта задача требует тесного сотрудничества персонала лаборатории и лечащего врача. Во множестве случаев это единственная возможность получить материал для исследования, поскольку во многих ситуациях "вторичного" материала для исследования просто не существует. В связи с этим выполненное по всем правилам взятие материала, его транспортировка и хранение чрезвычайно важны и каких-либо отступлений от принятой процедуры следует избегать. После того как материал получен, его упаковывают, отправляют в лабораторию, где начинают лабораторное исследование без промедления. После предварительного осмотра должно быть выполнено полное исследование с целью выделения культур возбудителей; оставшуюся часть материала помещают в контейнер, маркируют, закупоривают и хранят в холодильнике до тех пор, пока полностью не отпадет необходимость в дополнительном лабораторном исследовании материала.

### **Абсцессы**

В случае обнаружения абсцесса или множественных абсцессов лечащему врачу или хирургу следует посоветоваться с микробиологом, чтобы определить дальнейшие действия. Техника забора гноя и кусочков ткани из абсцесса аналогична той, что применяется при хирургической операции. Максимально возможное количество гнойного материала следует забирать шприцем, взятый материал переносят в стерильную емкость в асептических условиях. В том случае, если стерильной емкости не оказалось, взятый материал может быть оставлен в шприце с закрытой иглой. В этом случае сам шприц необходимо доставить в лабораторию. Доставленный материал следует незамедлительно подвергнуть лабораторному исследованию; в доставленном материале могут оказаться как аэробные, так и анаэробные культуры.

Аналогичные ситуации могут возникнуть, когда при хирургических вмешательствах совершенно по другим причинам случайно

обнаруживаются единичный или множественные абсцессы в каком-либо органе, грудной или брюшной полости, тазовых органах. Учитывая такую возможность, лабораториям следует подготовить специальную стерильную укладку (набор) для взятия содержимого абсцессов и быстрой доставки материала для исследования. Следует принять меры к недопущению забора малого количества материала с помощью тампона, когда в действительности имеется большой объем экссудата. Тампон в виде исключения может быть использован только для сбора гноя, когда имеется очень малое его количество или когда гной отбирают из анатомической области, требующей обращения с особой осторожностью, например, из глаза. Когда кусочки ткани из области абсцесса получены для исследования, его необходимо измельчить в маленьком объеме стерильного бульона или разрезать на мелкие части, используя стерильные ножницы.

#### **Инфицированные рваные, проникающие ранения, послеоперационные раны, ожоги, пролежни**

Невозможно сформулировать общие стандартные требования для взятия материала. Тем не менее целесообразно следовать определенным фундаментальным рекомендациям, которые дают возможность получать материал соответствующего качества для проведения лабораторных анализов. После тщательной обработки операционного поля хирург определяет места, где скапливается гной, расположены некротические ткани, выделяется газ (крепитация) или наблюдаются другие аномальные признаки. Частицы пораженных тканей, предназначенные для лабораторного исследования, помещают в стерильную марлю для последующей обработки, как описано выше. Гной или другой экссудат должен быть аккуратно собран и помещен в стерильную пробирку. При необходимости могут быть использованы тампоны.

#### **Свищи или отделяемое лимфатических узлов**

В тех случаях, когда свищи или воспаленные лимфатические узлы самопроизвольно дренируются, этот материал должен быть тщательно собран с помощью стерильной пастеровской пилетки с резиновой грушей и помещен в стерильную пробирку. Если самопроизвольного дренирования не наблюдается, хирургу следует получить материал, используя стерильный шприц с иглой или зонд. Использования тампона, опять-таки по возможности, следует избегать.

### Экссудаты

Ненормально большой объем скопившейся жидкости в полостях тела, таких, как плевральная полость, брюшная полость, коленный сустав, требует вмешательства хирурга, который в асептических условиях производит прокол, собирает жидкость в стерильную емкость, организует быструю доставку материала в лабораторию для микробиологического и цитологического исследования. В тех случаях, когда продукция экссудата постоянно продолжается и поставлен открытый дренаж, необходимо собрать дренажную жидкость в асептических условиях для соответствующего микробиологического исследования и постановки других тестов.

## 9.0 МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ОТДЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ.

### 9.1 ВОЗБУДИТЕЛИ ОТДЕЛЬНЫХ ГНОЙНО- ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ КОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ.

Способностью вызывать гнойные и серозно-гнойные воспаления у человека обладают многие патогенные и условно-патогенные бактерии, но громадное большинство острых и подострых нагноений вызывают кокки.

Грамположительные кокки относятся к семейству Micrococcaceae (*Staphylococcus*) и Streptococcaceae (*Streptococcus*), грамотрицательные - Neisseriaceae.

#### 9.1.1. Грамположительные кокки Стафилококки.

Впервые Пастер в 1880г. из гноя фурункула выделил культуру гроздевидно располагающихся кокков, которая при подкожном введении кроликам вызвала у них абсцессы. В 1881 г. Огстон установил, что гнойные процессы чаще всего вызываются кокками, одни из которых располагаются в виде неправильных скоплений наподобие гроздей винограда (стафилококки), а другие в виде цепочки (стрептококки). Первое обстоятельное описание морфологических и культурных признаков гноеродных стафилококков и стрептококков сделал Розенбах в 1884г.

Морфология и тинкториальные свойства. Стафилококки имеют форму довольно правильных шаров со средним диаметром 0,8-0,9 микрон. Микробные клетки располагаются в виде неправильных скоплений, несколько напоминающих гроздь винограда. Такое расположение является результатом деления микробов в разных плоскостях, чередующихся без какой-либо правильности. В мазках культуры из гноя версчаются также одиночные кокки, иногда — парные кокки и даже короткие цепочки, но доминирующей формой расположения при этом все же остаются гроздевидные скопления.

Спор и капсул стафилококки не образуют, жгутиков не имеют. Аналиновыми красками окрашиваются легко, грамположительны.

**Культурные и биохимические признаки.** Стафилококки принадлежат к факультативным анаэробам; они хорошо развиваются в обычных аэробных условиях. К питательным средам непритязательны. Оптимальная реакция сред находится в пределах pH равно 7,2-7,8. Температурным оптимум роста 37,0, хотя размножение наблюдается в широкой зоне — от 8 до 6.

При штриховых посевах на скошенном МПА образуется сплошной непрозрачный, сочный, блестящий пигментированный налет. Среда остается неокрашенной, так как образуемый микробами пигмент является липохромом, нерастворимом в воде. Разные виды стафилококков вырабатывают пигменты свойственного им цвета: оранжево-желтого, золотистого, лимонно-желтого или белого. Образование пигмента лучше происходит при выращивании микробов в условиях комнатной температуры, при широкой аэрации на рассеянном свете.

Колонии стафилококков на агаровых пластинках имеют форму правильных дисков 2-4 мм в диаметре, с ровными краями и умеренно выпуклой поверхностью. Колонии не прозрачны и окрашены в цвет образуемого микробом пигмента.

На кровяном агаре колонии в ряде случаев окружены просветленной зоной гемолиза; гемолитическая способность характеризует преимущественно вирулентные штаммы стафилококка.

На МПБ стафилококки дают сильное диффузное помутнение; образуя с течением времени осадок.

Большинство внеклеточных веществ, продуцируемых стафилококками, обладают антигенной активностью. Для стафилококков характерно стабильная, генетически обусловленная чувствительность к бактериофагам, базирующаяся на поверхностных рецепторах, что позволяет производить эпидемиологические наблюдения за штаммами. Многие штаммы

стафилококков являются патогенными. При этом образование некоторых токсинов, происходит, по-видимому, с участием фагов.

Биохимические свойства. Стафилококки обладают значительной биохимической активностью. Они расщепляют с образованием кислоты (но без газа) 1) глюкозу, 2) лактозу, 3) сахарозу, 4) мальтозу и ряд других углеводов, а также манит, выделяют сероводород и восстанавливают нитраты в нитриты, индола не образуют.

Наиболее изучены и имеют большое значение в практике гемолитические свойства токсинов, часто их называют гемолизином. Выделяют 4 типа гемолитического токсина. Они являются самостоятельными субстанциями и отличаются друг от друга способностью лизировать эритроциты разных видов животных.

К а-токсину наиболее чувствительны кроличьи эритроциты. Обнаружить его можно на чашке с 5% кровяным агаром (кровь кролика или барана).

б-токсин, или гемолизин. Выращивают в чашке с при 37 ° С, а затем 24ч на холоде. Наиболее чувствительный к нему эритроциты барана. Он вызывает также гибель кроликов и морских свинок.

д-токсин – продуцирует почти все штаммы, выделяемые из очагов поражения человека. Лизирует эритроциты человека, лошади, кролика, барана, морской свинки, обезьяны.

г-токсин лизирует эритроциты кролика, барана и человека.

Лейкоцидины – субстанция патогенных стафилококков, разрушающие лейкоциты человека и животных. Описано 4 вида лейкоцидинов. Среди них – лейкоцидин – разрушает эритроциты человека и кролика.

Некротоксин. Определяется при в/к введении кролику 0,2 мл токсина или культуры стафилококка. Через 24-48ч появляется некроз 3-4 см в диаметре (дермо-некротическая проба).

Летальные свойства токсина. Определяют при в/в введении кролику 0,2-0,4 мл токсина. Через 5-10 мин кролик погибает при тяжелых мозговых явлениях.

## **9.12 Микробиологическая диагностика стафилококковых инфекций.**

Организация профилактики стафилококковых инфекций и изучение путей их распространения не мыслятся без микробиологических исследований и во многом зависят от высокого качества лабораторий.

Вместе с тем целый ряд инструкций устарел, а рекомендации носят разрозненный характер и не удовлетворяют практических работников

Исследования для обнаружения патогенных стафилококков производятся с целью:

- а) диагностики заболевания;
- б) выявления бактерионосителей среди работников детских лечебных учреждений и пищевых объектов;
- в) выявления источников заболевания;
- г) установления факторов передачи инфекций – исследования пищевых продуктов, воздуха, зараженных предметов и т.д.

Получение положительного результата должно быть правильно истолковано в зависимости от обстоятельств: наличия заболевания у обследуемого или его окружения, характера материала, доставленного для исследования, профилактических и диагностических целей исследования и т.д.

### **Порядок взятия материала и методы исследования Материал для исследования**

Стафилококки являются возбудителями многих заболеваний, начиная от местных фолликулитов и кончая септикопиемией, с большой летальностью, поэтому стафилококк может быть обнаружен во всех выделениях человеческого организма. Материал для бактериологического исследования может быть взят: 1) из носа и зева, 2) из кожных поражений, 3) из раны. Производятся посевы: 1) крови, 2) мокроты, 3) мочи, 4) желчи, 5) кала, 6) различных пунктатов (плевральных, костного мозга и прочих). Кроме того, материалом для выделения являются органы трупа (исследования нужно проводить как можно быстрее после смерти). При наличии трупного материала исследованию подлежат кусочки печени, селезенки, легочная ткань, желчь, кровь, сосудистые тромбы, костный мозг, мезентериальные железы, содержимое толстых и тонких кишок.

При заболеваниях, протекающих по типу пищевых токсико-инфекций, исследуют кал, мочу, рвотные массы, промывные воды желудка, кровь пострадавших, а также остатки пищи, соскобы со столов и разделочных досок. Персонал, связанный с приготовлением пищи, раздачей и доставкой ее, обследуют на присутствие стафилококков в носу, зеве, на коже рук и при наличии гнойных заболеваний – в гнойном содержимом. При плановом (один раз в квартал) обследовании лечебных учреждений, родильных домов и отделений проводятся исследования: 1) воздушной среды, 2) смывов с

предметов обихода, оборудования, спецодежды и рук персонала, 3) перевязочного и шовного материалов, 4) грудного молока, раствора глюкозы, используемого для питья новорожденных, 5) воды питьевой из графинов, 6) мазков из носа и зева.

### **Микробиологические исследования на патогенный стафилококк**

**Первый этап.** Исследования доставленного материала начинается с бактериоскопии. Из образцов присланных на бактериологический анализ, готовят эмульсии, болтушки или с помощью центрифугирования получают осадок, а затем готовят мазки. Предметные стекла для мазков хранят в спирте, перед употреблением фламбируются. Мазки высушивают на воздухе и фиксируются нагреванием. Микроскопируя окрашенные по Граму мазки, устанавливают морфологию культуры. Бактериоскопия позволяет составить ориентировочное представление о степени обсемененности материала – единичные кокки, мало, много. В мазках, окрашенных по Граму, грамположительные кокки располагаются гроздевидно, парами или отдельными кокками. При отсутствии форменных элементов крови, если заболевание свежее, стафилококки располагаются внеклеточно, в поздних стадиях болезни можно обнаружить лейкоциты, фагоцитировавшие кокки.

Необходимо учитывать, что отрицательный результат микроскопии не является основанием для прекращения дальнейших исследований.

**Культивирование.** Независимо от результатов бактериоскопии исследуемый материал непосредственно или после соответствующей обработки (растирание, приготовление 10%-ной взвеси, центрифугирование) засевают последовательно на 2 плотные питательные среды: желточно-солевой и кровяной агар.

Посев производится путем втирания шпателью 2 капель посевного материала на поверхность чашки с кровяным агаром. Непременным условием для получения изолированных колоний является отсутствие конденсата на поверхности питательной среды, для этого следует разливать среду охлажденной до температуры, равной 50°C и затем подсушить.

Кровяной 5%-ный агар нужно разливать в чашки тонким слоем (5мм), тогда лучше видны мелкие колонии стрептококков с зоной гемолиза вокруг них и очень мелкие в виде росинок прозрачные колонии пневмококков, а большие стафилококковые колонии легко различимы на этом фоне.

Одновременно производят посевы на жидкую среду обогащения — мясопептонный солевой бульон с 6,5% хлористого натрия или солевой бульон с 10% хлористого натрия при идентификации болезнетворных стафилококков из гноя и воспалительных экссудатов. Засевают не более 0,1 объема питательной среды. Все посевы помещают в термостат при 37°C на 18-20 ч.

**Второй этап.** Через 18-20 ч инкубации просматриваются посевы на чашках. В положительных случаях отмечают колонии, характерные для стафилококков: на кровяном агаре — крупные с ровными краями и зоной гемолиза. Если через 24ч на чашках с кровяным агаром гемолиз не появляется, следует оставить их еще на 24 ч при комнатной температуре. При отсутствии гемолиза делают повторный пересев на кровяной агар, чашку с посевом помещают в эксикатор с содержанием 20% углекислоты и ставят в термостат при 37 °С. Через 24 ч роста в атмосфере углекислоты утраченные гемолизирующие свойства восстанавливаются. Для образования углекислоты на дно эксикатора (1-2 л объема) помещают чашку с двууглекислой содой (1-2 г) и через оставленное отверстие тонкой пипеткой наливают 16-18 мл 10%-ной соляной кислоты.

На чашках с желточно-солевым агаром патогенные стафилококки вырастают с образованием зоны помутнения вокруг колоний в результате наличия лецитовителазной реакции.

Подозрительные колонии (не менее 3) отсеивают на скошенный агар для выделения чистой культуры, готовят препараты, окрашивают по Граму и микроскопируют. При обнаружении мелких грамположительных кокков культуру отсеивают на молочно-солевой агар для изучения пигментообразования и выделения (золотистых, палевых, лимонно-желтых, белых и т.д.) 3-5 колоний для высева на среды Гисса, постановки реакции плазмокоагуляции и дальнейшей идентификации. Посевы на молочно-солевом агаре после инкубации при 37°C следует 48ч выдержать при комнатной температуре, т.к. повышенное содержание поваренной соли в данной среде часто оказывает задерживающее влияние, но только на сопутствующую микрофлору, но и на рост стафилококков.

Независимо от наличия на плотных средах подозрительных на стафилококков колоний, со среды обогащения производят посевы на чашки Петри с кровяным или желточно-солевым агаром. Посевы выращивают при 37°C 18-20 ч. при отсутствии роста через 24ч вторично производят посевы на кровяной и желточно-солевой агар.

