

Тец В.В.<sup>1</sup>, Тец Г.В.<sup>1</sup>, Смирнова Е.И.<sup>1</sup>, Заславская Н.В.<sup>1</sup>, Викина Д.С.<sup>1</sup>, Артеменко Н.К.<sup>1</sup>, Вечерковская М.Ф.<sup>1</sup>, Казаков С.П.<sup>2</sup>, Путков С.Б.<sup>2</sup>, Эсауленко Н.Б.<sup>2</sup>, Тугарина Т.М.<sup>2</sup>

## ВЫБОР АНТИБИОТИКА ПО РЕЗУЛЬТАТАМ СТАНДАРТНОГО БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И ЭКСПРЕСС-МЕТОДА БЕЗ ВЫДЕЛЕНИЯ ЧИСТЫХ КУЛЬТУР

<sup>1</sup>ГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Минздрава РФ, 197022, Санкт-Петербург;

<sup>2</sup>ФГКУ ГВКГ им. акад. Н.Н. Бурденко Министерства Обороны РФ, 105229, Москва

*Изучена эффективность выбора антибиотика с использованием двух методов. Первый основан на стандартном, лабораторном исследовании, включающем выделение чистых культур предполагаемого возбудителя и определение их индивидуальной чувствительности к антибиотикам. Второй основан на новом экспресс-методе, позволяющем одновременно оценивать действие препаратов на культивируемые и пока не культивируемые бактерии без выделения чистых культур. При этом второй метод позволяет определить эффективность антибиотиков именно в тех концентрациях, которые можно создать в данном очаге инфекции. Исследование показало существование расхождения между результатами, полученными с использованием данных методов. Причиной расхождений может быть наличие в патологическом материале пока не культивируемых бактерий. В пользу этого свидетельствуют полученные данные о наличии в материале от больных значительного количества спорообразующих бактерий, обладающих дополнительными механизмами антибиотикоустойчивости. Кроме того, проведенное исследование выявило антибиотики, для которых характерны наибольшие расхождения результатов, полученных использованными методами, что указывает на необходимость пересмотра схем проведения стартовой или эмпирической терапии.*

**Ключевые слова:** выбор антибиотика; тест-система; экспресс-диагностика; пока не культивируемые бактерии.

**Для цитирования:** Тец В.В., Тец Г.В., Смирнова Е.И., Заславская Н.В., Викина Д.С., Артеменко Н.К., Вечерковская М.Ф., Казаков С.П., Путков С.Б., Эсауленко Н.Б., Тугарина Т.М. Выбор антибиотика по результатам стандартного бактериологического исследования и экспресс-метода без выделения чистых культур. Клиническая лабораторная диагностика. 2018; 63 (2): 106-109. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-106-109>

*Tetz V.V.<sup>1</sup>, Tetz G.V.<sup>1</sup>, Smirnova E.I.<sup>1</sup>, Zaslavskaya N.V.<sup>1</sup>, Vikina D.S.<sup>1</sup>, Artemenko N.K.<sup>1</sup>, Vecherkovskaya M.F.<sup>1</sup>, Kazakov S.P.<sup>2</sup>, Putkov S.B.<sup>2</sup>, Esaulenko N.B.<sup>2</sup>, Tugarina T.V.<sup>2</sup>*

### THE CHOICE OF ANTIBIOTIC ACCORDING TO THE RESULTS OF STANDARD BACTERIOLOGICAL ANALYSIS AND EXPRESS-METHOD WITHOUT ISOLATION OF PURE CULTURES

<sup>1</sup>The Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Pavlov First Saint Petersburg State Medical University" of Minzdrav of Russia, 197022, St. Petersburg, Russia

<sup>2</sup>The Federal State Official Institution "The N.N. Burdenko Main Military Clinical Hospital" of ministry of Defense of Russia, 105229, Moscow, Russia

