

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«РОСТОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
МИКРОБИОЛОГИИ И ПАРАЗИТОЛОГИИ»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
(ФБУН «РостовНИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора)

«УТВЕРЖДАЮ»
Врио директора института
к.б.н. В.В. Агафонова



30. сентября 2019 г.



**МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ СРЕДИ БЕРЕМЕННЫХ ГРУПП РИСКА
ПО РАСПРОСТРАНЕНИЮ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРОБОВ
В РОДОВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ УЧРЕЖДЕНИЯХ**

Информационно-методическое письмо

Одобрено Учёным Советом
ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии
Роспотребнадзора
Протокол № 8
от 24 октября 2019 г.

Ростов-на-Дону, 2019

Методы выявления среди беременных групп риска по распространению условно-патогенных микробов в родовспомогательных учреждениях.

Информационно-методическое письмо предназначено для врачей акушерско-гинекологических организаций – консультативных центров, клиник, проводящих диспансерное наблюдение за беременными и осуществляющих медицинскую помощь по родовспоможению; для преподавателей и студентов медицинских университетов, слушателей курсов повышения квалификации.

Разработчики:

1. ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
к.б.н. Гапон М.Н., д.м.н. Терновская Л.Н., к.м.н. Зарубинский В.Я.
2. ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, кафедра акушерства и гинекологии
к.м.н. Логинов И.А.
3. ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, медицинский колледж
к.м.н. Тагиров З.Т.

Авторский коллектив:

Гапон М.Н.
Терновская Л.Н.
Зарубинский В.Я.
Логинов И.А.
Тагиров З.Т.

Рецензенты:

| | |
|-------------------------|---------------|
| Доктор медицинских наук | Набока Ю.Л. |
| Доктор медицинских наук | Павлович Н.В. |

344000, г. Ростов-на-Дону, пер. Газетный, 119
Тел./факс (863)234-91-83

E-mail: rostovniimp@mail.ru

Информационно-методическое письмо

Составители:

М.Н. Гапон — ведущий научный сотрудник ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, кандидат биологических наук.

Л.Н. Терновская — главный научный сотрудник ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, доктор медицинских наук.

Зарубинский В.Я. – старший научный сотрудник ФБУН «Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, кандидат медицинских наук.

И.А. Логинов – доцент кафедры акушерства и гинекологии ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, кандидат медицинских наук.

З.Т. Тагиров – преподаватель медицинского колледжа ФГБОУ ВО РостГМУ Минздрава России, кандидат медицинских наук.

Аналитическая часть

Распространение инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) составляют одну из ведущих проблем современного здравоохранения (Покровский В. И. с соавт., 2012). Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, особенно опасны в родовспомогательных учреждениях, так как являются причиной детской смертности (Благонравов А. С. с соавт., 2010; Покровский В. И. с соавт., 2011). Этиологическая структура гнойно-воспалительных заболеваний новорожденных и родильниц в равной степени представлена как грамположительными, так и грамотрицательными условно-патогенными бактериями (Кудрявцева Л. Г. с соавт., 2013).

В связи с этим, раннее выявление инфекционного агента и условий, способствующих его распространению, имеет огромную значимость. Использование микробиологических методов всегда являлось золотым стандартом для выделения возбудителей, однако, длительность их исполнения и не полный спектр культивируемых микроорганизмов, стали стимулом к поиску более быстрых и эффективных методов диагностики. В последние годы для определения функциональных изменений микробиологического сообщества всё чаще используют методы метабономики, с помощью которых проводят анализ части метаболитов, что даёт интегральную оценку всей системы, а не отдельных её составляющих (Затевалов А. М. с соавт., 2014). При этом для получения информации и её обработки используется современное дорогостоящее оборудование, которое, к сожалению, не всегда доступно в практической медицине. В связи с этим поиск простых в исполнении и не дорогих способов выявления рисков распространения разного рода инфекций остаётся актуальным.