Идентификацию выделенных культуры начинают через 18-20 ч от начала исследования. При этом изучают: морфологию клеток в мазках,

окрашенных по Граму; коагулазную, лецитиназную, гемолитическую активность; принадлежность к фаготипу; определяют чувствительность стафилококка к антибиотикам методом стандартных дисков. Изучение свойств перечисленных признаков позволяет произвести идентификацию в случаях выделения типичного патогенного стафилококка.

**Третий этап.** Выделенную чистую культуру стафилококка характеризуют, согласно комплексному методу исследования, с учетом целей обследования – диагностической, профилактической и т.д.

В протоколе исследований отмечают:

- морфологию;
- плазмокоагулирующую,
- гемолитическую,
- лецитиназную активность;
- принадлежность к фаготипу;
- результаты определения чувствительности выделенной культуры к антибиотикам, сульфаниламидами, препаратом нитрофуранового ряда.

При необходимости специального изучения всех токсигенных свойств следует определить наличие летального токсина, энтеротоксина, дермoneкротоксина, а также гемолизинов (альфа, бета, гамма, дельта) по вышеописанным методикам.

Вирулентность стафилококков определяют путем введения 0,1 мл суточной бульонной культуры в хвостовую вену мышей. Учет падежа животных с наличием абсцессов в почках осуществляют на протяжении 10 суток.

### **Выделение стафилококков из внешней среды**

Исследования воздуха производят с помощью аппарата Кротова, пропуская не менее 250 л воздуха, при применяются чашки с желточно-солевым, кровяным и мясо-пептонным агаром для определения микробного числа.

Для исследования плотных продуктов их кусочки растирают, готовят гомогенные взвеси, которые сеют на солевой мясо-пептонный бульон, желточно-солевой агар. Молоко и другие жидкие продукты непосредственно засевают на эти среды.

Поверхность предметов обихода исследуют путем смывов влажными тампонами, которые затем засевают в пробирки с накопительной средой – мясо-пептонный бульон с 6.5% хлористого натрия. После суточной инкубации при 37 °С производят пересев на желточно-солевой и кровяной

агар. Выделенную культуру идентифицируют по выше описанной методике.

Для установления носительства патогенных стафилококков нужно стерильными ватными тампонами (увлажненными физиологическими растворами) взять слизь из зева и из обеих половин носа обследуемых лиц и засеять на питательные среды. Выделение и идентификацию патогенных стафилококков ведут, как указано выше.

Обнаружение патогенных стафилококков в гное и воспалительных экссудатах осуществляется выделением чистых культур путем посева на питательные среды с последующей проверкой патогенных свойств выделенной культуры, согласно комплексному методу исследования стафилококков.

### **Выделение стафилококков из крови**

Асептично взятую из вены кровь вносят (5мл) во флакон питательного бульона (45мл) и одновременно сеют в чашки Петри с желточно-солевым, кровяным и агаром.

При сепсисе лучшей средой для выращивания является среда Кит-Тароцци, которая перед посевом прогревается в водяной бане при 100 °С 30 мин. Посевы крови (1:10 не более) можно делать в желчный бульон, пептонную воду, асцит бульон.

Посевы на питательный бульон инкубируют при 37 °С 10 суток. На протяжении 3 суток из них повторно производят высевы на желточно-солевой, кровяной и агар. На 5 сутки после 3 отрицательных высевов выдают предварительный ответ.

При отсутствии признаков роста в первых 3 посевах производят высевы на 6 и 9 сутки. Идентификацию выделенного стафилококка проводят по тестам, приведенным выше. Окончательный ответ выдается после исследования в течение 10 суток.

При подозрении на стафилококковую пищевую интоксикацию исследованию подвергают рвотные массы, промывание воды, испражнения, а также подозрительные продукты питания. Материалы эти гомогенизируют, помещают в пробирки со стерильным физиологическим раствором. Посев густой взвеси кала и других объектов (около 0,1мл) производят на чашку с желточно-солевым агаром. Материал распределяют шпателем или петлей примерно на 1/3 посевной площади, а на остальной делают разреженный посев с целью получения изолированных колоний; затем сеют путем переноса необоженного шпателя на чашку с кровяным агаром.

При исследовании продуктов, содержащих большое количество соли (сельдь), не производят посевы на солевые среды; исследуя продукты, содержащие большое количество сахара (крем, мороженное) не производят посевы на сахарный бульон. Выделенную культуру идентифицируют по общим правилам дифференциации патогенного стрептококка.

Тождество культур, высеваемых из продуктов с стафилококками, обнаруженными у больных, устанавливают методом фаготипации. При условии установления идентичных фаготипов стафилококков во всех звеньях эпидемической цепочки необходимость применения биологической пробы отпадает.

Надо учитывать, что стафилококковые отравления могут развиваться и по типу чистых токсикозов, когда в продуктах сохраняется энтеротоксин. В этих случаях вопрос решается путем постановки биологической пробы - введения котьятам экстрактов из исследуемых объектов.

Следует иметь в виду, что встречаются коагулазонегативные стафилококки, могущие образовывать энтеротоксин. В случаях пищевых отравлений определяют и степень гемолитической активности.

Заключение об этиологической роли стафилококков при пищевых отравлениях дается на основании материала эпидемиологического обследования. Клинической картины заболевания и микробиологического диагноза, обоснованного свойствами выделенной культуры и результатами биопроб.

На основании полученных результатов изучения выделенной культуры устанавливают бактериологический диагноз и выписывают результат исследования поступившего материала.

Как видно из приведенного выше, чистая культура стафилококков может быть выделена с прямого посева или посевах со среды обогащения. В соответствии с этим идентификация выделенной культуры может быть закончена на 4-5 сутки и, следовательно, выдан ответ.

В случае выделения атипичной культуры, для идентификации которой требуется дополнительное время, выдача ответа задерживается.

### **Схема исследования на присутствие патогенного стафилококка**

**1 день.** Бактериоскопия мазков. Посев материала на чашки с желточно-солевым, кровяным агаром и в соляной (6,5-10%)бульон.

**2 день.** Просмотр чашек с посевом нативного материала, отбор подозрительных колоний по лецитиназному и гемолитическому признакам. Бактериоскопия. Пересев на скошенный агар (рН равно 7,2- 7,4), чашку Петри с молочно-солевым агаром.

В случае отсутствия роста характерных колоний через 24 ч посеvy просматривают через 48-72 ч; чашки хранят при комнатной температуре.

**3 день.** Изучение чистой культуры стафилококков, выделенной с прямого посева. Микроскопия мазков, окрашенных по Граму. Учет гемолитических свойств, пигментообразования. Постановка реакции коагуляции плазмы. Высев на углеводные среды Гисса. Определяют чувствительность к антибиотикам и, если есть необходимость, - к сульфаниламидам, препаратам нитрофуранового ряда и специфическому бактериофагу. Культуры, выделенные по эпидемиологическим показаниям, подвергают фаготипированию.

Проводят учет роста и выделения чистой культуры, высеянной со сред обогащения, согласно пунктам, указанным выше.

**4 день.** Учет результатов: реакция плазмокоагуляции, ферментации сред Гисса, чувствительности к антибиотикам, принадлежность к фаготипу, а также наличие летально-, дермонекро- и энтеротоксинов (если такие определялись).

Изучение чистой культуры, выделенной со сред обогащения, по всем признакам патогенности проводится в случае отклонения от типичной характеристики выделенного штамма из первичного посева материала.

**5 день.** Учет всех результатов (в том числе, если нужно, и у культуры выделенной со среды обогащения), согласно вышеперечисленным признакам, оформление результатов бактериологического исследования.

Таким образом, на 4-5 день исследования из выделенной культуры имеется сумма сведений о морфологии, культурных, биохимических свойствах, достаточно для оформления ответа

### **Отклонение от типичных свойств в характеристике стафилококков**

В практической работе при определении возбудителя, помимо характерных признаков стафилококков, очень важно знать и правильно оценить отклонения от типичных свойств, возникающие в результате целого ряда причин. Они могут касаться всех свойств возбудителя, а именно: морфологических, культурно-ферментативных и серологических.

## Наиболее часто встречаются отклонения от характерных свойств стафилококков

Грани между патогенными и непатогенными для человека стафилококками в значительной мере условны, т.к. процесс развития продолжает выявлять между ними переходные и промежуточные формы. Целесообразно поэтому в случаях получения каких-либо отклонений в основных признаках патогенных свойств. Изучать выделенную культуру, применяя весь комплекс дифференциально-диагностических признаков патогенности.

Следует учитывать, что величина стафилококков непостоянна и при воздействии антибиотиков встречаются так называемые мелкие G-формы и большие шары.

Необходимо иметь в виду, что даже в суточных культурах могут встречаться особи, не окрашивающиеся по Граму, что может зависеть от состояния диссоциации культуры и устойчивости к пеницилину.

У некоторых штаммов можно наблюдать в 3,5-часовых культурах хорошо выраженные капсулы.

При выделении культуры из организма больного или бактерионосителя стафилококковые колонии, как правило, вырастают в S-форме. Однако в зависимости от диссоциации патогенные стафилококки могут образовать S-, R-, G- и L-формы колонии.

R-формы колонии вырастают крупными, уплощенными, непрозрачными, неправильной формы, с неровными краями, бугристой поверхностью, иногда радиальной исчерченностью.

G-формы колонии, или карликовые, часто обнаруживаются при рецидивах или вследствие нарушения метаболизма в старых культурах. Они возникают также под действием антибиотиков – при лечении пенициллином, стрептомицином, эритромицином. Карликовые колонии отличаются крайне медленным ростом и после суточной инкубации их можно видеть только при помощи лупы. Но они принадлежат к тому же фаготипу, что и исходная культура, сохраняют способность коагулировать плазму.

L-формы стафилококков морфологически не отличаются от L-форм других бактерий и представляют собой шаровидные вакуолизированные тела или мельчайшие зернистые образования, проходящие через бактериальные фильтры.

S-, R- и G-варианты обладают различной антигенной структурой; антигены S- и R-вариантов могут быть разделены специфическими антисыворотками.

Следует отметить, что пигментообразование является весьма лабильным признаком. Типичные культуры золотистого стафилококка довольно четко образуют варианты грязно-белых колоний. В дальнейших посевах из таких колоний вырастают культуры, продуцирующие снова желтый пигмент. Золотистый пигмент образуется и непатогенными микрококками, выделяемыми из морской воды и гниющего материала.

Из выше изложенного следует, что образование пигмента не может считаться основным признаком патогенных стафилококков.

Проводя идентификацию стафилококков, патогенные свойства необходимо изучать не только у колоний, имеющих зону гемолиза, но и у культур, лишенных гемолитических свойств, они могут обладать всеми остальными признаками патогенности и могут быть болезнетворными.

Определяя патогенность выделяемой культуры, следует учитывать, что утрата коагулазы не всегда совпадает с потерей патогенности. Коагулазоотрицательные стафилококки, обладающие желточным фактором, гемолизином, могут выделяться из очагов воспаления (абсцессов, флегмон), будучи единственным его возбудителем. Некоторые патогенные стафилококки могут временно терять коагулазную активность. Но, возможно, не теряют энтеротоксигенности. Все это возможно установить только путем изучения всех свойств патогенности выделенных культур.

Необходимо иметь в виду, что для постановки реакции плазмокоагуляции следует пользоваться смывом агаровой культуры или брать несколько колоний, т.к. в одной и той же популяции стафилококков могут встречаться варианты, образующие коагулазу в разных количествах или даже совершенно ее не образующие, поэтому различные соотношения этих вариантов в исследуемом материале могут влиять на результат реакции.

Следует учитывать, что в реакции плазмокоагуляции образовавшиеся сгустки к концу суток могут подвергнуться обратному расплавлению культур, обильно выделяющих фибринолизин. Слабокоагулирующие штаммы могут давать реакцию лишь в поздние сроки.

Если результаты типирования исходных и выделенных в последствии штаммов совпадают, то коагулазоотрицательные штаммы считают минус-вариантами возбудителей инфекционного процесса.

При хранении стафилококковых штаммов в лабораторных условиях их антигенная характеристика меняется и серотипизация пригодна лишь при исследовании только что выделенных микробов.

Из всего сказанного о возбудителях стафилококковых инфекций становится ясным, какие серьезные изменения произошли в этой области за сравнительно короткий срок. Поэтому бактериологический диагноз должен основываться на изучении и всей совокупности свойств выделенной культуры, а не на основе отдельных признаков

### Оценка результатов и формулировка ответов

Логическим выводом из вышеперечисленных фактов является необходимость использования комплексного метода лабораторной диагностики стафилококкового заболевания, а также творческий подход к проведению бактериологического исследования, оценке результатов и формулировке ответов. При оформлении ответов надо указывать основные свойства выделенных стафилококков. В качестве примера можно рекомендовать следующие формулировки ответов.

Положительный результат выделяется при получении положительных (не менее четырех) признаков патогенности у выделенной культуры, а именно: коагулазной и лецитоветилазной реакции, гемолитической активности и принадлежности к фаготипу. В таком случае может быть выдан окончательный ответ: "Выделена культура патогенного стафилококка, обладающая лецитин-коагулазо-гемолитической активностью, принадлежащей к... фаготипу, чувствительная к... и устойчивая к..."

При отсутствии подозрительных колоний прямого посева нативного материала и отсутствия роста в среде обогащения на 3-4 день исследования выдается отрицательный ответ: "патогенный стафилококк не обнаружен".

Если из прямого посева исследуемого материала или со среды обогащения выделена патогенная стафилококковая культура, типичная по всем (согласно комплексному методу исследования) биологическим свойствам, то на 4-5 день изучения выдают ответ: "Выделен типичный патогенный стафилококк ... фаготипа, чувствительный (мало или высоко) к ... и устойчивый к ..."

При диагностических исследованиях с целью быстрого установления диагноза и назначения соответствующего лечения допускается выдача предварительного положительного ответа. Такой ответ выдают не 3 день исследования в том случае, если выделенная культура имеет типичную морфологию и, например, обладает лецитиназой,

гемолизом, вырабатывает золотистый пигмент. Ответ формулируют следующим образом: "выделена стафилококковая культура, обладающая гемолитической, лецитиназной активностью, дающая золотистый пигмент; культура чувствительна к... и устойчива к... Окончательный ответ будет выдан через 1-2 суток".

В некоторых случаях допускается производство анализов на патогенный стафилококк ускоренным методом, путем изучения результатов бактериоскопии, реакции плазмокоагуляции, лецитиназной, гемолитической активности и чувствительности к антибиотикам. Такая методика допустима при массовых обследованиях, а также при повторных обследованиях больных, то которых аналогичная культура уже была диагностирована ранее. В этих случаях при условии выделения культуры, типичной по морфологии, обладающей плазмокоагулазой, лецитиназой, гемотоксином, может быть выдан на 3 день исследования окончательный положительный ответ: "Выделенный патогенный стафилококк, чувствительный к..., устойчивый к...".

При исследовании крови ответы выдают в той же формулировке, что и при исследовании других материалов.

Предварительный отрицательный ответ при исследовании крови выдают после 3 отрицательных результатов посева, на 5 сутки. Ответ формулируют следующим образом: "Патогенный стафилококк не выделен. Исследование продолжается до..." (указать дату). Окончательный ответ выдается после исследования в течение суток.

В том случае, когда результаты какой-либо из проб выражены неясно (сомнительна реакция гемолиза, задержка реакции коагуляции), целесообразно, особенно при проведении диагностических анализов, ответ выдавать по выделяемой микрофлоре независимо от наличия, всех или части, признаков патогенности стафилококка. Ответ формулируется следующим образом: "Выделена стафилококковая культура, обладающая дермонекротоксином, гемолитической и лецитиназной активностью, но не дающая коагуляцию плазмы. Выделенная культура чувствительна к..., устойчива к..."