*The efficiency of choosing antibiotics using two methods was analyzed. The first method is based on standard laboratory analysis including isolation of pure cultures of prospective agent and detection of their individual sensitivity to antibiotics. The second method is based on a new express-technique permitting to simultaneously evaluate effect of pharmaceuticals on cultivated and not cultivated yet bacteria without isolation of pure cultures. At that, the second method permits to determine efficiency of antibiotics namely in those concentrations that can be made in the given nidus of infection. The study demonstrated existence of discrepancy between results obtained by using the given methods. The cause of discrepancy can be presence of not cultivated yet bacteria in pathologic sample. In favor of this assumption testify the received data concerning samples from patients where were presented a significant number of spore-former bacteria having additional mechanisms of resistance to antibiotics. Furthermore, the implemented study established antibiotics characterized by the greatest discrepancy of results obtained by applied methods that indicates the necessity of revision of schemes of implementation of start or empiric therapy.*

**Key words:** choice; antibiotic; test-scheme; express diagnostic; not cultivated yet bacteria.

**For citation:** Tetz V.V., Tetz G.V., Smirnova E.I., Zaslavskaya N.V., Vikina D.S., Artemenko N.K., Vecherkovskaya M.F., Kazakov S.P., Putkov S.B., Esaulenko N.B., Tugarina T.V. The choice of antibiotic according to the results of standard bacteriological analysis and express-method without isolation of pure cultures. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2018; 63(2): 106-109. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-2-106-109>

**For correspondence:** Tetz V.V., doctor of medical sciences, professor, the head of the chair of microbiology and virology of the Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "The Pavlov First Saint Petersburg State Medical University", e-mail: [vtetv@yahoo.com](mailto:vtetv@yahoo.com)

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Acknowledgment.** The study had no sponsor support.

Received 27.09.2017  
Accepted 09.10.2017

*Введение.* Эффективность лечения пациентов в значительной степени зависит от правильного и своевременного выбора антибиотикотерапии. Существующие методы анализа результатов лабораторных исследований и эмпирического выбора антибиотиков основаны на свойствах известных и хорошо изученных бактерий. Молекулярно-генетические исследования микробиоты человека и животных показали, что известные классические методы выделения различных бактерий позволяют получить в виде чистых культур лишь не более 20% от общего разнообразия. Бактерии, гены которых выявить можно, а методы выделения чистых культур которых ещё не найдены, получили название «пока не культивируемых» [1]. Представляется, что пока не культивируемые бактерии не только преобладают в микробиоте человека, но и распространены среди возбудителей многих заболеваний [1–3]. Ранее значимые различия были показаны при сравнении результатов стандартного бактериологического исследования патологического материала и его изучения методом метагеномного анализа. Так, при изучении мокроты там, где стандартный метод выявил всего один вид бактерий, метагеномный анализ показал присутствие более 10 различных бактерий, среди которых известные патогены, встречающиеся при заболеваниях дыхательной системы: *Pseudomonas* spp. (кроме *Pseudomonas aeruginosa*), *Achromobacter* spp., *Granulicatella* spp., *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp. [4]. Схожие данные получены при аналогичном изучении мочи и раневого отделяемого [5, 6]. Обнаружено существование среди пока не культивируемых представителей микробиоты человека патогенных и условно-патогенных бактерий, способных вызывать болезни различной локализации. Таким образом, очевидно, что в развитии и поддержании многих патологических процессов принимают участие микробы, которые мы пока не можем выделить в виде чистой культуры, идентифицировать и определить их чувствительность к антибиотикам, что проявляется в недостаточной эффективности проводимой терапии. Другим важным фактором, влияющим на эффективность антибиотикотерапии, является скорость получения результатов лабораторного исследования. Разработаны различные схемы проведения таких исследований в том числе с использованием автоматических и полуавтоматических бактериологических анализаторов [7]. Как правило, такие методы занимают несколько дней, поскольку требуют выделения чистых культур. Развитие генетических подходов, основанных на выявлении и идентификации генов, кодирующих 16S рибосомальную РНК, позволило изучать материал от больного без выделения чистой культуры. Однако определить при этом возможно только ограниченное число известных бактерий и, как выяснилось, идентификация бактерий недостаточно точная, а выявление генов устойчивости не полностью соответствует их чувствительности к антибиотикам, поскольку гены хотя и присутствуют в геноме, но не всегда экспрессируются [8, 9]. Попытка совместить большую скорость диагностики с включением в число изучаемых культивируемые и пока не культивируемые бактерии принята в тест-системе «ВыборАнтибиотика» [10]. В тест-системе «ВыборАнтибиотика» использован новый алгоритм исследования, в котором за счёт богатой оригинальной питательной среды одновременно вырастают практически все бактерии из мокроты, мочи или раневого отделяемого (включая пока не культивируемые ви-