Известно, что важным фактором, определяющим эпидемический процесс ИСМП, является концентрация в стационарах пациентов со

сниженным иммунитетом (Покровский В. И. с соавт., 2011; Семина Н. А. с соавт., 2006). Одной из ведущих причин снижения иммунорезистентности организма человека считается нарушение микробной экологии в кишечнике, сопровождаемое присутствием условно-патогенной микрофлоры (УПМ) (Суворов А. Н. с соавт., 2013), что позволяет людей с дисбиозом толстой кишки рассматривать как потенциальных источников инфекций. Результатами многих исследований было показано, что к окончанию периода гестации в содержимом толстой кишки беременных на фоне незначительного сокращения численности нормальных эубионтов значительно возрастает содержание УПМ (Рымашевский, А. Н. с соавт., 2011). Опасность их присутствия заключается в возможной транслокации УПМ в несвойственные им биотопы организма, что может явиться причиной развития осложнений. Транслокация бактерий осуществима при повреждении клеточных мембран, которое является результатом окислительного стресса, сопутствующего даже физиологическому течению беременности (Сторожук А. П., 2004). Повреждение клеточных мембран усиливается при несостоятельности системы антирадикальной защиты на фоне активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ).

Ранее нашими исследованиями (Гапон М. Н. с соавт., 2007-2015) было установлено, что количество продуктов ПОЛ, в частности, малонового диальдегида (МДА) сопряжено с общим числом УПМ в микробиоценозах толстой кишки, состоянием антиоксидантной и иммунной защиты на местном уровне. Изучение особенностей кишечного микробиома, состояния местной неспецифической резистентности и локального иммунитета у беременных позволило установить связь, позволившую выбрать показатель МДА в копрофильтратах в качестве критерия отбора группы риска по передаче внутрибольничной инфекции.

Формула методов

При постановке беременных на учёт определять биохимическим методом количество МДА в копрофильтратах (10^{-2} разведении фекалий). При повышенных значениях данного показателя (более $2,0 \cdot 10^{-6}$ нмоль/мл), свидетельствующего о присутствии в кишечном биотопе УПМ, осуществлять бактериологическое исследование с целью выделения патогена и проведения мероприятий по его элиминации из организма, что позволит повысить иммунный статус беременных и предотвратит распространение ИСМП в родовспомогательных учреждениях.

Описание методов

Методы информативны при проведении диспансеризации беременных женщин и их клинико-лабораторного обследования с целью выявления условно-патогенных микроорганизмов в биотопах толстой кишки для предотвращения их распространения в условиях родовспомогательных стационаров.

Методы не требуют вмешательства во внутреннюю среду организма и могут быть воспроизведены в любой биохимической и бактериологической лаборатории.

I - Биохимический метод выявления людей из групп риска по передаче инфекционного агента в стационаре.

Биохимический метод включает:

1. Приготовление копрофилтратов осуществляют путем гомогенизации 0,5 г фекалий в 4,5 мл физиологического раствора с последующим центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут. В случае заморозки материала, допускается однократное размораживание.

2. Для анализа к 1 мл копрофилтратов добавляют 1 мл 30 % раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и 1 мл 0,78 % раствора тиобарбитуровой кислоты (ТБК).

Пробы помещают в кипящую водяную баню при 100°С на 15 мин. После охлаждения пробы центрифугируют 10 мин при 3000 об/мин.

Оптическую плотность раствора измеряют на ФЭКе при длине волны $\lambda=540$ нм в кювете толщиной 1 см против дистиллированной воды.

Метод определения содержания МДА основан на том, что при нагревании в кислой среде часть продуктов перекисного окисления липидов, относящихся к классу эндоперекисей, разлагаются с образованием МДА, молекула которого взаимодействует с 2 молекулами ТБК с образованием окрашенного триметинового комплекса [1].

3. Расчёт величины показателя МДА по формуле:

$$C = D / K l V$$

где: D – оптическая плотность пробы;

K – молярный коэффициент, равный, $1,56 \cdot 10^5$ Моль⁻¹см⁻¹;

l – толщина кюветы;

V – объём пробы.

Содержание МДА в копрофилтратов в нмоль/мл.

II – Бактериологический метод выявления людей из групп риска по передаче инфекционного агента в стационаре.

Бактериологический метод включает:

1. Забор фекалий после естественного акта дефекации из горшка, судна, памперса стерильной палочкой или впянной в крышку специального контейнера ложкой из последней порции каловой массы в стерильный контейнер в объёме 1/2 чайной ложки. Время от момента забора материала до его обработки в лаборатории не должно превышать 4-х часов.

