ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ КУЛЬТУРАЛЬНОЙ ХРОМОГЕННОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПАТОГЕНОВ МОЧЕВЫХ ПУТЕЙ

Л.Г. Боронина,[1,2] Е.В. Саматова,[1,2] Кукушкина М.П.[1,2], С.М. Блинова,[1,2] С.С. Устюгова,[1]
[1]ГУЗ «Областная детская клиническая больница №1»,
[2]ГБОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Екатеринбург

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) относятся к самым распространенным инфекционным заболеваниям, которые требует значительных финансовых затрат. В США на ИМП приходится более 7 млн. визитов к врачу в год, из них более 2 млн. связаны с циститом. Около 15% всех амбулаторно назначаемых антибиотиков, общей стоимостью более 1 млрд. долларов в год, выписываются по поводу ИМП. Более того, прямые и непрямые затраты на внебольничные ИМП превышают 1,6 млрд. долларов США в год.

ИМП являются причиной более 100 000 госпитализаций в год, преимущественно по поводу пиелонефрита. На их долю также приходится как минимум 40% от всех нозокомиальных инфекций, которые в большинстве случаев обусловлены катетеризацией мочевого пузыря. У 25% пациентов с установленным ≥7 дней мочевым катетером развивается нозокомиальная бактериурия, при этом ежедневный риск её развития составляет 5%. Более того, возбудители инфекций подвергаются воздействию факторов внутрибольничной среды, в том числе «селективному давлению» антибиотиков и антисептиков [2].

ИМП также широко распространены и в детском возрасте (около 18 на 1 000 детского населения). Начало заболевания часто приходится на первый год жизни и, как правило, протекает в виде острого пиелонефрита. В периоде новорожденности ИМП преимущественно регистрируется у мальчиков (до 3%), затем к году происходит снижение их частоты до 1-2%. Заболеваемость ИМП у мальчиков в дошкольном возрасте составляет не более 0,5%, а периоде пубертата — всего 0,1%. У девочек частота ИМП с возрастом увеличивается (на 1 году — 2,7%; в дошкольном возрасте — 4,7%; в школьном возрасте составляет от 1,2 до 1,9%). Лечение ИМП бывает успешным не у всех больных. В течение ближайших трех месяцев после первого эпизода ИМП рецидивирует у большей части пациентов, в связи с чем, нередко, требуется проведение повторных курсов антибактериальной терапии. От того, насколько правильно выбрана стартовая антимикробная терапия ИМП, зависит в конечном итоге эффективность лечения и прогноз заболевания [1].

Поэтому важно обеспечить своевременную и качественную микробиологическую диагностику ИМП и определение чувствительности к антибиотикам выделенных патогенов для обеспечения рациональной антибактериальной терапии.

Цель. Оценить возможность применения CHROMagar™ Orientation (CHROMagar, Франция) для одномоментного исследования бактериурии культуральным методом и дифференциации микроорганизмов при инфекции мочевыводящих путей.

Материалы и методы. С 24 марта по 25 июля 2011 года в лаборатории клинической микробиологии ОДКБ №1 среда CHROMagar™ Orientation (CHROMagar, Франция) использовалась для посева мочи от пациентов с осложнёнными и не осложнёнными инфекциями мочевыводящих путей из отделений стационара — всего 1 342 проб. Сбор и доставка мочи производилась согласно МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории». Посев средней порции утренней мочи осуществлялся по методу Айзенберга [3] с последующей инкубацией при температуре 37°С 18-24 часа. Выделенные культуры идентифицировали с помощью классических бактериологических методов, а также с использованием тест-систем для полуавтоматического — ATB-expression (BioMerieux, Франция) и автоматического — MicroScan WalkAway96 (Siemens, Германия) анализаторов.

Результаты исследования и обсуждение. CHROMagar™ Orientation (CHROMagar, Франция) — это хромогенная среда, предназначенная для выделения и дифференциации патогенов мочевых путей. Производителем предлагается следующая дифференциация микроорганизмов по внешним признакам колоний — цвету (согласно русскоязычной версии инструкции, размещенной на сайте http://drgtech.ru/drg_orientation.htm): *Escherichia coli* — красные; *Enterococcus* — бирюзовые; *Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter* — голубой металлик; *Proteus* — с коричневым ореолом; *Pseudomonas* — кремовые, полупрозрачные; *Staphylococcus aureus* — золотые, матовые, нет роста; *Staphylococcus saprophyticus* — розовые, матовые, нет роста.