ды), а антибактериальные препараты тестируются в концентрациях, которые можно создавать непосредственно в очаге инфекции. В результате тест-система позволяет сравнительно быстро, в течение не более 24 ч, оценить суммарное отношение к различным антибиотикам всех бактерий, находящихся в патологическом материале.

Цель настоящей работы – сравнение результатов определения чувствительности к антибиотикам, полученным стандартными методами и с помощью тест-системы «ВыборАнтибиотика».

*Материал и методы.* Материал для исследования – мокрота больных с внебольничной пневмонией, раневое отделяемое и моча. Время между забором материала и включением его в исследование не превышало 24 ч с исключением хранения при 4°C.

*Питательные среды:* Колумбийский и шоколадный агар, уриселект 4 (BioMerie, Франция), маннит-солевой агар (Биомедиа, СПб), агар Шедлера (Oxoid, Великобритания), оригинальная питательная среда «ВыборАнтибиотика».

*Тест-система* «ВыборАнтибиотика» для культивирования бактерий и оценки действия на них антибиотиков.

*Микроскопия.* Мазки окрашивали по Граму, микроскоп Аxiostarplus (CarlZeiss, Германия), объективы А-Plan 100x/1.25, окуляр 10x (CarlZeiss, Германия).

*Идентификацию микроорганизмов и определение чувствительности к антибактериальным препаратам* проводили с помощью автоматического бактериологического анализатора Vitek 2 compact (bioMerieux, Франция).

*Белковый состав* определяли на спектрометре Bruker (Bruker Corporation, США).

*Анализ последовательности нуклеотидов гена 16S рРНК* выполняли с использованием универсальных бактериальных праймеров 27f – 1492g.

*Результаты и обсуждение.* Исследование выполнено на основе биоматериала, полученного от больных реанимационных отделений ГВКГ им. акад. Н.Н. Бурденко Минобороны России (Москва). Изучен материал от 52 больных, в том числе мокрота и раневое гнойное отделяемое по 18 образцов и моча – 16 образцов. Поскольку набор антибиотиков, используемый в картах анализатора Vitek 2 compact и тест-системе «ВыборАнтибиотика» совпадает не полностью, результаты сравнивались по антибиотикам, используемым в обеих системах. Состав сравниваемых антибактериальных препаратов при изучении различных биоматериалов приведён в таблице.

В ходе стандартной лабораторной диагностики выделены чистые культуры, впоследствии исследованные на чувствительность к антибактериальным препаратам. Выделение чистой культуры осуществляли в соответствии с действующими рекомендациями в течение 24–72 ч, после чего определяли её антибиотико-чувствительность.

При использовании тест-системы чистая культура не выделяется, патологический материал засеивали в лунки со специальной питательной средой и определённым содержанием различных антибиотиков в концентрациях, которые можно создать непосредственно в очаге инфекции. В результате наличие или отсутствие микробного роста является главным маркером эффективности или неэффективности антибактериального препарата. При этом в тест-системе «ВыборАнтибиотика» оценивается действие лекарственного препарата сразу на все бакте-

