

**О.М. Бєсєдін,
Л.М. Сторубель,
О.В. Євтушенко,
К.О. Бєсєдіна**

ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ МІКРОБІОЛОГІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ РАНЕВОГО ПРОЦЕСУ У ХВОРИХ З ХІРУРГІЧНОЮ ІНФЕКЦІЄЮ М'ЯКИХ ТКАНИН

Комунальне некомерційне підприємство «Міська клінічна лікарня № 4» ДМР
вул. Ближня, 31, Дніпро, Україна
Municipal non-profit enterprise «City Clinical Hospital N 4» DCC
st.Bliznaya, 31, Dnipro, Ukraine
e-mail: bam-86@ukr.net

Цитування: *Медичні перспективи*. 2020. Т. 25, № 1. С. 122-127

Cited: *Medicni perspektivi*. 2020;25(1):122-127-

Ключові слова: мікрофлора, антибіотикорезистентність, біоптати ран
Ключевые слова: микрофлора, антибиотикорезистентность, биоптаты ран
Key words: microflora, antibioticresistance, biopsy samples of wounds

Реферат. Повышение эффективности микробиологической диагностики у пациентов с хирургической инфекцией мягких тканей. Бєсєдін А.М., Сторубель Л.Н., Євтушенко О.В., Бєсєдіна К.А. В течение последнего времени наблюдается неуклонная тенденция к росту резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, что на фоне отсутствия разработки новых антибиотиков, их бесконтрольного назначения, тотального применения их в животноводстве и т.д. приводит к летальным исходам, неудовлетворительным результатам лечения, удорожанию лечения, формированию госпитальных панрезистентных штаммов. Возрастающая способность микроорганизмов кооперироваться в биопленки, выработка и совершенствование механизмов резистентности в симбиозе являются трудноразрешимыми вопросами лечения пациентов с хирургической инфекцией мягких тканей. У пациентов с хирургической инфекцией мягких тканей хирургическая обработка гнойного очага и антибактериальная терапия являются основополагающими доктринальными и определяющими успех лечения направлениями. Выбор антибактериального препарата в большинстве случаев основывается на результатах антибиотикограммы. Проведено исследование ран методом мазка и биоптатов тканей раны у 81 пациента. Оценен количественный и качественный состав микрофлоры ран пациентов при исследовании биоптата и стандартного посева с поверхности раны. При исследовании биоптата выделено 86 штаммов, а в материале с поверхности раны – 110. На поверхности раны отсутствует рост в 11 случаях (13,5%), против 20 (почти 25%) в биоптатах. Один вид флоры выделено из 37 раневых поверхностей (около 46%), биоптатов ран с монокультурой – 61 образец (75%). Ассоциации (два и более) имеются в 33 (41%) раневых образцах и только в 21 биоптате (26%). Таким образом, проведенные исследования подтверждают тот факт, что поверхность раны в большей степени является контаминированной посторонней микрофлорой, чем биоптат. Полученные данные позволяют рекомендовать метод биоптатов ран вместо мазка как более специфичный и чувствительный у пациентов с хирургической инфекцией мягких тканей.

Abstract. Improving effectiveness of microbiological diagnostics in patients with surgical infection of soft tissues.

Biesiedin O.M., Storubel L.N., Yevtushenko E.V., Biesiedina K.O. Recently, there has been a steady tendency towards increase in the resistance of microorganisms to antibacterial drugs, which is due to the lack of development of new antibiotics, their uncontrolled administration, total use in animal husbandry, etc. leads to fatal outcomes, unsatisfactory results of treatment, rise in cost of treatment, formation of hospital pan-resistant strains. The increasing ability of microorganisms to cooperate in biofilms, production and improvement of resistance mechanisms in symbiosis are intractable issues in the treatment of patients with surgical infection of soft tissues. In patients with surgical infection of soft tissues, surgical treatment of a purulent focus and antibiotic therapy are fundamental doctrinal, determining the success of treatment. The choice of an antibacterial drug in most cases is based on the results of an antibioticogram. A study of wounds by smear technique and biopsy samples of wound tissues in 81 patients was performed. The quantitative and qualitative composition of wound microflora of patients was evaluated during the study of biopsy samples and standard culture from the wound surface. When examining the biopsy samples, 86 strains were isolated, and 110 – in the material from the wound surface. There was no growth on the wound surface in 11 cases (13.5%), against 20 (almost 25%) in biopsy samples. One species of flora was isolated from 37 wound surfaces (about 46%), biopsy samples of wounds with monoculture – in 61 samples (75%). Associations (two or more) are present in 33 (41%) wound samples, and only in 21 biopsy samples (26%). Thus, the conducted studies confirm the fact