За данный период было исследовано всего 1342 пробы мочи, из них в 769 (57,3%) рост микроорганизмов не был обнаружен. В 238 (17,7%) выявлена контаминация (выделено ≥3-х культур). В 25% (335 проб) наблюдался рост микроорганизмов преимущественно в монокультуре (67%), две культуры (33%). Всего выделено 447 штаммов микроорганизмов.

Из 101 штамма *E. coli*, выделенной на CHROMagar™ Orientation, 96 штаммов (95%) были сиреневого цвета или с вариацией от светло-сиреневого до темно-сиреневого оттенка; 1% (1 штамм) светло-бирюзовые, по 2% (2 штамма) фиолетовые и сине-сиреневые.

Из 7 штаммов лактозонегативной *E. coli* 80,7% (6 штаммов) также были сиреневого цвета и лишь в 14,3% (1 штамм) бесцветного. Согласно русскоязычной инструкции колонии *E. coli* должны быть красного цвета, при этом в англоязычной версии от темно-розового до красноватого. По результатам нашего исследования колонии *E. coli* были окрашены в сиреневый цвет или его вариации от светло-сиреневого до темно-сиреневого оттенка. Предположительно подобная разница в цветовой дифференциации в данном и последующих случаях связана с нюансами перевода и субъективностью цветовосприятия, поэтому рекомендуется сверяться с англоязычной версией и фотографиями на сайте производителя.

В 86,6% (13 штаммов) случаев бактерии рода *Enterobacter* (из 15 = 13 штаммов *E. cloacae*, 2 штамма *E. aerogenes*) были окрашены в синий цвет и по 1 штамму (6,7%) сине-сиреневые и бирюзовые. 34 штамма *Klebsiella pneumonia* и 8 штаммов *Klebsiella oxytoca* все колонии на среде имели синий цвет. Из 4 штаммов *Citrobacter freundii* — 2 были окрашены в синий цвет, и по одному в серый и сиреневый.

Таким образом, в подавляющем большинстве случаев колонии бактерий родов *Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter* (93,4%) имели различные оттенки синего цвета, а не цвета «голубой металлик», как описано в инструкции.

Всего было выделено 157 штаммов энтерококков, из них: 1) 104 — *Enterococcus faecalis*, из них 96 штаммов (92,3%) были бирюзовые, с вариациями от светло-бирюзового до темно-бирюзового, и лишь 8 (7,7%) штаммов синие мелкие; 2) 51 штамм, идентифицирован только до рода, *Enterococcus sp.* — 35 (68%) бирюзовые, с вариациями от светло-бирюзового до темно-бирюзового, 15 (29,4%) синие мелкие или точечные, и 1 штамм (2,6%) точечные сиреневые; 3) 2 штамма *Enterococcus faecium* на среде были окрашены в одном случае в светло-бирюзовый цвет, а в другом в синий.

В итоге 84% микроорганизмов рода *Enterococcus sp.* были окрашены в бирюзовый цвет и лишь 16% были синего или сиреневого цвета, что, скорее всего, объясняется точечными или мелкими размерами колоний данных микроорганизмов, что затрудняет их цветовую дифференцировку.

Из 6 штаммов *Proteus mirabilis* в 2 случаях колонии были серого цвета, в 2 кремового и 2 бесцветные, полупрозрачные с коричневым пигментом, диффундирующим в прилегающий слой среды, соответственно. Также был выделен 1 штамм *Proteus vulgaris*, который на среде был бесцветный, полупрозрачный с кремово-коричневым пигментом, диффундирующим в прилегающий слой среды. По инструкции к среде колонии *Proteus* должны быть с коричневым ореолом. Как видно из нашего исследования различные оттенки коричневого наблюдались в 57% случаев, но количество выделенных нами штаммов мало для достоверного заключения. Одним из преимуществ данной среды является отсутствие ползучего роста у микроорганизмов рода *Proteus*, что особенно важно, когда на среде наблюдается рост двух диагностически значимых патогенов.

Выделено 7 штаммов *Morganella morganii* — 2 штамма серого цвета, 3 разного оттенка бежево-кремового и 2 бесцветные, полупрозрачные с коричневым пигментом, диффундирующим в прилегающий слой среды. Цвет колоний данного микроорганизма на CHROMagar™ Orientation не оговаривается, но, исходя из того, что раньше рода *Proteus, Morganella, Providencia* относились к одной трибе, можно предположить, что они будут иметь похожую окраску, что подтверждается нашим исследованием. Поэтому в отношении данной трибы должно обязательно проводиться дополнительное тестирование для окончательной идентификации.