2. Бактериологическое исследование на дисбактериоз кишечника проводят в соответствии с методическими рекомендациями «Комплексная

диагностика, лечение и профилактика дисбактериоза (дисбиоза) в клинике внутренних болезней».

3. Оценку результатов дисбиотических изменений осуществляют в соответствии с отраслевым стандартом «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» (ОСТ 91500.11.0004-2003). Выделенные культуры идентифицируют по морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам. Видовую принадлежность определяют в соответствии с определителем видов Берджи.

4. Результаты проведенного бактериологического исследования кала оформляют в соответствии с прилагаемой формой в таблице 1 (Приложение 2).

Пример. В женскую консультацию обратилась женщина 25 лет для постановки на учёт по беременности. При осмотре гинекологом был установлен срок беременности 12 недель. При сборе анамнеза у пациентки не было выявлено никаких хронических заболеваний. Гинеколог рекомендовал сделать в биохимической лаборатории исследование кала на содержание МДА. В результате анализа количество МДА соответствовало $4,6 \cdot 10^{-6}$ нмоль/мл, что по таблице 2 (Приложение 2) соответствует 2-3 степени дисбиотических нарушений. Последующее бактериологическое исследование кала беременной выявило присутствие в обследуемом биотопе УПМ (КОЕ): золотистого стафилококка 10^5 , клебсиелл 10^6 , клостридий 10^7 на фоне сниженного количества нормальных эубионтов - бифидобактерий 10^6 , лактобактерий 10^5 , кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью 10^5 . Женщине были рекомендованы препараты, не имеющие противопоказаний при беременности: 1. Сорбент для снятия интоксикации (энтеросгель или полисорб, или полифепан) 2. Ферменты (эрмиталь или креон) 3. Препараты, содержащие живые микроорганизмы-антагонисты, элиминирующие патогены путём выработки бактерицидных ферментов (Энтерол или Бактисубтил, или Биоспорин) 4. Нормофлорины – комплексные биопрепараты содержащие пребиотики, пробиотики, их метаболиты и низкомолекулярные пептиды (Нормофлорин Б, Нормофлорин Л и Нормофлорин Д) 5. Колибактерин.

Спустя месяц после проведенной биокоррекции повторный анализ кала на содержание МДА соответствовало $1,25 \cdot 10^{-6}$ нмоль/мл, что является допустимым значением. Состояние беременной не представляет угрозу по распространению инфекционных агентов в родовспомогательном учреждении.

Эффективность использования методов

Было проведено параллельное обследование кала 320 практически здоровых беременных женщин фертильного возраста биохимическим, иммунологическим и бактериологическим методами.

Результаты бактериологического исследования женщин показали, что у всех обследованных не зависимо от срока беременности, выявлялось нарушение состава микробиома толстой кишки разной степени тяжести.

Первая степень дисбиоза определялась у 35% женщин в первом триместре, у 10% - во втором триместре, у 1% - в третьем триместре. Вторая степень встречалась значительно чаще: у 43% в первом триместре, у 40% - во втором, у 31% - в третьем. Третья степень дисбиоза была установлена в 22 % случаев в первом триместре, в 50% - во втором, в 67% - в третьем. Полученные данные отражают преобладание в большинстве случаев у беременных II и III степени микробиологических нарушений. Отличительной чертой микробного состава толстой кишки беременных женщин на последнем сроке гестации стало достоверное ($p < 0,05$) увеличение в 1,7 раз общего числа условно-патогенных микроорганизмов в 93% случаев.

Наряду с этим в динамике беременности был зафиксирован достоверный ($p < 0,05$) рост средних величин МДА: в I триместре среднее количество МДА составляло – 2,4 нмоль/мл, во II триместре - 3,4 нмоль/мл, в III триместре - 5,2 нмоль/мл. У обследованных на последнем сроке гестации среднее количество МДА превышало первоначальный уровень более чем в 2 раза, что косвенно указывает на эндобиологическое неблагополучие и несостоятельность детоксикационной системы к исходу беременности. Однако в каждом отдельном случае содержание МДА не зависело от срока беременности, а отражало степень микробиологических нарушений в толстой кишке. Рост средних величин МДА в копрофильтратах в динамике беременности, коррелировало с увеличением численности условно-патогенных микроорганизмов в кишечном микробиоценозе, что подтверждено коэффициентом Спирмена на уровне $p < 0,05$. Возрастающая динамика содержания МДА позволила предположить также и о наличии деструктивных изменений в толстой кишке у беременных с дисбиозом.