that wound surface is more contaminated by foreign microflora than biopsy samples. The data obtained allow us to recommend the method of wound biptates instead of a smear, as more specific and sensitive in patients with surgical infection of soft tissues.

У всьому світі резистентність до проти-мікробних препаратів (РПП) спричиняє 700 тис. смертей щороку. Але прогноз набагато серйозніший: експерти ВООЗ вважають, що якщо РПП продовжить поширюватися, до 2050 р. кількість випадків смерті від антибіотикорезистентності патогенів може досягти 10 млн осіб на рік [9, 10].

Аналогічна тенденція спостерігається і в Україні. Так, Всеукраїнська асоціація інфекційного контролю та антибіотикорезистентності проаналізувала дані (2013-2017 рр.) лабораторій 24 обласних лікарень України. Результати дослідження показали, що кількість штамів мікроорганізмів, стійких до одного антибіотика, становить 70,7%, до антибіотиків 2-3 класів становить 37,5%, до 4 або більше становить 26,3% [5].

Невпинне зростання стійкості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів призводить не тільки до летальних випадків та безпорадності лікарів, але і негативно впливає на терміни лікування хворих і збільшує вартість терапії [8]. Тому проведення лабораторних досліджень з метою визначення чутливості мікроорганізмів набуває все більшого значення.

Метою є покращення результатів лікування хірургічної інфекції м'яких тканин у хворих відділення гнійно-септичної хірургії шляхом упровадження методики дослідження біоптатів ран для проведення топічної персоналізованої антибактеріальної терапії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

За ступенем мікробної контамінації хірургічної рани поділяються на чотири класи: «чисті», «умовно-чисті», «контаміновані», «брудні або інфіковані». До останніх належать старі травматичні рани, в яких є нежиттєздатні тканини, та рани з наявністю ознак вираженої клінічної форми гнійно-запальної інфекції або з перфорацією внутрішніх органів [7].

У 2019 р. лабораторією Комунального закладу «Міська клінічна лікарня № 4» Дніпровської міської ради м. Дніпро за сприяння корпорації «Артеріум» проведено бактеріологічні дослідження ран пацієнтів з хірургічною інфекцією м'яких тканин, які знаходились у відділенні гнійно-септичної хірургії.

У рекомендаціях ВООЗ «Основні методи лабораторних досліджень у клінічній бактеріології», крім дослідження гнійного ексудату, пунктату абсцесів тощо, рекомендовано дослідження маленьких шматочків тканин.

Методика кількісного дослідження біоптату описана в багатьох літературних джерелах: L. Brentano (1965), С.Р.Вахтер зі співавт. (1974) у модифікації лабораторії мікробіології і імунології Інституту хірургії ім. А.В.Вишневського (Колхер І.І. зі співавт., 1980). В умовах нашої клініки для проведення дослідження було використано методику, викладену в монографії «Теорія і практика місцевого лікування гнійних ран» під ред. проф. Б.М.Даценко. Дослідження включали паралельний посів біоптату тканини за авторською методикою і традиційний посів матеріалу з поверхні рани [4]. В аналіз включено по 81 зразку біоптатів і матеріалу, відібраного з рани на тампон.

Дослідження біоптатів включає зважування та гомогенізацію зразків, серійні розведення матеріалу, висів суспензії з різних розведень на декілька поживних середовищ, подальший підрахунок, ідентифікацію колоній та визначення антибіотикограми вірогідного збудника.