### **Микробиологические методы идентификации микробов семейства стрептококков (*Streptococcaceae*)**

Согласно классификации, представленной в "Кратком определителе бактерий Берги" (М., 1980) семейство *Streptococcaceae* объединяет 5 родов,

из них 3 рода – *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Gemella* - включают представителей, которые могут быть патогенны для человека.

Род *Streptococcus* объединяет обширную, широко распространенную в природе группу грамположительных, факультативно анаэробных микроорганизмов, облигатным признаком которых является отрицательный каталазный тест.

Облигатно-патогенным для человека видом является *S. pyogenes* (группа А), которые могут являться возбудителями ряда острозаразных заболеваний, поражающих преимущественно детей и лиц молодого возраста. Они являются также причиной возникновения гнойно-воспалительных процессов разной локализации и этиологическим фактором таких хронических заболеваний, как ревматизм, диффузный гломерулонефрит.

*S. pneumoniae* (пневмококк) является возбудителем острых пневмоний, часто сопровождающейся бактериемией, менингитов у детей, острых отитов, гнойных конъюнктивитов и др.

Среди многочисленных условно-патогенных для человека видов стрептококка лидирующее место занимают *S. agalactiae* (группа В), *S. faecalis* и *S. faecium* (группа).

Названные виды стрептококков являются одной из частых причин различных заболеваний урогенитального тракта, постхирургических гнойно-воспалительных процессов кишечника и брюшины, тяжелых пуэрперальных инфекций новорожденных. Иногда они участвуют в этиологии и патогенезе подострого эндокардита. И *S. Faecalis* и *S. faecium*, по месту естественного их обитания в кишечнике человека и кишечника различных животных, выделены в отдельную группу “энтерококков”.

Представитель рода *Aerococcus* – *A. viridans* выделяются при заболеваниях мочеполового тракта и при эндокардитах.

Представитель рода *Gemella* – *G. haemolysans* выделяется из секрета бронхов и слизи дыхательных путей.

### **Установление принадлежности выделенных культур к роду *Streptococcus***

**1 день.** Идентификация стрептококков начинается с изучения колоний в первичных посевах патологического материала на чашках с 5% кровяным агаром.

По виду гемолиза на кровяном агаре стрептококки делятся на 3 группы:

1. Гемолитические стрептококки (*S. haemolyticus*), обуславливающие

лизис эритроцитов с образованием вокруг колоний прозрачной зоны (полного просветления среды) шириной от 10т долей до нескольких мл. колонии гемолитических стрептококков бывают:

а) мукоидные, диаметром 1,5-2,5 мм, правильной круглой формы, блестящие, напоминающие своим видом капельки росы. Данный вид колоний характерен для содержащих капсулу свежeweделенных штаммов *S. pyogenes*;

б) шероховатые ("matt" форма), 1,5-2,5 мм в диаметре, круглые колонии, с серовато-белого цвета, с характерно слегка приподнятом центром. Этот вид колоний также характерен для свежeweделенных, содержащих М-протеин, штаммов;

в) гладкие ("glossi" форма), мелкие ,1-1,5 мм в диаметре, колонии сферической формы с ровным краем, с блестящей влажной поверхностью. Этот тип колоний характерен для слабо вирулентных и авирулентных *S. pyogenes* штаммов, многих штаммов *S. agalactiae* и некоторых штаммов энтерококков.

Зеленящие стрептококки *S. viridans*, образующие на кровяном агаре альфа-реакцию в виде полупрозрачной, зеленоватого оттенка зоны, обусловленной превращением гемоглабина в меггемоглобин. Зеленящие стрептококки растут в виде мелких, 1,0-1,5 мм в диаметре, колоний серовато-зеленого цвета с гладкой или шероховатой поверхностью. Этот тип колоний характерен для многих стрептококков вегетирующих постоянно на слизистой полости рта (*S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. bovis*), для отдельных штаммов *S. agalactiae*, а также для *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. viridans*. Колонии пневмококка на кровяном агаре полупрозрачные, плоские с приподнятым краем и блюдцеобразным центром, вокруг колоний зеленающая зона гемолиза.

3. Негемолитические стрептококки (*S. anhaemolyticus*), не реагирующие с эритроцитами и, в процессе своего роста не вызывающие изменений кровяного агара.

Гемолитическая активность способствует выявлению патогенных штаммов стрептококка, не являясь однако, дифференциально-диагностическим признаком их патогенности. Штаммы негемолитических стрептококков, выделенные от человека, практического значения не имеют, т.к., за очень редким исключением, они не связаны с инфекционным процессом.

Из колоний, подозрительных в отношении стрептококка, бактериальной петлей берут небольшое количество материала, делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют.

Микроскопия препаратов на данном этапе исследования предусматривает дифференциацию стрептококков от грамотрицательных гемофильных микроорганизмов, рост которых на кровяном агаре сходен с ростом гемолитических стрептококков.

В препаратах, приготовленных из колоний с плотных питательных сред, стрептококки располагаются парами, короткими цепочками, иногда образуют скопления, напоминающие грозди стафилококков.

Морфологические свойства стрептококков, особенно в первых генерациях, характеризуются выраженным полиморфизмом. Наряду с шарообразными формами в мазках содержатся вытянутые в длину грубые кокки разной величины, даже в пределах одной цепочки. Пневмококки представляют собой ланцетовидные диплококки. Каждая пара кокков или несколько пар заключены в капсулу, образуя цепочки.

При обнаружении стрептококков в препарате оставшийся от микроскопического исследования материал колоний снимают петлей и инокулируют в питательный бульон с сывороткой крупного рогатого скота (11%) или глюкозы (0,2%) или высевают на питательную среду для выделения гемокультур стрептококков. Оптимальная температура для культивирования 37 °С.

2 день. Просматривают пробирки с посевами, сделанными накануне. Характер роста стрептококков на жидких питательных средах определяется длиной цепочек. Соответственно этому различают:

а) придонно-пристеночный рост с образованием мелко-крошковатого осадка с сохранением прозрачной среды. Зернистый рост характерен для видов и штаммов стрептококка, образующих длинные цепочки *S. pyogenes*;

б) придонный рост в виде пушистого рыхлого осадка с сохранением полной прозрачности или равномерным более или менее интенсивным помутнением надосадочного слоя бульона (*S. pneumoniae*). С уменьшением длины цепочек возрастает наклонность к диффузному росту (*S. agalactiae*, отдельные штаммы вирулентных *S. pyogenes*, *S. faecalis*, *S. faecium*)

в) диффузный рост с интенсивным помутнением бульона и образованием небольшого гомогенного осадка (*S. faecalis*, *S. faecium*, отдельные штаммы *S. agalactiae*, единичные штаммы *S. pyogenes*).

Из содержимого пробирок бактериальной петлей берут небольшое количество материала, делают мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют. После установления чистоты выделенной культуры, приступают к идентификации вида стрептококка.

## **Идентификация гемолитического стрептококка *S. pyogenes* (группы А)**

Идентификацию гемолитического стрептококка *S. pyogenes* (группы А) осуществляют на 3 день исследования серологическим методом Ленсфильд, модифицированным в лаборатории стрептококковых инфекций ИЭМ АМН СССР им. Н.Ф. Гамалея.

Принцип. Образование видимого преципитата в результате взаимодействия группоспецифического полисахарида С с соответствующими ему антителами группоспецифической антистрептококковой сыворотки.

## **Дифференциация гемолитических и зеленящих стрептококков с энтерококками.**

Культуры гемолитических и зеленящих стрептококков, клетки которых при микроскопическом исследовании представляют собой грамположительные кокки, располагающиеся парами, короткими цепочками или небольшими скоплениями, необходимо дифференцировать с энтерококками.

1 день. Суточную бульонную культуру стрептококка, для идентификации ее с энтерококками, высевают:

- а) на желчно-щелочной агар (ЖЩА);
- б) в молоко с 0,1% метиленового синего.

2 и 3 дни.

1. На ЖЩА растут только энтерококки. Колонии их круглые, блестящие, с ровным краем, синеватого цвета, слегка выпуклые, появляются большей частью на 3 сутки инкубирования при температуре 37 °С.

2. В пробирках с молоком энтерококк редуцирует метиленовый синий, вследствие чего уже через 16-20 ч после посева и инкубации в термостате среда обесцвечивается и из голубой становится кремового цвета.

Способность микробных культур к росту на ЖЩА и редуцированию 0,1% метиленового синего в молоке указывает на принадлежность исследуемой культуры к группе энтерококков.

## Дифференциация энтерококков внутри группы.

Внутри группы энтерококки делятся по ферментативным, редуцирующим и гемолитическим свойствам на ряд видов и подвигов. Дифференциация культур энтерококка внутри группы ведется по схеме, представленной в таблице.

1 день. Бульонные культуры энтерококков для установления их видовой принадлежности высевают параллельно на 3 среды:

а) на энтерококковую дифференциально-диагностическую среду (ЭДС) для определения гемолитической, протеолитической активности и способности редуцировать ТТХ;

б) на сахарно-дрожжевый агар для испытания резистентности исследуемой культуры к теллуриду калия;

в) в столбик с 0,2% агаром для определения подвижности энтерококков.

Таблица 21.

### Дифференциация энтерококков внутри культуры.

Виды и подвиды	Резистентность к теллуриду калия	Энтерококковая дифференциально-диагностическая среда			Подвижность в 0,2% агаре
		Редукция ТТХ	Гемолиз	Протеолиз	
<i>S. faecalis</i>	+	+	-	-	-
<i>S. faecalis</i> subsp. <i>zymogenes</i>	+	+	+	±	-
<i>S. faecalis</i> subsp. <i>Liquefaciens</i>	+	+	-	+	-
<i>S. faecium</i>	-	-	±	-	-
Подвижные энтерококки	+	+	±	-	+

2 день. Через 15-18 ч предварительно учитывают гемолитическую активность энтерококков, ввиду того, что при инкубации в термостате многие штаммы энтерококков вырабатывают кислые продукты метаболизма с сниженным рН питательной среды до 3,8 - 4,2, разрушением гемоглобина и появлением вокруг колоний зон бурого цвета.

При учете ферментативной, гемолитической и протеолитической активности определяются 4 возможных варианта изменений ЭДС:

а) гемолитически активные штаммы энтерококков образуют вокруг

колоний белые зоны, соответствующие цвету молочного агара;  
б) у протеолитически активных штаммов появляются четко выраженные темно-красные или бурые зоны вокруг колоний;

в) при наличии обоих (гемолитического и протеолитического) ферментов, среда вокруг колоний просветляется, приобретая вид обычного питательного агара;

г) штаммы энтерококков, не продуцирующие этих ферментов, среда не изменяют.

В конце 1 суток инкубации учитывают на этой же среде способность исследуемых культур к редукции 2-,3-,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ). *S. faecalis* и его варианты (*S. faecalis* subsp. *zymogenes*, *S. faecalis* subsp. *liquefaciens*), восстанавливающие ТТХ, растут в виде вишнево-красных колоний с белыми ободками.

Вид *S. faecium* не восстанавливает ТТХ - колонии его окрашены в слабо-розовый цвет.

2. На сахарно-дрожжевом агаре с теллуридом калия (0,07%) растут только штаммы вида *S. faecalis*, устойчивые к высоким концентрациям теллурита калия. В процессе роста они восстанавливают теллурид калия, образуя при этом черные колонии, окруженные узким бесцветным ободком.

3. В полужидком (0,2%) агаре, засеянном уколом, подвижные формы энтерококков вызывают диффузное помутнение всего столбика среды, тогда как неподвижные виды (*S. faecium*, *S. faecalis* и его разновидности) растут только по уходу прокола.

Таким образом, основными тестами дифференциации вида *S. faecium*, *S. faecalis* являются редукция ТТХ и устойчивость к теллуриду калия.

*S. faecalis* и его варианты: *S. faecalis zymogenes*, *S. faecalis liquefaciens* различаются по образованию гемолитического и протеолитического ферментов.

Основным диагностическим признаком подвижных энтерококков, позволяющим дифференцировать их от всех остальных видов этой группы, является подвижность.

## Идентификация пневмококков (*S. pneumoniae*)

### Оптохиновый тест

Чистую культуру засевают на агар, содержащий 1:50000- 1:100000 оптохина. Пневмококки не растут в присутствии оптохина.

Можно использовать бумажные диски с 6 мкг оптохина, которые накладываются после посева на поверхность среды (посев лучше производить секторами). У пневмококков вокруг диска образуется зона задержки роста не менее 6 мл.

### Тест с желчью

Основан на способности 10% желчи и 2% раствора оксидололов лизировать пневмококк.

### Микробиологические методы идентификации микробов семейства нейссериевых (*Neisseriaceae*)

Семейство нейссериевых (*Neisseriaceae*) объединяет группу аэробных парных кокков и грамотрицательных, неподвижных, не образующих спор.

Семейство включает 4 рода: *Neisseria*, *Branhamella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*.

В род нейссерия (*Neisseria*) согласно Берги (1980) включено 6 видов, которые выделяются от человека: патогенные виды – *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, и, так называемые, непатогенные нейссерии – *N. mucosa*, *N. sicca*, *N. subflava*, *N. flavescens*.

Так называемые непатогенные нейссерии являются комменсалами. У ослабленных больных признана их роль в развитии менингитов, эндокардитов, сепсиса, пневмоний, отитов и синуситов, бронхиальной астмы. Не доказано их значение как возбудителей уретритов, цервицитов и инфекций верхних дыхательных путей.

В род бранхамелла (*Branhamella*) включен только 1 вид – *B. catarrhalis*. Они обнаруживаются на слизистых верхних дыхательных путей и мочеполового тракта. Описаны случаи выделения при менингитах, фарингитах, бронхитах.

Род моракселла (*Moraxella*) состоит из 7 видов, встречающихся у человека. Иногда макакеллы могут быть причиной воспалительных заболеваний у человека – конъюнктивитов (*M. lacunata*), вульвовагинитов, менингитов (*M. nonliquefaciens*, *M. Osloensis* и др.).

Род ацинетобактер (*Acinetobacter*) представлен 2 видами: *A. calcoaceticus* и *A. Iwoffii*. Описаны случаи их выделения при менингитах, бронхоэктатической болезни, конъюнктивитах и при хронических отитах.

Патогенные виды нейссерий не стойки в окружающей среде, очень

требовательны к условиям культивирования, растут на питательных средах с добавлением нативного белка (5% крови, 10-20% сыворотки). Культивирование проводят при повышенной влажности среды в атмосфере, содержащей 5-10% CO<sub>2</sub>. Посев лучше производить на свежеприготовленных средах, после предварительного подогрева сред в термостате.

В мазках из гладких колоний микробы рода нейссерий имеют вид грамотрицательных бобовидных, округлых кокков, расположенных парами и довольно равномерно распределяющийся в поле зрения; в мазках из шероховатых колоний - грамотрицательные кокки располагаются в виде скоплений; клетки микробной популяции имеют однородное окрашивание у нейссерий, полиморфно окрашены у менингококков; у гонококков, вследствие лизиса части клеток, всегда имеются более светлоокрашенные особи.

Моракселлы и ацинетобактер при окраске по Граму имеют форму коротких или округлых палочек, часто напоминают кокки, но могут встречаться самые разнообразные формы клеток, даже нитевидные.

Следующим этапом в изучении культур является определение их каталазной и оксидазной активности.

### **Тест на катклазу**

Все микробы семейства нейссериевых обладают ферментом каталазой, способны расщеплять 10% раствор перекиси водорода с образованием пузырьков газа.

### **Ход микробиологического исследования**

1 день. В зависимости от локализации воспалительного процесса исследуют спинномозговую жидкость, мокроту, отделяемое конъюнктивы, среднего уха, уретры и т.д.

### **Бактериоскопический метод**

Мазки из исследуемого материала окрашивают по Граму. Обнаружение в мазках отрицательных диплококков, расположенных внутри лейкоцитов, позволяет заподозрить патогенные виды нейссерий (менингококк или гонококк). Наличие в мазках из патогенного материала грамотрицательных кокков или мелких овоидных палочек, расположенных парами или короткими цепочками характерно для других представителей семейства нейссериевых.