Определение в копрофильтратах беременных уровня γ -ИНФ методом ИФА выявило соответствие данного показателя степеням дисбиотических нарушений в микробиоценозе толстой кишки (таблица 2).

Анализ результатов представленных методов подтвердил, что возрастание численности УПМ в кишечном биотопе беременных к последнему сроку гестации происходит при несостоятельности местной иммунной защиты и активации процессов пероксидации.

Использование предварительного биохимического обследования беременных позволит избежать более высоких экономических затрат на массовое бактериологическое обследование и сократит время выявления среди беременных, лиц из группы риска по передаче ИСМП.

Рекомендации для врачей акушерско-гинекологических организаций - центров, клиник, проводящих диспансерное наблюдение за беременными и осуществляющих медицинскую помощь по родовспоможению:

1. Проводить биохимическое исследование содержимого толстой кишки у беременных на ранних сроках беременности при постановке на учёт и ежемесячно на всём сроке гестации с целью контроля уровня МДА. При повышенных значениях МДА в копрофильтратах (более $2,0 \cdot 10^{-6}$ нмоль/мл), направлять беременных на бактериологическое исследование фекалий.

2. Обращать внимание на наличие УПМ в результатах бактериологического исследования толстой кишки у беременных. При выявлении условно-патогенных микроорганизмов (золотистого стафилококка, лактозонегативных энтеробактерий, клостридий, неферментирующих бактерий, дрожжеподобных грибов рода кандида) выше допустимых значений, незамедлительно проводить их элиминацию из обследуемого биотопа.

Приложение 1

Нормативные и методические документы

1. Андреева, Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин // Лаб. Дело. – 1988. - № 1.
2. ОСТ 91500.11.0004-2003 Отраслевой стандарт. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника.
3. Комплексная диагностика, лечение и профилактика дисбактериоза (дисбиоза) кишечника в клинике внутренних болезней. Методические рекомендации. М. 1997 (С.Д. Митрохин, М.Д. Ардатская, Е.В. Никушкин)
4. Приказ МЗ СССР № 535 от 22 апреля 1985 г.

Приложение 2

Таблица 1 - Качественный и количественный состав основной микрофлоры толстой кишки у здоровых женщин фертильного возраста (КОЕ/г фекалий)

| Виды микроорганизмов | Нормальные показатели (КОЕ/г фекалий) | Результаты исследования |
|--|---------------------------------------|-------------------------|
| Патогенные энтеробактерии | 0 | |
| Бифидобактерии | 10^9-10^{10} | |
| Лактобактерии | 10^7-10^8 | |
| Энтерококки | 10^5-10^8 | |
| Клостридии | $\leq 10^5$ | |
| E.coli с нормальной ферментативной активностью | 10^7-10^8 | |
| E.coli со сниженной ферментативной активностью | < 5% | |
| Эшерихии гемолитические | 0 | |
| Эшерихии лактозонегативные | < 10^5 | |
| Другие условно- патогенные энтеробактерии * | < 10^4 | |
| Стафилококки золотистые | 0 | |
| Стафилококки коагулазоотрицательные | $\leq 10^4$ | |
| Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i> | $\leq 10^4$ | |
| Неферментирующие бактерии ** | $\leq 10^4$ | |

Примечание * - представители родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* и др. ** - *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и др.