**Сравнение состава антибактериальных препаратов при изучении различных биоматериалов**

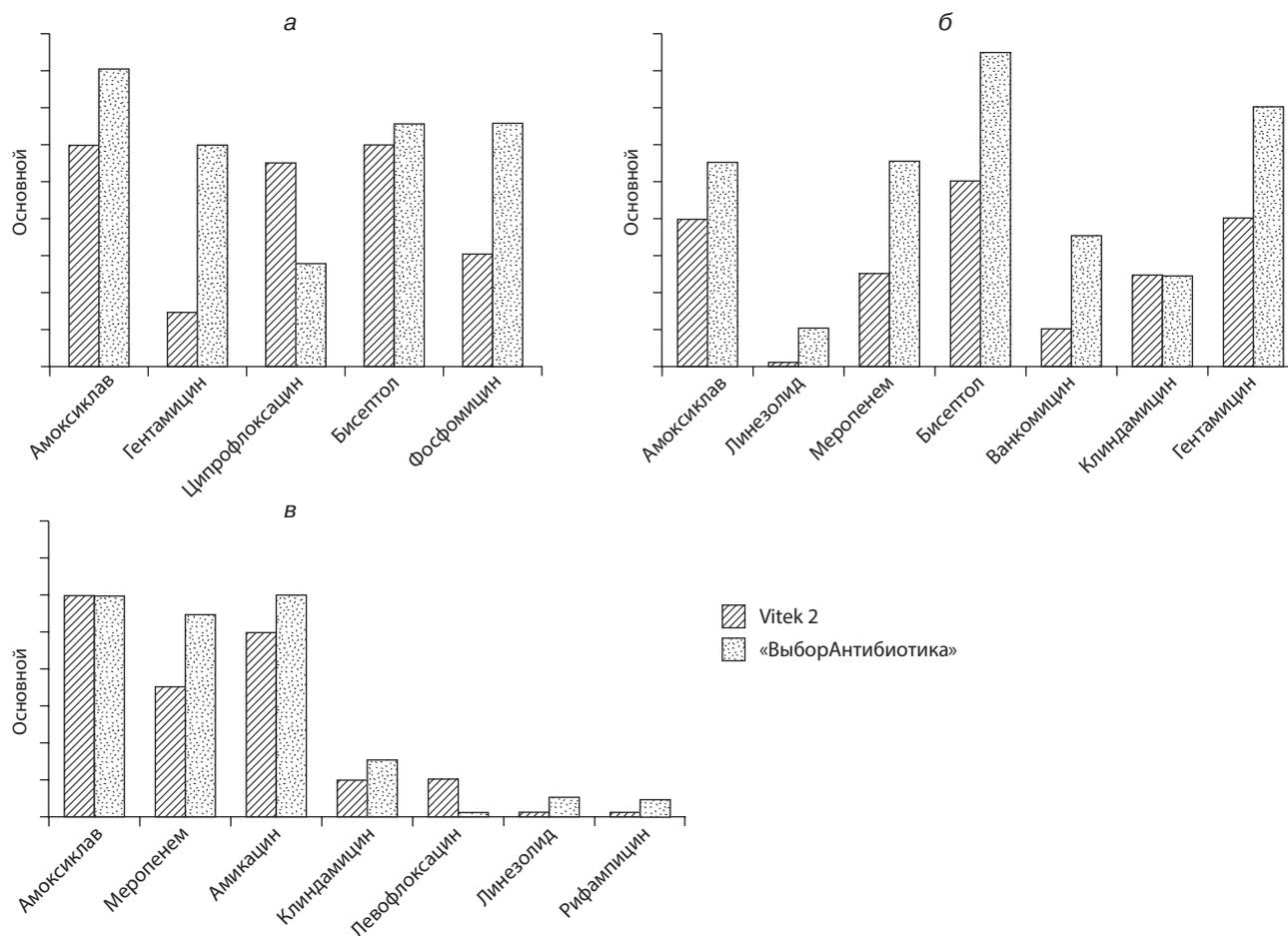
Антибактериальный препарат	Биоматериал		
	моча	раневое отделяемое	мокрота
Амикацин			+
Амоксиклав	+		+
Бисептол	+	+	+
Ванкомицин		+	+
Гентамицин	+	+	+
Клиндамицин		+	
Левифлоксацин		+	
Линезолид		+	
Меропенем			+
Фосфомицин	+		
Ципрофлоксацин	+		+

рии, которые присутствуют в биоматериале больного, с общим временем проведения анализа от 8 до 24 ч.

Результаты оценки возможной эффективности использования различных антибиотиков, полученные в ходе стандартного протокола исследования и экспрес-

методом «Выбор Антибиотика», имели ряд различий (см. рисунок, а, б, в). При анализе результатов выявлены определённые закономерности отличий, присущие всем типам испытанного патологического материала.

