Сравнительные результаты бактериального исследования перитонеального экссудата при вторичном распространенном перитоните

Самарцев В.А.¹, Кузнецова М.П.¹, Гаврилов В.А.¹, Пушкарев Б.С.¹,
Масленникова И.Л.², Кузнецова М.В.^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 614990, г. Пермь, Российская Федерация

² Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук», 614081, г. Пермь, Российская Федерация

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ

Кузнецова Марина Павловна – ассистент кафедры общей хирургии № 1 ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России (Пермь, Российская Федерация)
E-mail: marinapk92@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-8403-4926>

Важную роль в определении тактики лечения пациентов с вторичным распространенным перитонитом играет идентификация микроорганизмов – возбудителей инфекции. Бактериологический метод исследования является «золотым стандартом» поиска этиопатогенов, однако он занимает длительное время и имеет низкую чувствительность.

Цель – изучить возможности исследования микробного состава перитонеального экссудата методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии (ГХ-МС) при вторичном распространенном перитоните в сравнении с традиционным бактериологическим исследованием.

Материал и методы. Изучены особенности микробного состава перитонеального экссудата у 42 пациентов, находившихся на лечении в хирургическом отделении ГАУЗ ПК «ГКБ № 4» (г. Пермь), в период май–декабрь 2019 г. по поводу вторичного распространенного перитонита различного генеза. Экссудаты исследованы методами бактериологического посева и ГХ-МС.

Результаты. По данным бактериологического исследования положительными были 24 (57,14%) пробы перитонеального экссудата. Всего идентифицировано 33 бактериальные культуры, наиболее распространенными были энтеробактерии (23; 69,69%), неферментирующие грамотрицательные бактерии (6; 18,18%). По данным ГХ-МС, во всех исследованных экссудатах детектированы следы присутствия микроорганизмов. Анализ видового состава позволил определить представителей 24 родов, относящихся к 4 крупным филумам: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Bacteroidetes*. Большинство из них являлись минорными ассоциантами полимикробного консорциума.

Заключение. Диагностика этиопатогенов осложненной абдоминальной хирургической инфекции методом ГХ-МС более быстрая, чувствительная и универсальная. Недостатки метода – невозможность дифференцировать живые и нежизнеспособные микроорганизмы, оценить их антибиотикочувствительность.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Самарцев В.А., Кузнецова М.П., Гаврилов В.А., Пушкарев Б.С., Масленникова И.Л., Кузнецова М.В. Сравнительные результаты бактериального исследования перитонеального экссудата при вторичном распространенном перитоните // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского. 2021. Т. 9, № 4. С. 111–117. DOI: <https://doi.org/10.33029/2308-1198-2021-9-4-111-117>

Статья поступила в редакцию 03.10.2021. Принята в печать 01.12.2021.

Ключевые слова:

вторичный перитонит, распространенный перитонит, микроорганизмы, бактериологическое исследование, газовая хроматография – масс-спектрометрия

Comparative results of bacterial study of peritoneal exudate in secondary generalized peritonitis

CORRESPONDENCE

Marina P. Kuznetsova – Assistant of the Department of General Surgery # 1, Perm State Medical University named after E.A. Wagner (Perm, Russian Federation)
E-mail: marinapk92@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0001-8403-4926>

Samartcev V.A.¹, Kuznetsova M.P.¹, Gavrilov V.A.¹, Pushkarev B.S.¹, Maslennikova I.L.², Kuznetsova M.V.^{1,2}

¹ Perm State Medical University named after E.A. Wagner, 614990, Perm, Russian Federation

² Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch Russian Academy of Sciences, 614081, Perm, Russian Federation

Keywords:

secondary peritonitis, generalized peritonitis, microorganisms, bacteriological examination, gas chromatography – mass spectrometry

An important role in determining the tactics of treatment in patients with secondary generalized peritonitis plays identification of microorganisms – infectious agents. The bacteriological method is the “gold standard” for identification of etiopathogens, but it takes a long time and has a low sensitivity.

The aim – to study possibilities to detect microbial composition of peritoneal exudate by gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) in secondary generalized peritonitis in comparison with traditional bacteriological research.

Material and methods. We studied the features of the microbial composition of peritoneal exudate in 42 patients who were treated in the surgical department of Clinical Hospital № 4 (Perm), in the period from May to December 2019 for secondary generalized peritonitis of various origins. Exudates were studied by bacteriological method and GC–MS.