### Культуральный метод.

Патологический материал засевают на 5% кровяной и 10% сывороточный агар, рН 7,2-7,4.

Посев выращивают при 37 °С в атмосфере, содержащей 10% CO<sub>2</sub> (в эксикаторе с зажженной свечой).

2 день. Через 24ч просматривают засеянные чашки. Менингококки на кровяные средах растут в виде непрозрачных беловато-серых, крупных колоний с блестящей поверхностью и ровными краями, маслянистой консистенции. Менингококки не лизируют эритроциты.

На свежe приготовленном сывороточном агаре менингококки имеют вид бесцветных, опалесцирующих, плоских, круглых колоний с ровным краем, не имеющих валика и уплотнения в центре.

Непатогенные нейссерии растут на поверхности кровяного агара в виде гладких колоний с ровными краями, блестящей поверхностью или шероховатых колоний неправильной формы с неровными краями с причудливо изрезанной поверхностью, некоторые имеют желтый пигмент.

Различные виды (*Moraxella*) хорошо растут на кровяных и сывороточных средах в виде крупных полупрозрачных, круглых, влажных, иногда слизистых колоний с небольшой зоной гемолиза или без него.

Микробы рода *Acinetobacter* (*A. calcoaceticus* и *A. lwoffii*) хорошо растут как на кровяных, сывороточных средах, так и на питательных средах без добавок нативного белка.

Оксидазы обладают все микробы семейства нейссериевых, за исключением *Acinetobacter*.

Таким образом, на 2 день по результатам морфологического изучения колоний, микроскопии мазков, данных каталазной и оксидазной активности можно дать ответ о предполагаемом роде микроба семейства нейссериевых - для микорлбов родов нейссерия и бранхамелла характерны грамотрицательные диплококки, положительная реакция на каталазу и оксидазу; для микробов рода моракселла - грамотрицательные овоидные палочки, положительная реакция на каталазу и оксидазу; для микробов рода ацинетобактер - грамотрицательные овоидные палочки, реакция на каталазу - положительная, на оксидазу - отрицательная.

Колонии, подозрительные для представителей родов семейства нейссериевых, отсевают секторами на чашку Петри или на косяки с сывороточным агаром для получения чистой культуры, требующей видовой идентификации и определения ее чувствительности к антибиотикам. Если при первичном посеве выросла чистая культура, выделенная из спинно-

мозговой жидкости, крови, слизистой конъюнктивы, пунктатов органов, то эта культура может считаться возбудителем патологического процесса и требует идентификации ее вида.

3 день. Для проверки чистоты культур, выделенных с сывoroточного агара, проводят бактериоскопию мазков, окрашенных по Граму. Повторно уточняют каталазную и оксидазную активность чистых культур. Для определения видовой принадлежности проводят изучение биохимических свойств у выделенных культур.

Далее определяют чувствительность к антибиотикам. При необходимости определения вида возбудителя микробов из семейства нейссериевых лучше сеять взвесь культур, смытых инактивированной лошадиной сывoroткой, уколом на столбики полужидкой среды Хью-Лейфсона, содержащей глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу и фруктозу; на среды для определения редукции нитратов и нитритов; на питательный агар с 5% сахарозы для определения полисахаридообразования; на агар с гидролизатом казеина для учета йодной реакции и чашки с 5% желточным агаром с добавлением сывoroтки. Чистая культура, подозрительная на менингококки, подвергается серотипированию с помощью агглютинации на стекле или преципитации в геле.

Культуры, подозрительные на моракселлы и ацинетобактер, следует посеять дополнительно на среды с цитратом, мочевиной и провести определение желатиназы.

4 день. Просматривают посе́вы, сделанные в предыдущий день. Учитывают рост на желточном агаре, сахаролитическую активность, ставят реакцию с водным раствором Люголя на продукцию полисахарида, а также учитывают данные утилизации цитрата, гидролиза мочевины и наличие желатиназы. В этот день выдают окончательный ответ с указанием вида микроорганизма.

Видовые особенности нейссерий и других представителей семейства нейссериевых представлены в таблице.

**Культуральные и биохимические свойства видов рода *Neisseria* и  
рода *Branhamella*.**

Вид	Катализа	Оксидаза	Пигмент	Глюкоза	Мальтоза	Фруктоза	Сахароза	Лактоза	Редукция		Полисахариды в виде 5% сахарозы на	Темолит	Реакция на вод	Рост на 5% желчи
									Нитратов	нитритов				
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>N. meningitidis</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>N. subflava</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>N. flava</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>N. perflava</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>N. sicca</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>N. mucosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>N. flavescens</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>B. catarrhalis</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

**Микробиологические методы идентификации  
энтеробактерий**

Представители семейства *Enterobacteriaceae* широко распространены в природе: их обнаруживают в почве, воде, на растениях, и, конечно, в кишечнике человека и животных. Они наиболее часто встречаются при анализе разнообразного клинического материала. Классические кишечные инфекции вызывают безусловно патогенные представители родов *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* *Escherichia*, пневмонию иринит с характерными симптомами вызывают клебсиеллы, из ран и инфицированных мочевых путей частовыделяют *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*

Из всех клинически значимых бактерий энтеробактерии составляют около 50%, из грамотрицательных – примерно 80%. На долю энтеробактерий приходится около 50% всех возбудителей септицемий и более 70% возбудителей инфекций мочевого тракта.

Кроме представителей рода *Shigella*, многие энтеробактерии вызывают внекишечные инфекции (мочевые, особенно, циститы, респираторные, раневые, кровяные, инфекции ЦНС). Их чаще вызывают следующие

представители видов: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* и *Serratia marcescens*. Поскольку такие инфекции нередко угрожают жизни больного, существует необходимость в быстром выделении, идентификации соответствующих возбудителей и определении их чувствительности к антимикробным воздействиям.

Многие энтеробактерии при 37°C подвижны, перитрихи; неподвижны (при 37°C) *Shigella* spp., *Klebsiella* spp., *Leminorella* spp., *Moellerella* spp., *Obesumbacterium* spp., *Tatumella* spp. и некоторые виды (биовары) *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Morganella*, *Salmonella* *Yersinia*. Являясь факультативными анаэробами, энтеробактерии, как правило, хорошо растут на универсальных питательных средах, где образуют характерные изменения. Хорошо известной характеристикой протеев (и, как показано недавно, некоторых сальмонелл) является способность к "роению" на плотных средах. Слизистые колонии (особенно на средах с углеводами) образуют представители родов *Klebsiella* и *Enterobacter*. Колонии с желтым пигментом характерны для *Enterobacter sakazakii* и *Enterobacter agglomerans* (подобные колонии образуют "неферментирующие" *Flavobacterium*). Для первичного выделения из контаминированных образцов и идентификации энтеробактерий используют разнообразные дифференциально-диагностические и селективные среды.

В основе идентификации и дифференциации энтеробактерий лежит детерминируемый хромосомными генами ферментивный профиль. Для его выделения разработаны многочисленные тесты, основная часть которых приведена ниже. Присутствие или отсутствие определенных ферментов указывает на конкретные метаболический путь, свойственный микробам данного вида. Субстраты для этих ферментов, помещенные в питательную среду, позволяют их выявить. Например, по реакции индикатора на специфические продукты расщепления или по признаку утилизации субстрата. Для идентификации и дифференциации энтеробактерий у микробных культур определяют такие свойства, как способность утилизировать различные углеводы, цитрат, образовывать ацетоин или смесь кислот при ферментации глюкозы (тесты Фогеса-Проскауэра и с метиловым красным), уреазную активность, образование индола, сероводорода, декарбокислирование и дезаминирование аминокислот, подвижность.

Идентификация энтеробактерий начинается с изучения их колоний на пластинчатых средах. Для целей клинической микробиологии это, в

первую очередь, среды Эндо или ЭМС-агар (с эозинметиленовым синим); обладающие дифференциально-диагностическими свойствами. При исследовании кишечного содержимого могут быть использованы дополнительные среды Плоскирева, висмут-сульфитный агар, слабощелочной и кровяной агар.

На среде Эндо колонии представителей семейства Enterobacteriaceae обычно выпуклые с правильными очертаниями (крута), более или менее опалесцирующие, иногда слизистые. Они могут быть окрашены в красный цвет с наличием металлического блеска или без него (лактозоположительные бактерии), бесцветными (лактозоотрицательные) могут приобретать розовый или сероватый оттенок с более или менее выраженным темным центром, особенно у более крупных колоний.

Диаметр и окраска колоний может варьировать не только в зависимости от родовой принадлежности, но и от массивности роста. В среднем, их диаметр составляет 1-2 мм, мелкие бесцветные колонии росинки - характерны в первые сутки роста для иерсиний (*Y. Enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*).

*P. vulgaris* и *P. mirabilis* обычно дают вуалеобразный рост ("роение"), а представители родов *Klebsiella* и *Enterobacter* чаще образуют сочные слизистые розовые колонии диаметром 2-3 мм. Сальмонеллы, гафнии, нероящиеся представители родов протеев обычно образуют более "нежные" колонии небольших размеров. Часть штаммов сerratий дает розово-красные с фуксиновым оттенком пигментированные колонии.

Намеченные для дальнейшего изучения колонии снимают бактериологической петлей (или иглой) и засевают штрихом по косяку и уколом в столбик комбинированной среды для первичной идентификации. Наиболее принятыми в отечественных лабораториях являются среды Клиглера, Олькеницкого и их модификации. Эти двух- (лактоза, глюкоза) и трех- (лактоза, глюкоза, сахароза) сахарные среды, включающие для выявления образования сероводорода: аммоний - железо (II) - сульфат (соль Мора), натрий триосульфат (гипосульфат) и мочевины, позволяют после 18-20-часовой инкубации их при 37°C составить предварительное заключение о возможной родовой принадлежности культур и определить набор необходимых тестов для идентификации рода и вида.

Далее на 2 день проводят учет результатов посева в среду для первичной идентификации.

Микробы семейства Enterobacteriaceae дают на поверхности скошенной части среды Клигера, Олькеницкого (или модификации) влажный,

однородный, опалесцирующий рост без пигментообразования (за исключением представителей рода *Segetia*).

Ферментация глюкозы - облигатное свойство всех бактерий - проявляется в изменении окраски столбика среды (цвет от используемого в среде индикатора, а также интенсивности кислотообразования).

При наличии в составе среды мочевины (среда Олькеницкого и ее модификации) окраска столбика среды не меняется в случаях выделения энтеробактерий, гидролизующих мочевину (многие представители родов *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, вида *E. cloacae*, кроме *P. inconstans*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, иногда *S. marcescens*). В этих случаях кислые продукты ферментации глюкозы нейтрализуются щелочными продуктами гидролиза мочевины.

Особенности гидролиза мочевины клебсиеллами и иерсиниями не всегда позволяют выявить этот признак при включении мочевины в комбинированную среду. Более надежным для них является определение уреазной активности в средах с мочевиной по Кристенсону или по Преусу, для чего параллельно с посевом в комбинированную среду делают посев в пробирку со средой Кристенсена.

Неизменная окраска столбика среды, не содержащей мочевины (среда Клиглера), свидетельствует о выделении микробов, не относящихся к семейству *Enterobacteriaceae*.

Кроме кислотообразования, по наличию разрывов (отслаиванию среды со стенок или дна пробирки) в столбике комбинированной среды судят об образовании при ферментации глюкозы газообразных продуктов (газообразование характерно для большинства эшерихий, эдвардсиелл, цитробактеров, подавляющего большинства сальмонелл, представителей трибы клебсиелл, отдельных видов протей).

Почернения среды, появляющиеся в средней или нижней части столбика, происходит при образовании выделенного микробом сероводорода, что свойственно представителям рода *Salmonella*, видов *S. freundii*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *Edwardsiella* и некоторым представителям рода *Erwinia*.

Способность ферментировать лактозу (в трехсахарной среде и сахарозу) оценивают по изменению окраски скошенной части комбинированной среды. Обычно лактозоположительными бывают представители родов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*. Ферментация лактозы нередко коррелирует с ферментацией сахарозы. В неясных случаях следует проверить эти свойства путем посева культур в среды Гисса с соответствующими углеводами.

Таким образом, через 18-20 ч инкубации посева в комбинированную среду и одновременно в среду с мочевиной по Кристенсену или по Преусу возможен учет 4-5 признаков, характеризующихся выделением культур, и позволяет значительно сузить диапазон подозреваемых групп.

Сходное сочетание биохимических реакций (отношение к лактозе, глюкозе, мочеvine, образование сероводорода) может наблюдаться одновременно у нескольких родовых групп семейства *Enterobacteriaceae*, и для их дифференциации необходимо использовать дополнительные тесты, минимально необходимые для установления родовой, в ряде случаев, и видовой принадлежности. Известно немало рекомендаций по составу таких минимальных наборов дифференциальных тестов для определения рода в семействе *Enterobacteriaceae*.

Второй день завершают посевами на среды минимального дифференцирующего ряда искошенный питательный агар.

Далее на 3 день проводится регистрация результатов испытываемой культуры в минимальном ряде тестов, делают заключение о родовой принадлежности культуры.

В клинической микробиологии идентификация энтеробактерий завершается обычно определением рода и вида выделенной культуры, лишь при наличии эпидемиологических показаний, а иногда для утверждения этиологической значимости, она дополняется определением биоваров. Попытки пренебрегать определением минимального ряда родовых биохимических тестов неизбежно влекут за собой ошибочную диагностику, исключая возможность выявления всего многообразия условно-патогенных энтеробактерий, связываемых в настоящее время с патологией человека.

Определение по минимальному набору тестов родов *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Hafnia*, *Serratia* (включающих согласно "краткого определителя бактерий Берги", по одному виду) позволяет одновременно делать заключение о выделении соответствующих видов *E. coli*, *E. tarda*, *H. alvei*, *S. marcescens*.

Наличие фуксиново-красного или розового пигмента может подтверждать принадлежность выделенной культуры к виду, но отсутствие пигмента не исключает такого заключения.

Если по предварительным данным не исключена принадлежность культуры к родам *Hafnia* или *Yersinia*, целесообразно сделать посев в 2 пробирки со средой Кларка, одну из которых оставить до следующего дня при комнатной температуре, а другую – при 37°C, с последующим

воспроизведением тестов с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра. Дополнительным признаком в пользу выделения может быть особенно бурное (в сравнении с другими энтеробактериями) выделение кислорода в пробе с 3%  $H_2O_2$  на предметном стекле (тест на каталазу).

На 3 день идентификации культуры, отнесенные по данным учета минимального ряда к родам *Salmonella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Yersinia*, подвергают дальнейшему изучению.

При внутриродовой дифференциации требуются различные наборы биохимических тестов для разных родов.

### **Тесты , используемые для идентификации энтеробактерий** **Цитохромоксидазный тест**

(тест на оксидазу, цитохромоксидазную активность)

Принцип метода. 1) в присутствии микробной цитохромоксидазы и ?-нафтола из  $N_2N$ -диметил-*p*-фенилендиамина образуется индофенол синий и развивается ярко-синее окрашивание (индофенольный метод Эрлиха). 2) из тетраметил-*p*-фенилендиамина гидрохлорида под воздействием окисленного цитрохрома С образуется вурстеровский синий и развивается темно-красное окрашивание (метод Ковача).

Цитохромоксидаза является компонентом системы цитохромов, входящей в электронотранспортную цепь. Функцией этой цепи является получение энергии (в виде молекул АТФ) путем создания электрохимического градиента, который обеспечивает перенос атомов  $H^+$  (электронов) с различных субстратов на неорганические соединения. В ходе аэробного дыхания таким соединением служит  $O_2$ , анаэробного нитраты, нитриты, сульфаты, сера, карбонаты, Fe.