Из 15 штаммов *Pseudomonas aeruginosa*: 3 штамма кремовые, полупрозрачные; 9 — серого цвета; 1 — желтого, полупрозрачного цвета; 2 — бесцветных. Как правило, на вторые сутки у колоний синегнойной палочки наблюдалось появление зеленого пигмента с диффузией в агар. Также был выделен 1 штамм *Pseudomonas fluorescens* колонии, которые были желтые, полупрозрачные. Представители данного рода, согласно инструкции, кремовые, полупрозрачные. По нашим наблюдениям 68,7% были серого цвета или бесцветные. *P. aeruginosa* играет наибольшую роль в этиологии внутрибольничных ИМП по сравнению с другими видами *Pseudomonas*, для её верификации необходима постановка дополнительных тестов. *Staphylococcus aureus* был выделен однократно кремового цвета. *Staphylococcus saprophyticus* был обнаружен также однократно — сиреневого цвета и маленького размера. Для заключения о соответствии этих микроорганизмов с цветом по инструкции слишком мало наблюдений. Согласно русскоязычной инструкции при характеристике *S. aureus* и *S. saprophyticus* употребляется фраза «нет роста», а в англоязычной — «small», скорее всего, говорится о маленьком размере колоний.

Ниже приводятся наши наблюдения о цвете колоний, родов и видов микроорганизмов, которые не указаны разработчиком для данной среды.

2 штамма *Acinetobacter baumannii* — от бесцветного до беломутного и 2 штамма *Acinetobacter lwoffii* оба бесцветные, полупрозрачные. Из 5 штаммов грибов (2 *Candida albicans*, 2 *Candida sp.*, 1 *Candida glabrata*) в основном белые мелкие или белые точечные, за исключением одного случая — синие мелкие. 1 штамм *Corynebacterium sp.* — серого цвета.

Из 12 штаммов *Lactobacillus sp.* у 7 штаммов колонии были синего цвета пылевидные или точечные, у 1 — пылевидные сиреневые, у 3 — от бледно-бирюзового до бирюзового пылевидные или точечные. Колонии *Staphylococcus epidermidis* (22 из 24 штаммов) были белого цвета, по одному штамму — колонии серого и синего цвета и мелкие по размеру.

В 94,3% (33 из 35 штаммов) белые мелкие колонии также были характерны для *Staphylococcus haemolyticus* и *Staphylococcus sciuri* (1 штамм), из них лишь по 1 штамму светло-сиреневого и бирюзового цвета. Все 6 штаммов *Streptococcus agalactiae* имели колонии светло-бирюзового цвета. 1 штамм *Streptococcus sp.* образовал мелкие колонии синего цвета с ободком.

К сожалению, на данной среде нельзя определять гемолитические свойства микроорганизмов, что необходимо для дифференциальной диагностики ряда уропатогенов (например, *S. agalactiae* от энтерококков). Кроме того, для стационарных больных, требующих коррекции антибактериальной терапии, важно дифференцировать микроорганизмы до вида, что необходимо для тестирования резистентности, а CHROMagar™ Orientation позволяет это сделать только для *E. coli*, в других случаях требуется дополнительная идентификация.

Проведенное исследование свидетельствует, что среда CHROMagar™ Orientation (CHROMagar, Франция) может быть использована для выделения и дифференциации основных патогенов мочевых путей (*E. coli, Enterococcus, Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter*).

На наш взгляд необходимо более подробное описание цветовой шкалы для унификации результатов в определении цвета колоний выросших микроорганизмов при идентификации культур.

Литература

1. Практические рекомендации по антибактериальной терапии инфекций мочевой системы внебольничного происхождения у детей. Пособие разработано в Научно-методическом центре Минздрава РФ по мониторингу антибиотикорезистентности, НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии, г. Смоленск и кафедрой педиатрии Российской медицинской академии последипломного образования, г. Москва. — Смоленск, 2002. — 21 с.

2. Рекомендации по ведению больных с инфекциями почек, мочевых путей и мужских половых органов / К.Г. Набер., М.С. Бишоп, Т.Е. Бейрклунд-Йохансен, Х. Ботто, М. Сек, М. Грабэ, Б. Лобел, Дж. Палоу, П. Тенке. — Смоленск: «Смоленский полиграфический комбинат», 2008. — 224 с.

3. Essential procedures for clinical microbiology / Editor in chief H.D. Isenberg. — Washington, D.C., 1998. — 842 p.