Таблица 2 - Показатели γ -ИНФ, МДА в копрофильтратах беременных с разной степенью дисбиоза толстой кишки (по ОСТ 2003г)

| Состояние микробиоценоза толстой кишки | Показатели в копрофильтратах | |
|--|--------------------------------|------------------------------|
| | Содержание γ -ИНФ пг/мл | МДА $\cdot 10^{-6}$ нмоль/мл |
| 1 степень - компенсированная | от 0 до 10 | от 0 до 2 |
| 2 степень - субкомпенсированная | от 10 до 100 | от 2 до 4 |
| 3 степень - декомпенсированная | от 100 до 900 | выше 4 |

Приложение 3

Литературные источники:

1. Благонравов, А. С. Проблема обеспечения безопасности новорожденных и родильниц в учреждениях Нижнего Новгорода и Нижегородской области / А. С. Благонравов, В. В. Шкарин, И. Г. Алексеева и др. // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2010. - № 5. - С. 9-14.
2. Гапон, М. Н. Показатели местной неспецифической резистентности при дисбактериозе толстого кишечника / М. Н. Гапон, Л. Н. Терновская // ЖМЭИ, 2010. - № 5. - С. 53 - 57.
3. Гапон, М. Н. Показатели иммунитета и локальной защиты у людей с дисбактериозом кишечника / М. Н. Гапон, Л. Н. Терновская, О. В. Денисенко, В. Я. Зарубинский // ЖМЭИ - 2014. - № 4. - С. 65 - 68.
4. Гапон, М. Н. Показатели местного цитокинового статуса людей с дисбактериозом толстой кишки / М. Н. Гапон, Л. Н. Терновская, О. В. Акелина, В. Я. Зарубинский // ЖМЭИ – 2014 - № 6. - С. 73 - 77.
5. Гапон, М. Н. Состояние перекисного окисления липидов в копрофильтратах беременных с нарушением микробной экологии толстой кишки / М. Н. Гапон, З. Т. Тагиров, И. А. Логинов, А. Ю. Шолуха, В. Я. Зарубинский // Обмен веществ при адаптации и повреждении. Дни молекулярной медицины на Дону. Материалы Российской научно-практической конференции с международным участием 25 мая РостГМУ 2018. - С.13 - 15.
6. Затевалов, А. М. Исследование влияния химиопрепаратов и антибиотиков на микробиоценоз кишечника мышей средствами метабономики / А. М. Затевалов, А. Ю. Миронов, Е. П. Селькова, С. С. Афанасьев, Н. С. Иконников // Воздушно-капельные инфекции: микробиология, биотехнология, иммунология, эпидемиология: сб. науч.-практических работ Всеросс. науч.-практичес. конф., посвящ. 85-летию Заслуженного деятеля науки РФ, проф., д.м.н. Е.П. Москаленко/ под общ. ред. Г. Г. Харсеевой. - Ростов-на-Дону, 2014. - С. 27 - 33.
7. Кудрявцева, Л. Г. Пейзаж и частота выделения возбудителей гнойно-септических инфекций от новорожденных в течение первого года функционирования перинатального центра / Л. Г. Кудрявцева, Н. Г. Зуева,

- В. И. Сергевнин // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2013. - № 4. - С. 61 - 64.
8. Покровский, В. И. Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и информационный материал по её положениям / В. И. Покровский, В. Г. Акимкин, Н. И. Брико и др. - Н.-Новгород: Изд. «Ремедиум Приволжье», 2012. - 84 с.
 9. Покровский, В. И. Внутрибольничные инфекции: новые горизонты профилактики / В. И. Покровский, В. Г. Акимкин, Н. И. Брико, Е. Б. Брусина и др. // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2011. - № 1. - С. 4 - 7.
 10. Рымашевский, А. Н. Особенности микробиоценозов влагалища и толстого кишечника у беременных в третьем триместре беременности / А.Н. Рымашевский, Ю. Л. Набока, Э. Г. Свирава, Л. Е. Брагина // Кубанский научный медицинский вестник. - 2011. - № 6 (129). - С.120 - 123.
 11. Семина, Н. А. Особенности эпидемиологии и эпидемического надзора за внутрибольничными инфекциями на современном этапе / Н. А. Семина, Е. П. Ковалева, В. Г. Акимкин, С. В. Сидоренко // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2006. - № 4. - С. 22 - 25.
 12. Сторожук А. П. Биологическая роль активных форм кислорода при физиологически и патологически протекающей беременности: автореф. диссер. ... доктора мед. наук / А. П. Сторожук. - Ростов-на-Дону, 2004. - 42 с.
 13. Суворов А. Н. Дисбиоз кишечника / А. Н. Суворов, Е. И. Ткаченко, Ю. П. Успенский // Руководство по диагностике и лечению, С-Пб, ИнформМед, 2013. - 269 с.