Отриманий матеріал поміщають у стерильну ємність і безпосередньо після відбору доправляють із супровідними документами (направлення на мікробіологічне (бактеріологічне, вірусологічне, паразитологічне) дослідження форма 204/О) до лабораторії.

У лабораторії біоптат, не виймаючи зі стандартної (з наперед відомою масою) ємності, в умовах боксу зважують на електронних вагах 4 класу точності. Масу біоптату реєструють і вираховують коефіцієнт перерахунку на 1 г тканини – К. Наприклад: доставлено біоптат масою 0,2 г; $K=1 \text{ г} : 0,2 \text{ г}=5$.

Далі зважений біоптат суспендують в ізотонічному розчині натрію хлориду з розрахунку 1:10, виконуючи ряд десятикратних розведень до 10^{-8} ступені. Проводять посів по 0,1 мл суспензії на поверхню твердого поживного середовища, розлитого в чашки Петрі із розведень 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} .

Для отримання росту ізолюваних колоній матеріал ретельно розтирають шпателем по поживному середовищу, в якості якого використовують кров'яний агар. Посіви інкубують у термостаті при 37° 18-24 год. У разі відсутності росту термін інкубації продовжують до 3 діб. З метою прискорення дослідження якісного складу мікроорганізмів та покращення діагностики проводять посів петлею на селективні диференційно-діагностичні поживні середовища: Ендо,

Чистовича й ін. Посіви інкубують у термостаті при температурі 37⁰С 18-24 год. Чашки переглядають, реєструють результати. На середовищі Чистовича термостатування в разі відсутності росту мікроорганізмів роду *Staphylococcus* продовжують до 48 год.

Підраховують колонії, які вирости на чашці, і проводять перерахунок на 1 г тканини. Для підрахунку використовують те розведення, де колонії на чашці ростуть ізольовано і їх кількість не перевищує 300.

Кількість мікроорганізмів в 1 г тканини вираховують за формулою:

$$N = n \times 10 \times \text{ступінь розведення} \times K, \text{ де}$$

N – кількість мікроорганізмів на 1 г тканини біоптату;

n – кількість мікроорганізмів, які вирости на чашці;

10 – перерахунок на 1 г суспензії;

K – коефіцієнт перерахунку навіски на 1 г біоптату.

Бактеріологічні дослідження та ідентифікація виділених культур виконувались відповідно до вітчизняних та міжнародних стандартів [2, 3].

Статистичну обробку виконано із застосуванням загальноприйнятих методів [1].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні біоптатів патогени, які мають етіологічне значення в розвитку гнійної ранової інфекції, виявлено в 61 зразку (75,3%) із 81. У 20 випадках, що становить лише четверту частину доставленого на дослідження матеріалу, ріст мікрофлори був відсутній.

Із колонізованих мікрофлорою біоптатів один вид мікроорганізмів виділено в 40 зразках із 61 (65,6%). Асоціації (дві і більше) наявні в третині позитивних зразків – 21 (34,4%). Загальна кількість виділених мікроорганізмів становить 86 штамів.

Структура виділених мікроорганізмів, виділених при дослідженні біоптатів ран

Мікроорганізми	Гр+ флора							Гр- флора						
	<i>S.aureus</i>	<i>S.haemoliticus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecium</i>	<i>S.pyogenes/</i> <i>S.pneumoniae</i>	<i>Corynebacterium</i> spp.	<i>P.aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>	<i>P.mirabilis</i>	<i>E.amnigenus</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P.penneri</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.
Моно-культура - 40	17	5	0	6	3	2/0	0	5	1	0	0	0	1	0
Асоціації - 46	8	5	3	10	4	0/1	2	1	4	4	2	1	0	1
Всього - 86	25	10	3	16	7	2/1	2	6	5	4	2	1	1	1

Спектр виділених мікроорганізмів за таксономічною належністю має таку структуру. Гр+ флора становила 77% (66 культур) від загальної кількості мікроорганізмів, виділених у біоптатах, та 82,5% (33) від проб, де штам зустрічаються в монокультурі. Представників Гр-флори значно менше – 23% (20) від кількості всіх виділених бактерій та 17,5% (7) від кількості мікробів, виділених у монокультурі.