### **. Тест на каталазу** **(тест с пероксидом водорода)**

Принцип метода. При внесении микробной культуры в раствор перекиси водорода под влиянием микробной каталазы из него выделяется молекулярный кислород.

Тест-реактив: 3%-ный раствор перекиси водорода.

Тестирование. Тест-реактивом (0,5-1,0 мл) смачивают культуру, выросшую на поверхности скошенного агара (нельзя использовать кровяной агар, т.к. катализа эритроцитов может дать ложно-положительную

реакцию). В течение нескольких секунд при наличии каталазной активности в жидкости образуются пузырьки газа (кислорода). *Альтернативный метод* : исследуемую колонию вносят в каплю тест реактива на чистом предметном стекле и сразу отмечают появление пузырьков газа.

Бурное газообразование при разложении пероксида дают виды *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* и *Pseudomonas*, умеренное – виды *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, слабое – виды *Shigella* и большинство штаммов *Escherichia*.

### **Тест на восстановление нитратов. (нитратредуктазный тест)**

Принцип метода. Образование в ходе восстановления нитрата нитрит (под влиянием микробной нитратредуктазы теряет атом кислорода) в присутствии  $N_2N$ -диметил-1-нафтиламина образует диазосоединение, которое окрашивает среду в красный цвет. Нитратредуктаза наиболее активна в анаэробных условиях.

#### Тестирование.

При наличии нитратредуктазной активности в течение нескольких минут развивается красное окрашивание среды (положительная реакция). При сомнительных результатах культуры икубируют при той же температуре и повторяют тест через 2,3 или 4 суток.

### **Тест окисления-ферментации. (тест OF)**

Принцип метода. Использование бактериями различных путей расщепления глюкозы. Окислительный процесс включает прямое окисление карбоксильной группы углевода в присутствии атмосферного кислорода, который является конечным акцептором водорода (электронов). Ферментативный процесс протекает в анаэробных условиях и сопровождается фосфорилированием глюкозы и переносом водорода (электронов) на органические субстраты с образованием кислот, альдегидов и газообразных веществ. Для определения необходимо засеять в небольшом количестве молодую культуру со скопленного питательного агара уколами в 2 пробирки. После посева, в одну пробирку добавить стерильный расплавленный вазелин или парафин с образованием слоя толщиной 3-5 мм.

Оценка результата. Образование кислоты в обеих пробирках свидетельствует о ферментативной реакции. Образование кислоты, сопровождающееся изменением цвета среды только в пробирке без вазелина (парафина), свидетельствует об утилизации глюкозы путем окисления. Отсутствие кислотообразования в обеих пробирках свидетельствует о том, что тестируемые микроорганизмы не утилизируют глюкозу этими путями. В 2 последних случаях микроорганизмы могут относиться к "неферментирующим" видам - *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Flavimonas*, *Flavobacterium*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Stenotrophomonas*.

### **Тест на подвижность**

Принцип метода. Подвижные бактерии образуют в прозрачной полужидкой среде в различной степени выраженное диффузное помутнение.

Оценка результата. Подвижные бактерии дают диффузное помутнение среды. Неподвижные бактерии растут по ходу укола, среда при этом остается прозрачной. В случае отрицательного теста на подвижность провести дополнительную инкубацию при 21-25°C в течение 5 дней. При сомнительных результатах культуры предварительно пассируют в U-образных трубках, содержащих 0,2% полужидкий агар, и вновь повторяют тест.

Подвижность является важной характеристикой энтеробактерий, особенно при идентификации шигелл, клебсиелл и энтеропатогенных иерсиний (последние подвижны при температурах ниже 30, но неподвижны при 37°C).

### **Сероводородный тест**

(тест на образование сероводорода из неорганических соединений серы).

Принцип метода. Образование в ходе метаболизма углеводов кислоты (ацетальдегид) изменяет pH среды в кислую сторону; бактерии, обладающие триосульфатредуктазой, в кислой среде и анаэробных условиях восстанавливает триосульфаты в сульфит с образованием бесцветного сероводорода, который при взаимодействии с железом (II) сульфатом образует черный осадок сульфида железа.

## Полиуглеводные среды.

(среда Клиглера, TSI и т.п.).

Среда Клиглера (I. Kligler, 1917) имеет тот же состав, но без сахарозы. Экстракты и пептон дают среде богатую и питательную основу, что позволяет не только накапливать материалы из изолированных колоний, выросших на селективной среде, но и одновременно изучать ее биохимические признаки. Принципиальное значение имеет соотношение глюкоза/лактоза (сахароза) равное 1:10. Индикатор феноловый красный становится желтым при значениях pH менее 6,8. При исходном значении биохимической реакции должны протекать не только в аэробных условиях (в глубине столбика).

Оценка результата. При отсутствии кислотообразования из углеводов (например, при росте *Pseudomonas aeruginosa* и других т.н. неферментирующих бактерий) образующиеся из пептидов амины зашелачивают среду и она окрашивается в красный цвет. Если на полиуглеводной среде растут бактерии (например, *Shigella* spp.), ферментирующие глюкозу, но неферментирующие лактозу (а на среде TSI - и сахарозу), то в первые 8-12 ч вся среда закисляется и становится желтой, после чего относительно небольшое количество образованной кислоты нейтрализуется образующимися аминами. Этот процесс более активно идет в аэробных условиях, поэтому вблизи скошенной части реакция среды вскоре меняется на щелочную и среда имеет красный скоп и желтый столбик. В случае роста глюкозо-лактозоферментирующих (а на среде TSI - и/или сахарозоферментирующих) бактерий, например, *Escherichia coli* или группы *Klebsiella-Enterobacter*, ввиду образования большого количества кислот к 24-48 ч инкубирования щелочения среды не происходит, вся она остается окрашенной в желтый цвет. Затем по мере накопления аминов pH среды постепенно сдвигаются в щелочную сторону и она краснеет (после 48 ч). Если при ферментации углеводов образуется газ ( $H_2CO_2$ ), в толще среды формируются пузырьки и разрывы. в случае выделения сероводорода в среде откладывается черный преципитат сульфида железа (см. "Сероводородный тест"). Если преципитат "маскирует" цвет среды, то реакцию следует расценивать как кислую, т.к. для образования  $H_2S$  требуются ионы водорода (они в большом количестве образуются в столбике среды при ферментации глюкозы).

Полиуглеводные среды обычно используют для предварительной идентификации культур, похожих на энтеробактерии. Это позволяет избежать расхода средств и времени на постановку многочисленных

биохимических тестов. Среда TSI рекомендуется при исследовании на сальмонеллы и шигеллы: реакция кислота/кислота (ферментация глюкозы, лактозы и/или сахарозы) позволяет в большинстве случаев исключить принадлежность культуры к этой группе бактерий.

Таблица 23.

Характеристика часто выделяемых из клинического материала и/или имеющих медицинское значение представителей семейства Enterobacteriaceae (J.J. Farmer III et al., 1985, 1995, 1999)

вид	М	А	П	Н	У	Ф	Л	А	О	П	Ж	Г	Л	С	М	Д	А	С	А	Р	Р	К	М	Д	О
ндол	К	ц	т	2S	о	А	и	р	р	о	е	л	а	а	а	у	д	о	р	а	а	с	е	и	Н
		ст	о		р		з	к	к	д	л	к	к	х	н	л	о	р	б	ф	и	и	л	и	Р
		о	а		е		н	т	т	в	ю	т	т	н	и	у	н	и	н	н	н	л	и	и	К
		и	т		а		н	ж	ж	н	а	о	о	о	т	л	и	т	о	о	о	о	о	о	а
		н	т		а		н	и	и	и	г	з	з	з	а	а	ц	т	з	з	з	з	з	з	а
		и	т		а		н	и	и	и	а	а	а	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а	а	а	а	а
		и	т		а		н	и	и	и	г	з	з	а	а	и	т	а	а	а	а				

Salmo nel la (o бл ш ик ст во се ро ва ро в)	1	0	0	9	95	1	0	9	7	9	9	0	9	1	1	1	9	0	9	9	2	9	9	9	2	2
Salmo nel la typ by	0	1	0	0	97	0	0	9	3	0	9	0	0	1	0	1	0	0	9	2	0	0	8	1	0	0
Salmo nel la	0	1	0	0	10	0	0	0	1	9	9	0	9	0	0	1	9	0	9	1	0	1	0	9	0	0
	0	0	0	0				5	5	5		9			0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	

### Принципы фенотипической идентификации

Системы идентификации микроорганизмов могут быть безмашинными (ручными) и машинными (полуавтоматические или автоматические, с применением компьютера или других устройств). Наиболее распространенными из ручных систем считаются перекрестные таблицы (по типу шахматной доски) и нисходящие диаграммы (дихотомические схемы). Машинные системы используются с применением цифрового кодирования признаков.

#### Безмашинные (ручные) системы.

Во многих лабораториях фенотипическая идентификация бактерий проводится вручную с применением перекрестных таблиц, классический пример которой приведен в таблице. В таких таблицах на пересечении (напротив) конкретного биологического вида (группы) и соответствующего признака указывается вероятность положительного или отрицательного результата тестирования. Она может быть выражена в виде % положительно реагирующих штаммов данного вида, в виде условного обозначения: +, +/-, =/+ , d, v, - или др. (обычно под "+" понимают положительную реакцию у 90% штаммов и более, под "-" - менее, чем у 10% культур). Применение таких таблиц удобно при небольшом количестве возможных видов и тестов. В случае энтеробактерий перекрестная таблица может иметь более 120 микроорганизмов и 47 тестов, что делает работу по идентификации крайне утомительной, а главное, значительно снижает степень точности идентификации и возрастает время, необходимое для подбора наиболее вероятного вида по совокупности имеющихся признаков.

Дихотомические схемы были введены с 60-х годов для упрощения работы по идентификации. В подобных схемах в соответствии с дихотомическим алгоритмом вычеркивают серию тестов, указывая списки видов (или вид) в случае положительного или отрицательного результата. Так, по данным авторов, при тестировании 300 штаммов энтеробактерий из мочи идентификация с применением диаграммы достигнута в 93% случаев. Хотя работа с дихотомической схемой проще, чем с таблицей, она чаще приводит к некорректной идентификации. Это может быть следствием учета нетипичного признака, ошибочной интерпретации теста или тестирования смешанной культуры. Следует отметить, что многие нисходящие диаграммы включают признаки, вероятность проявления которых у дифференцируемых видов далека от 100%. Использование дихотомической схемы более оправдано с целью предварительной идентификации.

#### Автоматические/полуавтоматические системы.

Цифровое кодирование. Использование цифрового кода для описание признаков неизвестной культуры позволяет представить ее образ ("фенотипический портрет", профиль) в абстрагированном виде, удобным для распознавания автоматом (компьютером). Известно, что автоматические системы могут работать с информацией по принципу двоичной цифровой системы. Такая система предполагает кодирование информации 2 альтернативными числами: "0" - "выключено" и "1" - включено. В идентификации это может обозначать отсутствие (0) и наличие (1) признака. В соответствии с двоичным кодом, результаты тестирования культуры, например, коммерческим набором миниатюризированных АР120Е, будут выглядеть следующим образом.

Тест	Реакция	Код
ONPG	+	1
Аргинин	-	0
Лизин	+	1
Орнитин	-	0
Цитрат	+	1
Сероводород	-	0
Мочевина	-	0
Триптофан	-	0
Индол	-	0
Фогес-Проскауэр	+	1
Желатина	+	1
Глюкоза	+	1
Маннит	+	1

Маннит	+	1
Инозит	+	1
Сорбит	+	1
Рамноза	-	0
Сахароза	+	1
Мелибиоза	+	1
Амигдалин	+	1
Арабиноза	-	0
Оксидаза	-	0

Следовательно, полученный образ неизвестной культуры может быть представлен в виде цифрового кода 10101000011111011100. Несмотря на то, что компьютер предназначен для введения (получения) информации в двоичной системе (1/0 бит), человеческий мозг не может эффективно оперировать с такими цифровыми кодами. С целью упрощения двоичный код можно перевести в восьмеричный, где каждая цифра (от 0 до 7) соответствует одному из 8 возможных сочетаний в триplete (трех признаков). Система восьмеричного кода представлена ниже.

Двоичная (бинарная) система	Пересчет	Восьмеричный код
---	$0 + 0 + 0 =$	0
+--	$1 + 0 + 0 =$	1
-+-	$0 + 2 + 0 =$	2
++-	$1 + 2 + 0 =$	3
--+	$0 + 0 + 4 =$	4
+ - +	$1 + 0 + 4 =$	5
- + +	$0 + 2 + 4 =$	6
+++	$1 + 2 + 4 =$	7

Когда отсутствуют все три признака, в восьмеричной системе это соответствует цифре 0, если имеется только 1 признак слева – 1, только центральный – 2, только правый – 4, если имеется различное сочетание признаков, то цифра восьмеричного кода соответствует сумме кодовых чисел (1,2 или 4).

Следовательно, приведенный выше пример профиля штаммов после тестирования набором AP1 20E, включающим 21 тест, можно представить в виде: 101 010 000 111 111 011 100

Это позволяет перевести результат в восьмеричный код:

101 010 000 111 111 011 100  
5 2 0 7 7 6 1

Естественно, число 5207761 легче запоминается и им удобнее пользоваться при операциях, по сравнению с числовым кодом 010 000 111 111 011 100. Цифровой код восьмеричной системы называют цифровым биоваром, т.к. каждая цифра кода соответствует определенным результатам 3 тестов. Производители наборов реактивов для идентификации, разработчики ручных систем для идентификации публикуют указатели, в которых имеются сотни и тысячи цифровых биоваров, каждому из которых соответствует 1-2 наиболее вероятных видов бактерий. Так, вышеуказанному биовару 5207761 в кодовом указателе "API 20E Profile Index" соответствует запись: *Serratia marcescens*: acceptable identification; *S. marcescens*: 1\243; and *S. rubidaea*: 1\2859. Это означает, что результаты проведенных тестов позволяют идентифицировать неизвестную культуру как *Serratia marcescens*. Уровень идентификации приемлемый. Этот вывод базируется на компьютерном сравнении данного биовара с каждым из биоваров известных видов, хранящихся в компьютерной базе данных. Цифры 1\243 и 1\2859 обозначают относительную расположенность 2 видов серации с указанным профилем (для *S. marcescens* 1 "шанс" из 243 произвольно отобранных штаммов встретить указанный профиль, для *S. rubidaea*: 1 из 2859). Эти цифры, однако, не соответствуют степени вероятности того, что тестируемая культура относится к указанным видам. Поэтому для практических целей гораздо важнее знать процент вероятности соответствия данного профиля конкретному виду микроорганизмов. Подсчет % вероятности в ходе компьютерной идентификации неизвестной культуры основан на сравнении ее профиля с профилем каждого таксона (вида, биовара), хранящегося в памяти компьютера (обычно подобные компьютерные программы имеют алгоритм на основе теоремы Бейса). В случае 90%-ного и более совпадения профилей с одним из таксонов, например система API, может выдавать сообщение "Превосходная идентификация", "Приемлемая идентификация", или "Очень хорошая идентификация" (с указанием %). Если уровень совпадения близок к 90%, для окончательной идентификации может потребоваться проведение 1-2 дополнительных тестов и повторная идентификация; при низком уровне совпадения культура не подлежит идентификации.

В упрощенном виде пример компьютерной идентификации неизвестной культуры представлен ниже.