При изучении мокроты несовпадение результатов составило 42%. Наибольшее расхождение наблюдалось в действии меропенема, а минимальное количество несовпадений у амоксициллина - 20%. В пробах мочи результаты не совпали в 32%. Максимальное несовпадение показал фосфомицин - 56,25%, а минимальное было у бисептола и ципрофлоксацина - 18,75%. Изучение раневого отделяемого показало, что несовпадения составили 48%. Больше всего несовпадений у ванкомицина - 62,5% и меропенема - 54,5%, меньше всего несовпадений у гентамицина - 28,5%. В среднем несовпадения по всем изученным материалам и антибиотикам составили около 37%. Полученные данные свидетельствуют о том, что несовпадений больше у препаратов узкого и суженного спектров действия, таких как фосфомицин и ванкомицин, а также длительно используемых бисептола и меропенема. Такой результат также свидетельствует об одновременном наличии в патологическом материале различных неродственных бактерий, в том числе грамположительных и грамотрицательных, которые оказываются недоступными для выделения и идентификации с использованием стандартных микробиологических подходов [11].



Количество проб, устойчивых к антибиотикам, при разных методах исследования.

Материал для исследования: а – моча, б – раневое отделяемое, в – мокрота.

Для подтверждения несоответствия микробного состава, определённого в результате стандартного микробиологического исследования, с реальным содержанием разных бактерий в патологическом материале мы произвели поиск малоизвестных бактерий в изучаемых пробах, сфокусировавшись на спорообразующих аэробных бактериях. Спорообразующие бактерии были идентифицированы по морфологическим свойствам, биохимической активности, составу протеома и гена, кодирующего 16S рибосомальную ДНК. При использовании стандартного метода ни в одной из изученных проб не были выделены спорообразующие бактерии. В то же время, используя тест-систему «Выбор Антибиотика», среди выросших бактерий в виде чистых культур мы получили и идентифицировали ряд малоизвестных спорообразующих бактерий: *Bacillus subtilis* – 2 штамма, *Bacillus licheniformis* – 4 штамма, *Bacillus firmus*, *Bacillus fardii*, *Bacillus oleronius*, *Virgibacillus sp.* – по одному штамму. Наличие в патологическом материале спорообразующих бактерий, значение которых в патологии человека в последнее время вызывает повышенный интерес исследователей, может указывать на серьёзные проблемы, с которыми на сегодняшний день связана антибактериальная терапия различных заболеваний [12,13].

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что существующие микробиологические методы пока не позволяют выделить чистые культуры и изучить все бактерии, находящиеся в очаге инфекции. Основной причиной ограниченных возможностей стандартных лабораторных методов следует считать широкое распространение пока не культивируемых бактерий, которые дают рост при совместном выращивании в составе смешанных сообществ и не могут быть выделены согласно существующим протоколам. Это значительно снижает реальную ценность осуществляемого в настоящее время лабораторного исследования, обнаружившего существование расхождения между тем, что показывают методы определения чувствительности к антибиотикам выделенных чистых культур, и выбором антибиотика с учётом свойств пока не культивируемых бактерий. Результаты исследования также указывают на антибиотики, по которым имеются максимальные расхождения результатов, что свидетельствует о необходимости пересмотра их использования в эмпирической терапии, а также на наличие в патологическом материале большого количества спорообразующих бактерий, обладающих дополнительными механизмами антибиотикостойчивости.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Grice E.A., Segre J. A. The Human Microbiome: our second genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2012; 13: 151–70.
2. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010; 34: 415–25.
3. Lipkin W. I. The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11: 133–41.
4. Тец Г.В., Тец В.В., Ворошилова Т.М. Оценка микробного состава мокроты при внебольничной пневмонии. *Практическая пульмонология.* 2015; 2: 62–5.
5. Тец Г.В., Тец В.В., Ворошилова Т.М. Микробный состав отделяемого ожоговой раны и эффективность его изучения при лабораторной диагностике. *Инфекции в хирургии.* 2016; 2: 29–31
6. Тец Г.В., Тец В.В., Ворошилова Т.М. Метагеномный анализ проб при цистите. *Урология.* 2016; 1: 29–31.
7. Jorgensen J.H., Ferraro M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49 (11): 1749–55.
8. Вечерковская М.Ф., Тец Г.В., Тец В.В. Неизвестные бактерии в микрофлоре ротовой полости детей с онкогематологическими заболеваниями. *Клиническая онкогематология.* 2014; 7(2): 229–32.
9. Миронов А. Ю., В. Зур Н. В. *Молекулярные маркеры патогенов.* М.: ООО «Тираж»; 2013.
10. Тец Г.В., Смирнова Е.И., Кардава К.М., Викина Д.С., Заславская Н.В., Тец В.В. Выбор антибиотиков при смешанных инфекциях у пациентов с хронической обструктивной болезнью легких. *Практическая пульмонология.* 2015; 4: 39–41.
11. Тец Г.В., Тец В.В., Ворошилова Т.М., Смирнова Е.И., Кардава К.М., Карамян Т.А., Заславская Н.В., Викина Д.С., Зайцева М.А., Артеменко К.Л., Кауфман А.С. Выбор антибиотика в микробиологическом исследовании инфекций мочевыводительной системы. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 2:114–6.
12. Tuazon C.U., Murray H.W., Levy C., Solny MN, Curtin JA, Sheagren JN. Serious infections from *Bacillus* species. *JAMA.* 1979; 241: 1137–40.
13. Тец Г.В., Тец В.В., Артеменко Н.К. Спорообразующие бактерии – возбудители заболеваний дыхательной системы и предотвращение их распространения в стационаре. *Практическая пульмонология.* 2015;1: 43–5.