У групі позитивних за Грамом мікроорганізмів домінують стафілококи – 55% (22), ентерококів – 22,5% (9), стрептококів – 5% (*S.pyogenes*) від усіх монокультур. Серед стафілококів лідером є *S.aureus* – 17 культур, у 5 випадках виділено *S.haemoliticus*. Рід *Ente-*

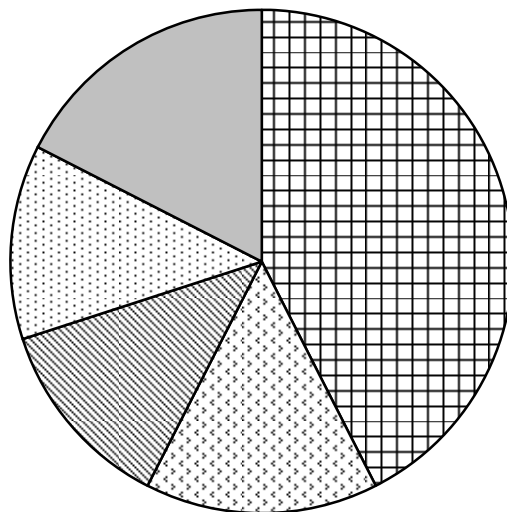
rococcus представлений двома видами: *E.faecalis* (6) та *E.faecium* (3).

Серед усіх виділених грамнегативних паличок культури за родовими та видовими ознаками ідентифіковані таким чином: рід *Pseudomonas* (*P.aeruginosa* – 6), *Escherichia* (*E.coli* – 5), *Proteus* (*P.mirabilis* – 4, *P.penneri* – 1), *Enterobacter* (*E.amnigenus* – 2), *Acinetobacter* – 1, *Klebsiella* (*K.pneumoniae* – 1). З них у монокультурі виділені лише 7 штамів: *P.aeruginosa* (5), *E.coli* (1), *P.penneri* (1).

Від усіх випадків, виявлених у біоптатах монокультур, 82,5% припадає на 4 види етіологічно значущих при гнійно-запальних процесах мікроорганізмів: *S.aureus*, *E.faecalis*,

P.aeruginosa, *S.haemoliticus* (рис.). У загальній кількості мікроорганізмів простежується аналогічна тенденція. За даними [10], серед мікроорганізмів, виділених з ран у лікувально-профілактичних закладах України в 2016-

2017 рр., переважали такі: *Staphylococcus* – 47,1% (48,8%), *E.coli* – 10,7% (10,6%), *Enterococcus* – 8,6% (8,1%), *P.aeruginosa* – 6,4% (6,5%), *K.pneumoniae* – 6,4% (6,0%), *Enterobacter* – 4,5% (4,4%), *A.baumannii* – 2,5% (3,1%) та інші – 13,8% (12,6%).



▣ *S.aureus* ▣ *E.faecalis* ▣ *P.aeruginosa* ▣ *S.haemoliticus* ▣ Інші

Основні збудники, виділені в монокультурі при дослідженні біоптатів

У біоптатах, відібраних із ран у пацієнтів нашої клініки, ріст спостерігається у 75,3%, при відборі матеріалу тампоном – у 86,5%. Для порівняння, в Україні при дослідженні матеріалу з ран культури було виділено: 2017 рік – у 41% проб, 2016 рік – 39,9% [6].

При паралельному посіві біоптатів і мазків з поверхні рани повне співпадіння результатів дослідження спостерігалось у 35 пацієнтів (43%). Більш ніж у половини результати дослідження мали суттєву різницю – 47 (57%) пацієнтів.