Этап 1. Ввод результатов тестирования (профиля) неизвестной культуры:

	Индол	Метилловый красный	Фогес- Проскауэра	Цитрат
Неизвестная культура	+	-	+	-

Этап 2. Вероятность положительного результата по 4 тестам у неизвестных энтеробактерий (в %, в соответствии с базой данных):

	Индол	Метилловый красный	Фогес- Проскауэра	Цитрат
<i>Serratia marcescens</i>	1	20	98	98
<i>Enterobacter agglomerans</i>	20	50	70	50
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	20	95	95

Этап 3. Определение вероятности получения указанного результата по каждому из 4 тестов у известных энтеробактерий (при положительном результате теста у неизвестного микроба, в данном случае у тестов на индол и Фогеса-Проскауэра, вероятность положительного результата соответствует базовому значению; при отрицательном результате - вероятность отрицательного результата вычисляют, как разность между 1 и вероятностью положительного результата):

	Индол	Метилловы й красный	Фогес- Проскауэр	Цитрат
<i>Serratia marcescens</i>	0,01	0,80	0,98	0,2
<i>Enterobacter agglomerans</i>	0,20	0,50	0,70	0,50
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0,99	0,80	0,95	0,05

**Этап 4. Расчет частоты указанного профиля у каждого из 3 видов энтеробактерий (вычислят перемножением частот по всем 4 тестам):**

<i>Serratia marcescens</i>	$= 0,01 \times 0,80 \times 0,98 \times 0,02 = 0,0001568$
<i>Enterobacter agglomerans</i>	$= 0,20 \times 0,50 \times 0,70 \times 0,50 = 0,0350000$
<i>Klebsiella oxytoca</i>	$= 0,99 \times 0,80 \times 0,95 \times 0,05 = 0,0376200$
	? = 0,0727768

**Этап 5. Расчет уровня идентификации - % совпадения с данным профилем у каждого из 3 видов энтеробактерий (вычисляют путем определения доли частоты по каждому виду в сумме ?):**

<i>Serratia marcescens</i>	$= (0,0001568 : 0,0727768) \times 100\% = 0,21\%$
<i>Enterobacter agglomerans</i>	$= (0,0350000 : 0,0727768) \times 100\% = 48,1\%$
<i>Klebsiella oxytoca</i>	$= (0,0376200 : 0,0727768) \times 100\% = 51,7\%$

**Этап 6. Ранжирование видов по уровню идентификации -% совпадения с данным профилем.**

1. <i>Klebsiella oxytoca</i>	(уровень = 51,7%)
2. <i>Enterobacter agglomerans</i>	(уровень = 48,1%)
3. <i>Serratia marcescens</i>	(уровень = 0,21%)

Приведенный пример показывает, что наибольшее совпадение с введенным профилем – у вида *Klebsiella oxytoca*, но близкий уровень имеет и вид *Enterobacter agglomerans*, поэтому для окончательной идентификации требуется проведение дополнительных тестов, которые позволят дифференцировать эти виды. Кроме того, данный профиль не часто встречается у представителей вида *Klebsiella oxytoca* (в соответствии с данными этапа 4, примерно в 3,8% случаев).

## Клиническое значение условно-патогенных видов семейства Enterobacteriaceae.

<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Обнаруживают чаще в кале, очень редко — в крови
<i>Citrobacter braakii</i>	Обнаруживают в раневом отделяемом, моче и кале.
<i>Citrobacter freundii</i> *	Обнаруживают в моче, мокроте, отделяемом из горла, в крови и раневом отделяемом, кале
<i>Citrobacter koseri</i> *	Обнаруживают в моче, мокроте, отделяемом из горла и носа, ран; могут вызвать (редко) менингит у новорожденных
<i>Citrobacter murliniae</i>	Обнаруживают чаще в кале, в крови
<i>Citrobacter seldakii</i>	Обнаруживают чаще в кале, раневом отделяемом, в крови
<i>Citrobacter werkmanii</i>	Обнаруживают чаще в кале, в моче
<i>Citrobacter youngae</i>	Обнаруживают чаще в кале, в крови
<i>Edwardsiella tarda</i> *	Опportunистический возбудитель раневой инфекции и диареи
<i>Enterobacter aerogenes</i> *	Возбудитель разнообразный опportunистических инфекций
<i>Enterobacter asburiae</i>	Обнаруживают в крови, моче, мокроте, кале, отделяемом ран.
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	Обнаруживают в разнообразном материале, включая кровь и ликвор
<i>Enterobacter cloacae</i> *	Частый возбудитель различных опportunистических инфекций
<i>Enterobacter gergoviae</i>	Обнаруживают в моче, мокроте, изредка в крови
<i>Enterobacter hormaechei</i>	Обнаруживают в крови, раневом отделяемом, мокроте
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Вызывает менингит, абсцесс мозга, бактериемию у новорожденных
<i>Escherichia hermannii</i>	Обнаруживают чаще в раневом отделяемом и в кале
<i>Escherichia vulneris</i>	Обнаруживают чаще в раневом отделяемом
<i>Ewingella americana</i>	Обнаруживают чаще в раневом отделяемом, мокроте, крови, кале, моче
<i>Hafnia alvei</i> *	Обнаруживают чаще в раневом отделяемом, мокроте, крови, кале, моче
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	Обнаруживают чаще в раневом отделяемом, мокроте, крови, кале, моче
<i>Klebsiella oxytoca</i> *	Частый возбудитель различных опportunистических инфекций
<i>Klebsiella pneumoniae</i> подвид <i>pneumoniae</i> *	Частый возбудитель различных опportunистических инфекций
<i>Klebsiella pneumoniae</i> подвид <i>ozeanae</i>	Возбудитель азены (атрофического ринита); выделяют при различных опportunистических инфекциях
<i>Klebsiella pneumoniae</i> подвид <i>rhinoscleromatis</i>	Возбудитель риносклеромы (гранулематозного ринита) и других инфекций верхних отделов респираторного тракта
<i>Kluyvera ascorbata</i>	Обнаруживают в мокроте, крови, кале, моче
<i>Morganella morganii</i> подвид <i>morganii</i> *	Вызывает инфекции мочевого тракта; его обнаруживают в разнообразном клиническом материале из других биотопов
<i>Pantoea agglomerans</i>	Обнаруживают в раневом отделяемом, крови, мочи
<i>Photobacterium luminescens</i>	Обнаруживают в раневом отделяемом, крови
<i>Proteus mirabilis</i> *	Частый возбудитель различных опportunистических инфекций
<i>Proteus vulgaris</i> *	Частый возбудитель различных опportunистических инфекций
<i>Proteus penneri</i>	Могут вызывать инфекции мочевых путей и раневые инфекции
<i>Providencia alcalifaciens</i> *	Обычно выделяют от диарейных больных, особенно у детей
<i>Providencia rettgeri</i> *	Чаще выделяют из мочи стационарных больных после катетеризации
<i>Providencia stuartii</i> *	Чаще выделяют из мочи, реже ран, крови, известны вспышки ВБИ
<i>Serratia grimesii</i>	Обнаруживают в разнообразном клиническом материале
<i>Serratia marcescens</i> *	Частый возбудитель различных опportunистических инфекций

**Примечание:** \* отмечены часто встречающиеся виды с доказанным клиническим значением.

## Определение чувствительности к антимикробным средствам

Испытание чувствительности микробов к антибиотикам - один из наиболее важных видов работы, выполняемой микробиологическими лабораториями. Цель этих исследований - корреляция чувствительных микробов - возбудителей *in vitro* с фармакокинетическими свойствами противомикробных препаратов. При выборе антимикробных средств для лечения того или иного заболевания следует учитывать данные о чувствительности возбудителя к антибиотикам *in vitro*, фармакокинетические свойства антибиотиков, динамику развития и патологию инфекционного процесса, иммунный статус больного.

### Основные принципы определения антимикробной чувствительности

Тест на антимикробную чувствительность позволяет измерить способности антибиотика или другого антимикробного агента вызывать угнетение роста бактериальных клеток *in vitro*, которая может быть оценена с помощью метода разведений или диффузионного метода.

#### Метод разведения

Для количественной оценки активности антибиотика различные разведения антибиотика можно внести в бульон или агаровую среду, на которые затем будет посеян исследуемый микроорганизм. Самая низкая концентрация, препятствующая росту микроорганизма после суточной инкубации, считается минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) антимикробного агента. Показатель МИК затем сравнивают с концентрацией лекарственного вещества, которую можно создать в сыворотке или других жидкостях тела человека, что позволяет оценить возможный клинический ответ.

Метод серийных разведений в жидких средах позволяет установить МИК и минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) препарата для выделенного возбудителя. Исследование можно выполнять в различных объемах питательной среды - от 1 до 10 мл. В качестве питательной среды обычно используют МПБ или любая другая, соответствующая пищевым потребностям возбудителя. В пробирках (обычно в 8) готовят серию двойных разведений препарата. Концентрация уменьшается соответственно от 128 до 0,06 мкг/мл (базовая концентрация

может варьировать в зависимости от активности препарата). Конечный объем среды в каждой пробирке составляет 1 мл. Контролем служит пробирка, содержащая чистый питательный субстрат. В каждую пробирку вносят по 0,05 мл физиологического раствора, содержащего  $10^6$ /мл микробных клеток. Пробирки инкубируют 18-10 ч при 37 °С (или до появления бактериального роста в контрольной пробирке). По истечении указанного срока результаты учитывают по изменению оптической плотности среды визуально или нефелометрически.

Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) соответствует наибольшему разведению препарата, тормозящему рост тест-культуры.

Минимальная бактерицидная концентрация (МБК) определяется внесением в контрольные пробирки по 0,01 мл среды из каждой пробирки, содержащей препарат. После инкубации в течение 18-20 часов выявляют наименьшую дозу препарата, проявляющую бактерицидный эффект. Обычно она соответствует либо превышает величины МИК.

Таблица 23.

**Наборы дисков для определения чувствительности  
некоторых возбудителей**

Бактерии	Диски
1	2
<i>Enterobacteriaceae</i> и виды <i>Acinetobacter</i>	Амикацин, ампициллин, цефазолин, цефалотоксин, цефотаксим (или цефтриаксон), гентамицин, мезлоцилин, тобрамицин, триметопримсульфаметоксазол <sup>1</sup>

1	2
Виды <i>Pseudomonas</i> и <i>Acinetobacter</i>	Амикацин, цефтазидим (или цефоперазон), гентамицин, мезлоциллин (или пиперациллин), тобрамицин, триметоприм- сульфаметоксазол <sup>1</sup>
Виды <i>Staphylococcus</i>	Ампициллин, цефалотин, клиндамицин, эритромицин, гентамицин, оксациллин, бензилпенициллин, рифамицин, триметоприм-сульфаметоксазол, ванкомицин <sup>1</sup>
Виды <i>Enterococcus</i>	Бензилпенициллин (или ампициллин), ванкомицин, стрептомицин и гентамицин (синергичность действия) <sup>1</sup>
Виды <i>Streptococcus</i>	Бензилпенициллин, цефалотин, левомецетин, эритромицин, ванкомицин <sup>1</sup>
Виды <i>Haemophilus</i>	Ампициллин, цефтриаксон (или цефотаксим), цефуроксим, левомецетин, триметоприм- сульфаметоксазол

### Дискодиффузионный метод

Бумажные диски, импрегнированные антибиотиками, укладывают на поверхность агара, засеянного строго определенной дозой исследуемого микроорганизма. Вокруг диска путем диффузии в агаре создается определенный градиент концентрации антибиотика, в связи с чем рост тест-микроорганизма ингибируется на определенном расстоянии от диска, которое зависит, помимо других факторов, и от чувствительности микроорганизма.

### Клиническое определение терминов “устойчивость”, “чувствительность”: система трех категорий

Результаты теста на определение чувствительности, которые сообщают лечащему врачу, представляют собой классификацию микроорганизма по степени чувствительности, в соответствии с которой его относят к одной из двух или более категорий. Самая простая система включает в себя лишь две категории чувствительности: чувствительность или устойчивость. Несмотря на то, что эта классификация весьма удобна для статистических и эпидемиологических целей, она недостаточно гибка для клинического использования. В связи с этим чаще всего используют классификационную систему, включающую три уровня чувствительности. Метод Керби-Бауэра и его модификации предусматривают три категории чувствительности, и, что очень важно, и клиницисты, и лабораторные работники одинаково понимают точный смысл и клиническое значение этих категорий.

• **Чувствительность.** Микроорганизм считается чувствительным к лекарственному препарату, когда вызванная им инфекция хорошо поддается лечению этим препаратом в рекомендуемых дозах.

• **Средняя чувствительность.** Этот термин характеризует две возможные ситуации. Они применимы к штаммам, проявляющим “умеренную чувствительность” к антибиотику, который мог бы использоваться для лечения заболевания, вызванного таким штаммом, в более высоких дозах, либо поскольку его токсичность низка, либо поскольку он способен накапливаться в местах концентрации возбудителя (например, в моче).

Это же определение используется для характеристики штаммов, проявляющих “умеренную чувствительность” к более токсичному антибиотику, который не может быть использован в более высоких дозах.

В этой ситуации категория “средняя устойчивость” служит буферной зоной между такими категориями, как “чувствительность” и “резистентность”. Многие лаборатории при выдаче ответа о результате исследования используют термин “средняя чувствительность”.

· **Устойчивость.** Этот термин означает, что исследуемый микроорганизм не реагирует на данный лекарственный препарат независимо от доз и локализации инфекции.

Для определения реакции стафилококков на бензилпенициллин признают лишь две категории: “чувствительность” и “устойчивость” (в соответствии с их способностью к продуцированию β-лактамазы).

Окончательное решение об использовании конкретного антибиотика и определение дозы будут зависеть не только от результатов определения чувствительности, но и от интерпретации этого результата лечащим врачом. Другие факторы, такие, как патогенетическое значение возбудителя, побочные эффекты, фармакокинетика лекарственного препарата, его проникновение в разные участки тела и иммунный статус пациента также следует принимать во внимание.

### **Показания к проведению теста на определение чувствительности**

Тест на определение чувствительности можно выполнять в клинических лабораториях с целью:

- оказать помощь лечащему врачу в выборе наилучшего антимикробного агента для каждого отдельного больного;
- собрать эпидемиологическую информацию об устойчивости к антибактериальным средствам микроорганизмов, циркулирующих в определенных регионах и представляющих определенную угрозу для общественного здравоохранения.

### **Определение чувствительности в качестве критерия для руководства при выборе схемы лечения**

Не следует определять чувствительность контаминантов или комменсалов, принадлежащих нормальной микрофлоре, или других микроорганизмов, не имеющих отношения к инфекционному процессу. Например, присутствие *Escherichia coli* в моче в количествах, не имеющих диагностического значения, не рассматривается в качестве фактора,

обусловившего инфекцию, поэтому составление антибиотикограммы не принесет пользы и даже может ввести в заблуждение.

Определение чувствительности следует проводить только с использованием чистой культуры микроорганизма, рассматриваемого в качестве этиологического агента инфекционного процесса. Этот микроорганизм должен быть идентифицирован (типирован), поскольку нет необходимости выполнять антибиотикограмму для каждого микроорганизма, выделенного от инфекционного больного.

В повседневной лабораторной практике нет надобности выполнять тесты на чувствительность в следующих ситуациях:

- Когда этиологический агент принадлежит к виду с прогнозируемой чувствительностью к определенным лекарственным препаратам. Это относится к *Streptococcus pyogenes* и *Neisseria meningitidis*, которые до сих пор чувствительны к пенициллину (однако недавно появилось несколько сообщений о спорадически обнаруживаемых пенициллино-устойчивых менингококах). Это также относится к фекальным стрептококкам (энтерококкам), которые, за очень небольшим исключением, чувствительны к ампициллину. Если на клиническом уровне появилось подозрение на наличие устойчивости среди таких микроорганизмов, следует направить несколько штаммов таких культур для исследования в компетентную справочную лабораторию.

- Если возбудитель относится к медленно растущим "привередливым" микроорганизмам и требует специальных сред обогащения (например, *Haemophilus influenzae* и *Neisseria gonorrhoeae*), дискдиффузионный метод может дать недостоверные результаты.

Появление б-лактамазопродуцирующих вариантов среди этих видов привело к внедрению специальных тестов, таких как определение продукции б-лактамазы *in vitro*. В обязанности центральной или региональной лаборатории вменяется мониторинг чувствительности пневмококков, гонококков и *Haemophilus*. Если возникают проблемы с резистентными штаммами, необходимо проявить озабоченность и предоставить инструкции для использования соответствующих методов анализа или альтернативных схем лечения.