## REFERENCES

1. Grice E.A., Segre J. A. The Human Microbiome: our second genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2012; 13: 151–70.
2. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2010; 34: 415–25.
3. Lipkin W. I. The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11: 133–41.
4. Tetz G.V., Tetz V.V., Voroshilova T.M. Assessment of sputum microbial composition in community-acquired pneumonia. *Prakticheskaya pul'monologiya.* 2015; 2: 62–5. (in Russian)
5. Tetz G.V., Tetz V.V., Voroshilova T.M. Microbial composition of the burn wound discharge and effectiveness of its study in the laboratory diagnostics. *Infektsii v khirurgii.* 2016; 2: 29–31 (in Russian)
6. Tetz G.V., Tetz V.V., Voroshilova T.M. Metagenomic analysis of samples in cystitis. *Urologiya.* 2016; 1: 29–31. (in Russian)
7. Jorgensen J.H., Ferraro M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49 (11): 1749–55.
8. Vecherkovskaya M.F., Tetz G.V., Tetz V.V. Unknown bacteria in oral flora of children with hematological malignancies. *Klinicheskaya onkogematologiya.* 2014; 7(2): 229–32. (in Russian)
9. Mironov A. Yu., B. Zur N. V., eds. *Pathogen molecular markers [Molekulyarnye markery patogenov].* Moscow: Tirazh; 2013. (in Russian)
10. Tetz G.V., Smirnova E.I., Kardava K.M., Vikina D.S., Zaslavskaya N.V., Tetz V.V. The choice of antibiotics for mixed infections in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Prakticheskaya pul'monologiya* 2015; 4: 39–41. (in Russian)
11. Tetz G.V., Tetz V.V., Voroshilova T.M., Smirnova E.I., Kardava K.M., Karamyan T.A., Zaslavskaya N.V., Vikina D.S., Zaiceva M.A., Artemenko K.L., Kaufman A.S. The choice of an antibiotic in a microbiological study of urinary tract infections. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2016; 2:114–6. (in Russian)
12. Tuazon C.U., Murray H.W., Levy C., Solny M.N., Curtin J.A., Sheagren J.N. Serious infections from *Bacillus* species. *JAMA.* 1979; 241: 1137–40.
13. Tetz G.V., Tetz V.V., Artemenko N.K. Spore-forming bacteria – causative agents of the respiratory system diseases and prevention of their spread in the hospital. *Prakticheskaya pul'monologiya.* 2015;1: 43–5.

Поступила 27.09.17

Принята к печати 09.10.17