Так, у 23% при відсутності росту в біоптаті з тампону були виділені культури мікроорганізмів. А саме: *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *S.anginosus*, *C.albicans*, *Corynebacterium* spp., *S.simulans*, *S.galactia*, *S.epidermidis*, *P.putida*, *S.haemoliticus*. За видовим спектром ці мікроорганізми є представниками нормальної мікрофлори людини, сапрофітами та штамами, що мають ознаки госпітальних (*S.aureus*, *P.aeruginosa*).

Загалом, якщо порівнювати кількісний та видовий спектр мікроорганізмів, виділених у біоптаті і мазкові з тампону, то різниця суттєва. Так, при дослідженні біоптату виділено 86 штамів, а в матеріалі з поверхні рани – 110. На поверхні рани відсутній ріст в 11 випадках (13,5%) проти 20 (майже 25%) у біоптатах. Один

вид флори виділено з 37 ранових поверхонь (близько 46%), натомість біоптатів ран з монокультурою 61 зразок (75%). Асоціації (дві і більше) наявні в 33 (41%) ранових зразках і лише в 21 біоптаті (26%). Це свідчить про те, що при виконанні мазка з рани може висіватись сапрофітна мікрофлора, замість флори, яка викликає запалення, тобто є загроза неприцільної антибактеріальної терапії.

На основі наведених даних можна зробити висновок, що поверхня рани є в більш значній мірі контамінованою сторонньою флорою, ніж біоптат, що, враховуючи специфіку відділення гнійно-септичної хірургії, дає підстави рекомендувати цей метод для дослідження хворих із хірургічною інфекцією м'яких тканин та хронічних ран з метою виявлення збудника запального процесу та призначення етіотропного лікування з урахуванням антибіотикограми виділених культур.

Антибіотикограми основних збудників ранової інфекції, виділених із матеріалу пацієнтів відділення гнійно-септичної хірургії, мають такі особливості.

S.aureus 100% чутливі до ванкоміцину та лінезоліду. До еритроміцину, оксациліну, кліндаміцину, левофлоксацину чутливість становить

83%, 80%, 78%, 76% відповідно. Пеніцилін показав резистентність у 44% штамів.

E.faecalis продемонстрували чутливість до ампіциліну, ванкоміцину, лінезоліду в 100% випадків, натомість до ципрофлоксацину – лише в 13%.

S.haemoliticus у 100% чутливі до ванкоміцину та лінезоліду; кліндаміцину – 67%, левофлоксацину – 56%, еритроміцину, оксациліну – 44%, оксациліну – лише 11%.

Штами *P.aeruginosa* відрізнялися від інших культур полірезистентністю до антибактеріальних препаратів. Із них до іміпенему чутливими були лише 20%, амікацину, ципрофлоксацину, цефепіму, цефтазидиму – третя частина культур (33%), меропенему, цефоперазону по 50%, цефоперазон/сульбактаму – 60%. Найвищий рівень чутливості відмічався до фосфоміцину – 83%.

ВИСНОВКИ

1. Проведене дослідження демонструє кількісну і якісну різницю при дослідженні біоптатів

та мазків ранових поверхонь, що дозволяє рекомендувати дослідження біоптату рани у хворих з хірургічною інфекцією м'яких тканин.

2. Завдяки проведеним дослідженням вдалося ідентифікувати домінуючого збудника хірургічної інфекції та персоніфікувати антибактеріальну терапію.

3. Проведення топічної та персоніфікованої етіотропної антибактеріальної терапії сприяло більш швидкій елімінації збудника з рани та підготовці рани до закриття, тим самим знижувались матеріальні витрати на антибіотики та середній ліжко-день. Тобто покращились загальні результати лікування і знизилась матеріальні витрати.

4. У багатопрофільних стаціонарах повинні бути створені мультидисциплінарні групи для проведення ефективної антибактеріальної терапії у хворих з резистентними та шпитальними інфекціями.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антомонов М. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных. 2-е изд. Киев: МИЦ «Мединформ», 2018. 579 с.

2. Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів: методичні вказівки: наказ МОЗ України від 05.04.2007 р. № 167. URL: <http://mozdocs.kiev.ua/view.php?id=6958> (дата звернення: 06.11.2019).

3. Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам. Таблицы пограничных значений для интерпретации значений МПК и диаметров зон подавления роста. Версия 8.0, 2018. URL: <http://www.eucast.org> (дата звернення: 06.11.2019).

4. Інфекції, спричинені ізолятами *Pseudomonas aeruginosa* у хворих відділення гнійно-септичної хірургії / О. М. Бесєдін та ін. *Сучасні медичні технології*. 2019. Т. 41, № 2, Ч. 1. С. 56-60. DOI: [https://doi.org/10.34287/MMT.2\(41\).2019.11](https://doi.org/10.34287/MMT.2(41).2019.11)

5. Попередження та контроль протимікробної резистентності: семінар Європейської комісії. URL: <https://www.apteka.ua/article/505850> (дата звернення: 06.11.2019).

6. Про виконання наказу МОЗ України від 05.04.2007 року № 167 «Про затвердження методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» в 2017 році»,

Інформаційний бюлетень ДУ «Центр громадського здоров'я Міністерства охорони здоров'я України». 2018. 5 с.

7. Про організацію контролю та профілактики післяопераційних гнійно-запальних інфекцій, спричинених мікроорганізмами, резистентними до дії антимікробних препаратів: наказ Міністерства охорони здоров'я України від 04.04.2012 р. № 236. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0912-12/stru> (дата звернення: 09.11.2019).

8. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance. *Annual report 2018*. URL: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications/2018/-central-asian-and-eastern-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance-annual-report-2018-2018>

9. Implementation of the global action plan on antimicrobial resistance. *Newsletter WHO GAP AMR*. November, 2017. No. 32. URL: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/news/WHO-GAP-AMR-Newsletter-No-32-Nov-2017.pdf?ua=1> (Last accessed: 06.11.2019).

10. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations: The Review on Antimicrobial Resistance chaired by Jim O'Neill. 2016. May. 81 p. URL: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf

REFERENCES

1. Antomonov M. [Mathematical processing and analysis of biomedical data]. 2nd ed. Kyiv: Medinform; 2018;579. Russian.

2. [Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs] Nakaz MOZ Ukrainy.

05.04.2007 p. No. 167. Ukrainian. Available from: <http://mozdocs.kiev.ua/view.php?id=6958>

3. [The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control as recommended by EUCAST. Version 8.0, 2018]. Russian. Available from: <http://www.eucast.org>

4. Biesiedin OM, Kosulnykov SO, Storubel LM, et al. [Infections caused by isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with septic surgery]. *Suchasni medychni tekhnolohii*. 2019;2(41 Pt 1):56-60. Ukrainian. doi [https://doi.org/10.34287/MMT.2\(41\).2019.11](https://doi.org/10.34287/MMT.2(41).2019.11)

5. [Antimicrobial resistance prevention and control: The European Commission has conducted a workshop]. Ukrainian. Available from: <https://www.apteka.ua/article/505850>

6. [On the implementation of the order of the Ministry of Health of Ukraine of April 05, 2007 No. 167 “On approval of methodological guidelines “Determination of sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs” in 2017”]. *Informatsiinyi biuleten DU «UISD MOZ Ukraïni»*. Kyiv; 2018;5. Ukrainian.

7. [On the organization of control and prevention of postoperative purulent-inflammatory infections caused by

microorganisms resistant to the action of antimicrobials]. *Nakaz MOZ Ukraïni*. 04.04.2012 p. No. 236. Ukrainian. Available from:

<https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0912-12/stru>

8. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance. Annual report 2018. Available from: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/-disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications/-2018/central-asian-and-eastern-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance-annual-report-2018-2018>

9. Implementation of the global action plan on antimicrobial resistance. Newsletter WHO GAP AMR. 2017;32. Available from: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/news/WHO-GAP-AMR-Newsletter-No-32-Nov-2017.pdf?ua=1>

10. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance chaired by Jim O’Neill. May, 2016;81. Available from: https://amr-review.org/sites/default/files/-160518_Final%20paper_with%20cover.pdf

Стаття надійшла до редакції
25.10.2019