- Если имеет место неосложненная кишечная инфекция, вызванная сальмонеллами (кроме *S. typhi* или *S. paratyphi*), исследовать чувствительность к антибиотикам нет необходимости. Лечение антибиотиками таких инфекций не оправдано даже в тех случаях, когда применяют препараты, которые проявили активность *in vitro*. В настоящее

время имеются убедительные свидетельства, что антибактериальная терапия обычных сальмонеллезных гастроэнтеритов (а также большинство диарейных заболеваний неустановленной этиологии) не приносит пользы больному. Как это ни парадоксально, антибиотики способствуют экскреции и диссеминации сальмонелл, а также могут привести к появлению резистентных штаммов.

### **Тест на определение чувствительности как инструмент эпидемиологического надзора**

Рутинное исследование чувствительности большинства патогенных микроорганизмов (*S. typhi*, шигеллы) - полезный составной элемент общих программ надзора за кишечными инфекциями. Их результаты позволяют информировать лечащих врачей о появлении антибиотикорезистентных штаммов (хлорамфениколорезистентные штаммы *S. typhi*, котримоксазолорезистентные и ампициллинорезистентные шигеллы), а также о необходимости внесения изменений в используемые схемы лечения. Несмотря на то, что результаты определения чувствительности сальмонелл (не принадлежащих к возбудителю брюшного тифа) - возбудителей кишечных инфекций не имеют практического значения для лечения больных, появление полирезистентных штаммов - сигнал для лечащих врачей о чрезвычайно широком и часто неверном использовании антимикробных препаратов.

Постоянный учет результатов рутинных исследований чувствительности является отличным источником информации о распространении резистентных стафилококков и грамотрицательных микроорганизмов, которые могут обусловить перекрестную устойчивость микроорганизмов в больнице. Периодическая информация о характере чувствительности представителей наиболее часто встречающихся штаммов - важный фактор при формировании разумной политики использования антибиотиков в стационарах путем ограничения использования или чередования использования сохраняющих жизнь препаратов, таких как аминогликозиды и цефалоспорины.

### **Выбор препаратов для рутинного исследования чувствительности в клинической лаборатории**

Выбор лекарственных препаратов для рутинного определения антибиотикограммы осуществляют с учетом спектра антимикробной

активности, фармакокинетики, токсичности, эффективности, доступности, а также стоимости как для больного, так и для общества. Среди множества антибактериальных агентов, которые могли бы использоваться для лечения больного, инфицированного одним из патогенных микроорганизмов, лишь ограниченное число скрупулезно отобранных антибиотиков следует включать в перечень препаратов для определения чувствительности.

В табл. 24 перечислены лекарственные препараты, которые могут быть использованы в различных ситуациях. Представленные препараты разделены на два набора. В набор 1 включены препараты, которые доступны для большинства клиник и в отношении которых следует выполнять рутинные тесты на исследование чувствительности каждого штамма. Исследования в отношении препаратов, включенных в набор 2, выполняют только либо по специальному запросу лечащего врача, либо если возбудитель резистентен к антибиотикам первого набора, либо по другим причинам (включая аллергию к препарату или невозможность получения препарата), которые оправдывают постановку дополнительных тестов. Многие антибиотики, весьма эффективные при клиническом применении, не нашли отражения в таблице, следует отметить, что они редко используются для лечения больных. В очень редких случаях в перечень антибактериальных агентов может быть включено 1-2 дополнительных препарата, основанием для такого включения служит либо специальный запрос лечащего врача, либо появление новых более эффективных средств. Следует периодически пересматривать списки, представленные в этой таблице, однако делать это нужно только после тщательного обсуждения вопроса с клиницистами. На практике возникает много проблем из-за того, что клиницисты не всегда понимают, что в перечень для рутинных исследований включено лишь по одному представителю каждой группы антибактериальных препаратов. Результаты, полученные в отношении включенного в перечень препарата, затем могут быть экстраполированы на все или большинство других представителей этой группы.

**Основные наборы лекарственных средств для рутинного исследования чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам**

	Набор 1 Препараты первого выбора	Набор 2 Дополнительные препараты
1	2	3
Staphylococcus	Бензилпенициллин Оксациллин Эритромицин Тетрациклин Хлорамфеникол	Гентамицин Амикацин Ко-тримоксазол Клиндамицин
Enterobacteriaceae: - кишечник	Ампициллин Хлорамфеникол Ко-тримоксазол Налидиксовая кислота Тетрациклин	Норфлоксацин
- моча	Сульфонамид Триметоприм Ко-тримоксазол Ампициллин Нитрофурантоин Налидиксовая кислота Тетрациклин	Норфлоксацин Хлорамфеникол Гентамицин
- кровь и ткани	Ампициллин Хлорамфеникол Ко-тримоксазол Налидиксовая кислота Тетрациклин Цефалотин Гентамицин	Цефуроксим Цефтриаксон Ципрофлоксацин Пиперациллин Амикацин
1	2	3

1	2	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Пиперациллин Гентамицин Тобрамицин	Амикацин

1. Диск бензилпенициллина используют для определения чувствительности ко всем  $\beta$ -лактамазочувствительным пенициллинам (таким, как оральный феноксиметилпенициллин и фенетициллин). Выделенные стафилококки, которые относят к категории резистентных за счет продукции  $\beta$ -лактамазы, требуют применения  $\beta$ -лактамазорезистентных пеницилинов или других препаратов, например эритромицина.

2. Диск с оксациллином. Оксациллин является представителем целой группы  $\beta$ -лактамазорезистентных пеницилинов (включая метициллин, нафциллин, хлоксациллин, дихлоксацин и флухлоксацин). Более того, имеются убедительные клинические данные, подтверждающие наличие перекрестной устойчивости между группами метициллина и цефалоспорины. Поэтому включать цефалотин в список препаратов, к которым предстоит определить чувствительность стафилококков, бесполезно, это может только ввести в заблуждение. Часто микроорганизмы проявляют к метициллину и сходным препаратам устойчивость гетерогенного типа, т.е. большинство клеток проявляют абсолютную чувствительность и образуют широкие зоны задержки роста, в то же время резистентная часть популяции формирует мелкие дискретные колонии, растущие внутри зоны задержки роста. Этот тип резистентности более наглядно проявляется при температуре инкубации не более 35 °C или при более длительной инкубации.

Серьезным недостатком метициллина в качестве наполнителя диска для группы  $\beta$ -лактамазорезистентных пеницилинов является его высокая лабильность даже при оптимальных условиях хранения. Диск с оксациллином более устойчив и поэтому предпочтителен для выполнения стандартизованного теста по дискодиффузионному методу. Диски с локсациллином и дилоксациллином не используются, поскольку с их помощью не всегда удается выявить присутствие гетерорезистентных штаммов.

3. Результаты, полученные при использовании диска с *тетрациклином*, могут быть экстраполированы на хлортетрациклин, окситетрациклин и других представителей этой группы. Между тем большинство тетрациклиноустойчивых стафилококков остаются чувствительными к миноциклину. В связи с этим использование диска с миноциклином может быть полезным для изучения устойчивости полирезистентных штаммов стафилококков.

4. Результаты с диском с *хлорамфениколом* могут быть экстраполированы на триамфеникол и на аналогичные препараты со сходным спектром антимикробной активности без учета известного риска апластической анемии.

5. Из числа сульфаниламидов лишь один представитель (сульфафуразол) подходит для выполнения теста на определение чувствительности.

6. Диск с *ко-тримоксазолом* содержит комбинацию триметоприма и сульфаниламида (сульфафуразола). Хотя использование дисков, содержащих комбинацию препаратов, было признано нежелательным в предыдущих докладах ВОЗ, ко-тримоксазол является исключением, поскольку эта композиция двух синергистов обладает известными фармакокинетическими свойствами и обычно действует "как единый препарат".

7. *Ампициллин* является прототипом группы пенициллинов широкого спектра действия, активных в отношении множества грамотрицательных бактерий. Поскольку они чувствительны к  $\beta$ -лактамазе, их не следует использовать для определения устойчивости стафилококков. Обычно чувствительность к ампициллину проявляется и в отношении других представителей этой группы: амоксициллина, пивапициллина, талампициллина и др. (хотя амоксициллин вдвое активнее в отношении сальмонелл, он также вдвое пассивнее в отношении шигелл и *H. influenzae*).

8. *Цефалотин*. Для рутинных исследований подходит только цефалотин, поскольку спектр его антимикробной активности аналогичен спектру активности всех остальных цефалоспоринов первого поколения (цефалексин, цефрадин, цефалоридин, цефазолин, цефапирин). Если имеется возможность использовать цефалоспорины второго и третьего поколений, а также соответствующие прописи (цефамизины) с расширенным спектром антимикробной активности, в отдельных случаях оправдано применение отдельного диска с некоторыми из этих новых препаратов (цефокситин, цефамандол, цефуроксим, цефотаксим, цифриаксон). Несмотря на то, что некоторые цефалоспорины можно

использовать для лечения тяжелых стафилококковых инфекций, чувствительность культур, послуживших возбудителем инфекции, можно определить по результатам тестов с оксациллином, как описано выше в п.2.

9. *Эритромицин* используется для исследования чувствительности к некоторым другим представителям группы макролидов (олеандомицин, спирамицин).

10. *Аминогликозиды*. Эта группа химически сходных препаратов включает стрептомицин, гентамицин, канамицин, нетилмицин и тобрамицин. Спектры их антимикробной активности не всегда оказываются достаточно близкими, чтобы гарантировать отсутствие перекрестно-устойчивых микроорганизмов, однако в отношении тестируемых микроорганизмов все эти препараты проявили равную эффективность. Многочисленные исследования, посвященные сравнительной оценке нефротоксичности и ототоксичности гентамицина, нетилмицина и тобрамицина, не позволили сделать окончательного заключения о меньшей токсичности какого-либо препарата по сравнению с другими. Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория самостоятельно отобрала один из препаратов для первичного определения чувствительности. Другие препараты следует держать в запасе для лечения инфекционных больных с резистентной микрофлорой.

11. *Нитрофурантоин* используют только для лечения инфекций мочевыводящего тракта; не следует проверять чувствительность к нему микроорганизмов, выделенных откуда-либо, кроме мочевыводящей системы.

### Усовершенствованный метод Керби-Бауэра

Оригинальный дискодиффузионный метод, описанный в 1966 г., хорошо стандартизирован и широко используется для количественной оценки. Официальные агентства рекомендовали его (с незначительными модификациями) в качестве справочного теста, которым следует пользоваться при рутинной работе в клинической лаборатории.

### Реагенты

#### Агар Мюллера-Хинтона

1. Агар Мюллера-Хинтона следует готовить из дегидратированной основы в соответствии с рекомендациями изготовителя. Среда должна

быть такого качества, чтобы размеры контрольных зон соответствовали пределам, указанным в табл. 4. Очень важно при приготовлении не перегреть среду.

2. Среду остужают до 45-50 °С и разливают по чашкам таким образом, чтобы толщина агарового слоя составляла приблизительно 4 мм. Для чашки Петри диаметром 9 см требуется примерно 25 мл среды.

3. После того, как агар застынет, чашки, которые предполагается использовать немедленно, подсушивают в горизонтальном положении с закрытыми крышками в термостате при 35 °С.

4. Чашки, которые не предполагается использовать сразу же, хранят в пластиковом пакете, который следует заклеить и поместить в холодильник. Таким образом, чашки могут храниться в течение 2 недель. Чтобы гарантировать достаточную надежность метода измерения размеров зоны задержки роста при исследовании чувствительности к сульфаниламиду и ко-тримоксазолу, агар Мюллера-Хинтона должен содержать пониженные концентрации ингибиторов тимидина и тимина. Поэтому каждую новую партию агара Мюллера-Хинтона следует проверять с использованием контрольного штамма *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212 или 33186) и диска с ко-тримоксазолом. Партии удовлетворительного качества дают отчетливую зону задержки роста диаметром 20 мм или более, которая совершенно свободна от какого-либо неясного бактериального роста или отдельных колоний.

Таблица 25.

**Предельные размеры зон задержки роста для контрольных штаммов**

Антибиотик	Диаметр зоны задержки роста (мм)			
	концентрация антимикробного агента в пересчете на один диск	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i> (ATCC 27853)
Амикалин	30 мкг	20-26	19-26	18-26
Ампициллин	10 мкг	27-35	16-22	-

Бензилпеницил лин	10 МЕД	26-37	-	-
Цефалотин	30 мкг	29-37	17-22	-
Цефтриаксон	30 мкг	22-28	29-35	17-23
Цефуросим	30 мкг	27-35	20-26	-
Хлорамфеникол	30 мкг	19-26	21-27	-
Ципрофлоксин	100 мкг	22-30	30-40	25-33
Клиндамицин	2 мкг	24-30	-	-
Ко-тримоксазол	25 мкг	24-32	24-32	-
Эритромицин	15 мкг	22-30	8-14	-
Гентамицин	10 мкг	19-27	19-26	16-21
Налидиксовая кислота	30 мкг	-	22-28	-
Нитрофурантон н	300 мкг	18-22	20-25	-
Норфлоксацин	10 мкг	17-28	28-35	22-29
Оксациллин	1 мкг	18-24	-	-
Пиперациллин	100 мкг	-	24-30	25-33
Сульфонамид (сульфафуразол )	300 мкг	24-34	18-26	-
Тетрациклин	30 мкг	19-28	18-25	-
Тобрамицин	10 мкг	19-29	18-26	19-25
Триметоприм	5 мкг	19-26	21-28	-

### **Диски с антибиотиками**

Можно использовать любые производимые промышленностью диски необходимого диаметра и соответствующей концентрации. Запас *дисков с антибиотиками* предпочтительно хранить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ ; для хранения вполне подходит морозильное отделение домашнего холодильника. Небольшой запас используемых в работе дисков может храниться в холодильнике не более 1 мес. После извлечения из холодильника контейнер с антибиотиками должен находиться при комнатной температуре в течение 1 ч, чтобы сравнялась температура. Такая процедура снижает объем конденсата, который образуется при контакте теплого воздуха с холодным контейнером. Если используется автоматический прибор для аппликации дисков, он должен быть снабжен плотно закрывающейся крышкой и храниться в холодильнике. Перед тем как открыть крышку, его также следует согреть при комнатной температуре.

### **Раствор стандартной мутности**

*Раствор стандартной мутности* готовят следующим образом: в градуированный цилиндр емкостью 100 мл вносят 0,6 мл 1% (10 г/л) раствора хлорида бария дигидрата, доводят объем до 100 мл 1% раствором (10 мл/л) серной кислоты. Раствор стандартной мутности следует разлить в пробирки, идентичные тем, которые будут использоваться для образцов бульонной культуры. Их хранят не более 6 мес. в темноте при комнатной температуре плотно закупоренными, чтобы предохранить от испарения.

### **Тампоны**

Следует приготовить запас ватных тампонов на деревянных палочках-аппликаторах. Их можно стерилизовать в банках, бактериологических пробирках или на бумаге путем автоклавирования или сухим горячим воздухом.

## **Методика**

Для посева культуры, которую берут с первичных чашек, прикасаются стерильной бактериологической петлей к верхней части 3-5 однотипных колоний микроорганизма, который предполагают исследовать.

Переносят этот материал в стерильный физиологический раствор.

Если нужно произвести посев чистой культуры, берут полную бактериологическую петлю сливного роста и аналогичным образом суспензируют в стерильном физиологическом растворе.

Сравнивают мутность раствора исследуемой культуры со стандартом мутности и приводят мутность исследуемого раствора в соответствие со стандартом путем добавления либо бактериальной массы, либо физиологического раствора.

Приготовление микробной взвеси требуемой мутности является необходимым условием, обеспечивающим наличие сливного или почти сливного роста.

Посев материала на чашку производят следующим образом. Стерильный тампон помещают в пробирку с посевным материалом. Излишнюю жидкость с тампона убирают путем покручивания тампона, прижатого к стенкам пробирки над уровнем жидкости в разные стороны.

Посев культуры на чашку производят штрихообразным движением по всей поверхности агара трижды, каждый раз после аппликации поворачивая чашку вокруг своей оси на 60°. В заключение делают несколько вращательных движений тампоном по краям агаровой поверхности. После этого посевам дают возможность подсохнуть в течение нескольких минут при комнатной температуре в чашках с закрытыми крышками.

Диски с антибиотиками можно наносить на засеянную чашку с помощью пары стерильных пинцетов. Целесообразно использовать графарет, чтобы расположить диски на чашке единообразно.

Конец стерильной иглы также может быть использован для нанесения дисков с антибиотиками на засеянную чашку.

Можно также использовать специальный автоматический прибор для нанесения дисков на засеянную чашку.

На чашку Петри размером 9-10 см в диаметре можно нанести не более 7 дисков. Шесть дисков можно уложить по окружности не ближе 15 мм к краю агара, а один - в центр. Каждый диск следует аккуратно прижать, чтобы обеспечить его контакт с питательной средой.

Чашки с посевами в течение 30 мин после завершения укладывания дисков следует поместить в термостат, где поддерживается температура 35 °С. Если температура превышает 35 °С, это может привести к искажению результатов в отношении оксациллина/метициллина.

Ни в коем случае не следует инкубировать посевы в атмосфере углекислого газа.

После суточной инкубации следует измерить диаметр каждой зоны роста (включая диаметр диска) и записать их размер в миллиметрах. Интерпретацию полученных результатов проводят в соответствии с

предельными размерами диаметров, показанных в табл. 5.

Измерения делают с помощью линейки с обратной стороны поверхности чашки, не открывая крышку.

Если среда непрозрачная, зону можно измерить с помощью штангенциркуля.

Трафарет может быть использован для окончательного учета результатов теста на определение чувствительности.

О размере зоны задержки роста судят при просмотре посевов невооруженным глазом, и ее диаметр определяют от того места, где имеется начало микробного роста. Однако в трех случаях делают исключение:

- В тестах с сульфаниламидами и ко-тримоксазолом появляется скудный рост внутри зоны задержки: такой рост не следует принимать во внимание.

- Когда исследуют б-лактамазопродуцирующие стафилококки в отношении их чувствительности к пенициллину, зоны задержки роста характеризуются конгломератами с четким краем, которые легко выявляются при сравнении с чувствительным контролем, независимо от размера зоны задержки роста, результаты следует оценивать как устойчивость.

- Некоторые виды протеев могут прорасти внутрь зон задержки роста, образующихся вокруг некоторых антибиотиков, однако зона задержки роста обычно четко очерчена, а тонкими пластами ползучего роста следует пренебречь.

### **Интерпретация размеров зоны**

- *Использование трафарета.* Когда размер зоны сравнивают с трафаретом, оценку результатов по степени чувствительности можно провести немедленно: "чувствительность" - когда края зоны задержки роста выходят за черный круг; "устойчивость" - когда нет зоны задержки роста или она располагается внутри белого круга; "средняя чувствительность" - когда окружность зоны задержки роста лежит внутри черного круга.

- *Использование линейки.* Когда зону задержки роста измеряют линейкой в миллиметрах, результаты следует интерпретировать в соответствии с предельными размерами диаметров, представленными в табл. 5.

Таблица 26.

Таблица интерпретации размеров зон задержки роста

Антибиотик или химиотерапевтический агент	Диаметр зоны задержки (мм)			
	содержание вещества в диске	устойчивость	средняя/умеренная чувствительность	чувствительность
1	2	3	4	5
Амикацин	30 мкг	≤ 14	15-16	≥ 17
Ампициллин при определении:				
- Enterobacteriaceae	10 мкг	≤ 13	14-16	≥ 17
- Enterococcus faecalis	10 мкг	≤ 16	-	≥ 17
Бензилпенициллин при определении стафилококков	10 МЕД	≤ 28	-	≥ 29
Цефтриаксон	30 мкг	≤ 13	14-20	≥ 21
Цефуроксим калия	30 мкг	≤ 14	15-17	≥ 18
Цефалотин	30 мкг	≤ 14	15-17	≥ 18
Хлорамфеникол	30 мкг	≤ 12	13-17	≥ 18
Клиндамицин	2 мкг	≤ 14	15-20	≥ 21
Ко-тримоксазол	25 мкг	≤ 10	11-15	≥ 16
1	2	3	4	5
Эритромицин	15 мкг	≤ 13	14-22	≥ 23
Гентамицин	10 мкг	≤ 12	13-14	≥ 15
Налидиксовая кислота	30 мкг	≤ 13	14-18	≥ 19
Нитрофурантоин	300 мкг	≤ 14	15-16	≥ 17
Оксациллин при определении:				
- стафилококков	1 мкг	≤ 10	11-12	≥ 13
- пневмококков	1 мкг	≤ 19	-	≥ 20
Пиперациллин при определении:				
- Enterobacteriaceae	100 мкг	≤ 17	18-20	≥ 21
- Pseudomonas	100 мкг	≤ 14	15-17	≥ 18
Сульфаниламиды	300 мкг	≤ 12	13-16	≥ 19
Тетрациклин	30 мкг	≤ 14	15-18	≥ 19
Тобрамицин	10 мкг	≤ 12	13-14	≥ 15
Триметоприм	5 мкг	≤ 10	11-15	≥ 16

## Технические факторы, оказывающие влияние на размер зоны задержки роста при использовании дискодиффузионного метода

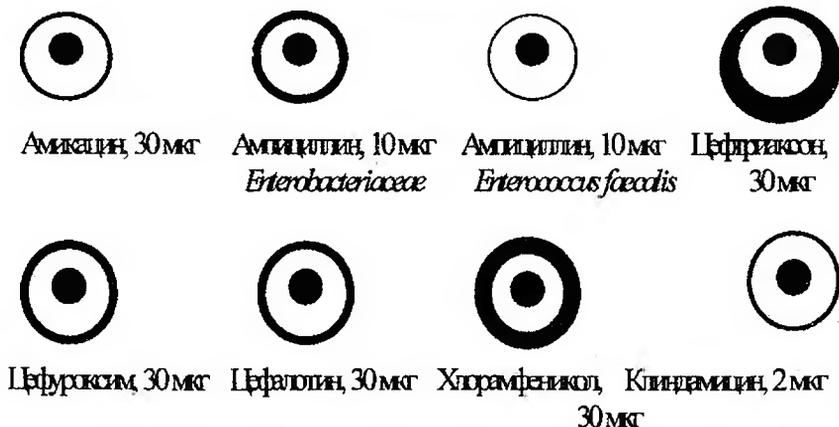
### Концентрация посевной дозы

Если посев слишком скудный, зона задержки роста будет больше, хотя чувствительность микроорганизма неизменна. Относительно устойчивый штамм в этом случае может быть учтен как чувствительный. Наоборот, если посев слишком плотный, размер зоны задержки роста будет уменьшен и чувствительный штамм может быть учтен как устойчивый. Обычно оптимальные результаты получают, когда величина посевной дозы обеспечивает почти сливной рост.

### Продолжительность аппликации дисков

В том случае, когда чашки, засеянные штаммом, в отношении которого проводится тестирование, оставляют при комнатной температуре на срок, превышающий установленное стандартом время, размножение посеянного микроорганизма может начаться еще до аппликации диска с антибиотиком. Это приводит к уменьшению диаметра зоны задержки роста, вследствие чего при учете результатов чувствительный штамм будет учтен как устойчивый.

Рис. 1. Диаметры зон задержки роста для определения антимикробной чувствительности при использовании стандартного дискодиффузионного метода





Ко-тримоксазол,  
25 мкг



Эритромицин,  
15 мкг



Гентамицин,  
10 мкг



Налидиксовая кислота  
30 мкг



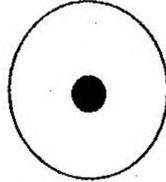
Нитрофурантоин,  
300 мкг



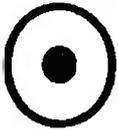
Оксациллин, 1 мкг  
Пневмококки



Оксациллин, 1 мкг  
Стафилококки



Бензилпенициллин,  
10 МЕД



Пиперациллин, 100 мкг  
*Enterobacteriaceae*



Пиперациллин, 100 мкг  
*Pseudomonas*



Сульфонамиды,  
300 мкг



Тетрациклин,  
30 мкг



Тобрамицин, 10 мкг



Триметоприм, 5 мкг

Диск с антибиотиком

Внутренняя зона:  
устойчивый штамм

Средняя зона:

чувствительность

Внешняя зона:

чувствительный штамм

### **Температура инкубации**

При выполнении теста на определение чувствительности инкубацию обычно проводят при температуре 35 °С, которая является оптимальной для роста.

При более низкой температуре необходимо больше времени для эффективного роста культуры, в результате чего зона задержки роста будет больше. Когда исследованию в отношении метициллина (оксациллина) подвергают обладающий гетерогенной устойчивостью штамм *Staphylococcus aureus*, резистентная часть популяции может быть выявлена при температуре 35 °С. При более высоких температурах вся популяция дает рост, который интерпретируют как чувствительность. При температурах 35 °С и ниже устойчивые колонии вырастают внутри зоны задержки роста. Эти устойчивые колонии легче определить, если чашки до учета результатов оставить на несколько часов при комнатной температуре. Такие колонии обязательно следует идентифицировать, чтобы выяснить, не принадлежат ли они к контаминантам.

### **Время инкубации**

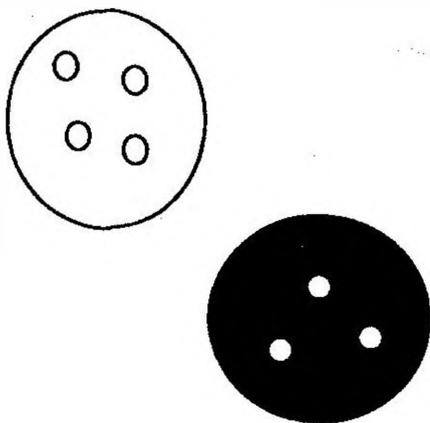
Большинство методик рекомендует время инкубации между 16 и 18 ч. При острой необходимости, однако, предварительный учет результатов может быть проведен через 6 ч. При обычной рутинной работе этого делать не рекомендуется, результаты всегда следует подтверждать после инкубации, проведенной с соблюдением необходимого времени.

### **Размер чашки, толщина агарового слоя среды и расположение дисков с антибиотиками**

Обычно определение чувствительности проводят на чашке диаметром 9-10 см, помещая 6 или 7 дисков на одну чашку. Если необходимо определить чувствительность к большему числу антибиотиков, следует использовать две чашки или одну чашку диаметром 14 см. Чрезвычайно большие зоны задержки роста могут формироваться на средах, разлитых тонким слоем; обратная зависимость справедлива для питательных сред, разлитых толстым слоем. Незначительные изменения глубины агарового слоя не оказывают существенного влияния.

Правильное расположение дисков является необходимым условием и позволяет избежать частичного совпадения зон задержки роста разных дисков или деформации зон у края чашки (рис. 2).

**Рис. Трафарет для равномерного укладывания дисков с антибиотиками по чашкам диаметром 90 мм**



#### **Содержание активных веществ в дисках**

Диаметр зоны задержки роста зависит от количества лекарственного препарата в диске. Если во время хранения дисков произошло снижение содержания препарата в результате активного вещества, размер зоны задержки роста будет соответственно меньше.

#### **Состав питательной среды**

Питательная среда оказывает влияние на размер зоны за счет своих ростовых свойств в отношении конкретных видов микроорганизмов, уровня диффузии антибиотиков и активности ингредиентов. Использование соответствующей питательной среды для определенного метода является необходимым составным элементом исследования.

Множество факторов, влияющих на размер зоны задержки роста, которые способны привести к получению разных результатов в отношении одного и того же микроорганизма, наглядно демонстрируют необходимость стандартизации дискодиффузионного метода. Лишь при соблюдении основополагающих принципов и точном выполнении требований методики могут быть получены достоверные результаты. Произвольное изменение любого из факторов, имеющих значение для определения чувствительности, может привести к сообщению клиницистам искаженных необъективных результатов исследования.

За точным и аккуратным соблюдением методики работы следует установить постоянный надзор путем реализации программы контроля качества, описанной ниже. Любые выявленные отклонения должны быть немедленно исследованы, и предприняты неотложные меры для исправления положения и устранения ошибок.

### **Контроль качества**

#### **Необходимость контроля качества при постановке тестов на определение чувствительности**

Окончательный результат определения чувствительности дискодиффузионным методом зависит от множества факторов. Некоторые факторы, такие, как посевная доза и температура инкубации, легко контролировать, однако работники лабораторий редко знают точный состав производимых промышленностью питательных сред или отличия качества разных партий препаратов, кроме того, невозможно проконтролировать содержание антимикробного агента в диске. В связи с этим результаты теста на определение чувствительности должны быть объектом постоянного мониторинга, являющегося элементом программы контроля качества; непосредственно программа контроля качества может рассматриваться как самостоятельный раздел работы.

Точность и аккуратность выполнения теста на определение чувствительности контролируется путем параллельного использования штаммов с известной чувствительностью к антимикробным агентам, которые исследуют точно по такой же методике, что и целевые микроорганизмы, чувствительность которых определяют. Размеры зон задержки роста, выявленных в тестах с контрольными микроорганизмами, должны полностью совпадать с предельными размерами диаметров, представленными в табл. 4. Если результаты регулярно не совпадают с этими параметрами, их следует рассматривать как свидетельство того, что при выполнении определения чувствительности допущена техническая ошибка или что использовавшиеся реагенты оказались неудовлетворительного качества. Каждый реагент и каждый этап теста на определение чувствительности следует подвергнуть исследованию с тем, чтобы установить причину допущенной ошибки и устранить ее.

#### **Стандартная методика контроля качества**

В программах контроля качества при определении чувствительности к

антибиотикам следует использовать референс-штаммы тех же видов бактерий, которые изучают параллельно в тестах с "клиническими" культурами. Эту процедуру целесообразно осуществлять еженедельно или при использовании каждой пятой упаковки для тестов и дополнительно каждый раз, когда открывают новую упаковку агара Мюллера-Хинтона или новую упаковку дисков.

### **Стандартные штаммы для контроля качества**

*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

*Escherichia coli* (ATCC 25922)

*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

Культуры могут быть получены из института национальных хранилищ живых культур. Они доступны на коммерческой основе в форме флаконов или ампул высушенной чистой культуры.

Культуры для каждодневного пользования следует выращивать на скошенном питательном агаре (для этих целей подходит триптиказо-соевый агар) и хранить в холодильнике. Пересевы культур на свежий скошенный агар следует осуществлять каждые 2 недели.

### **Посев материала**

Культуры можно сеять в бульоны любых типов и инкубировать до тех пор, пока в бульоне не появится микробный рост (помутнение). Каждый бульон пересевают штрихом на чашку с агаром и инкубируют в течение суток. Затем следует отобрать единичные колонии и направить их для определения чувствительности по методике, описанной в данной главе в разделе "Методика".

### **Расположение дисков с антимикробными агентами**

После посева культуры на чашку с агаром на нее укладывают соответствующие диски, как это описано в данной главе в разделе "Методика". Диски, которые следует подобрать для каждого контрольного штамма, перечислены в табл. 4.

### **Учет результатов**

После инкубирования посевов в течение 16-18 ч следует линейкой измерить диаметры зон задержки роста, результаты измерений и дату проведения анализа заносят в специальную карточку контроля качества. В такой карточке фиксируют информацию по каждой комбинации диск-штамм. Карточка представляет собой график, на котором по оси ординат в масштабе фиксируют размер (диаметр) зоны задержки роста, по оси абсцисс - дату проведения анализа.