Results. According to the bacteriological study, 24 (57.14%) samples of peritoneal exudate were positive. In total, 33 bacterial cultures were identified, the most common were enterobacteria (23; 69.69%), non-fermenting gram-negative bacteria (6; 18.18%). According to GC–MS, traces of the presence of microorganisms were detected in all investigated exudates. The analysis of the species composition made it possible to identify representatives of 24 species belonging to 4 large phyla: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*. Most of them were minor associates of the polymicrobial consortium.

Conclusion. Etiopathogens diagnosis of complicated abdominal surgical infection by GC-MS is faster, more sensitive and versatile. The disadvantages of the method are inability to differentiate between living and non-viable microorganisms, to assess their antibiotic sensitivity.

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

For citation: Samartcev V.A., Kuznetsova M.P., Gavrilov V.A., Pushkarev B.S., Maslennikova I.L., Kuznetsova M.V. Comparative results of bacterial study of peritoneal exudate in secondary generalized peritonitis. Clinical and Experimental Surgery. Petrovsky Journal. 2021; 9 (4): 111–7. DOI: <https://doi.org/10.33029/2308-1198-2021-9-4-111-117> (in Russian)

Received 03.10.2021. **Accepted** 01.12.2021.

Вторичный распространенный перитонит (ВРП) представляет собой осложнение острых хирургических заболеваний органов брюшной полости и развивается в результате деструкции или перфорации различных отделов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) либо в послеоперационном периоде в результате несостоятельности анастомозов [1]. Во всем мире ВРП признан наиболее частой формой осложненной интраабдоминальной инфекции [2].

По данным современных клинических рекомендаций по лечению осложненных интраабдоминальных инфекций, одним из ключевых факторов успешного лечения ВРП, помимо своевременного и

эффективного оперативного вмешательства, является адекватная антибактериальная терапия с учетом идентифицированного этиопатогена [3].

В настоящее время бактериологический метод является «золотым стандартом» в лабораторной диагностике большинства инфекционных заболеваний и их осложнений. Однако традиционное выделение из клинического материала чистой культуры этиопатогена и его последующая идентификация, как правило, занимают несколько дней. Кроме того, метод имеет низкую чувствительность [4]. Современные молекулярные методы, в частности газовая хроматография – масс-спектрометрия (ГХ-МС), основаны на выделении и анализе нукле-

Таблица 1. Перечень нозологических форм заболеваний, идентифицированных как источник вторичного распространенного перитонита ($n=42$)

Нозологические формы заболеваний	Число случаев, n (%)
Острый аппендицит	16 (38,10)
Перфоративная язва желудка, луковицы двенадцатиперстной кишки	13 (30,95)
Острая перфоративная язва тощей, подвздошной кишки	4 (9,53)
Дивертикулит сигмовидной кишки с перфорацией	3 (7,14)
Злокачественное новообразование ободочной кишки с перфорацией	2 (4,76)
Острый деструктивный калькулезный холецистит	2 (4,76)
Несостоятельность билиодигестивного анастомоза	2 (4,76)

иновых кислот (в основном ДНК) или маркеров клеточной стенки (жирных кислот, альдегидов, спиртов и т.д.) из различных образцов патологического материала пациентов без культивирования микроорганизмов [5–7]. Подобный подход отличает быстрота и точность детекции возбудителей, что может способствовать ранней диагностике и оптимизации тактики лечения ВРП различного генеза. Сегодня метод ГХ-МС рутинно в диагностике интраабдоминальной инфекции не применяется.

Цель исследования – изучить возможности исследования микробного состава перитонеального экссудата методом ГХ-МС при ВРП в сравнении с традиционным бактериологическим исследованием.

Материал и методы

Проведено исследование экссудата брюшной полости пациентов с ВРП различного генеза ($n=42$), находившихся на лечении в хирургическом отделении ГАУЗ ПК «ГКБ № 4» (г. Пермь) с мая по декабрь 2019 г., методами прямого посева и ГХ-МС.

Группа имела следующие гендерные характеристики: 23 (54,76%) мужчины, 19 (45,24%) женщин. Возраст пациентов варьировал от 15 до 87 лет, медиана составила 50,00 (35,00; 69,75) лет. Медиана обращения пациентов от начала заболевания до оперативного вмешательства составила 24,00 (15,75; 48,00) ч. Перечень нозологических форм заболеваний, идентифицированных как источник вторичного распространенного перитонита, представлен в табл. 1.

После установления диагноза все пациенты были оперированы в экстренном порядке в объеме идентификации и контроля источника ВРП, санации и дренирования брюшной полости. Спектр оперативных вмешательств представлен в табл. 2.

Этапу эвакуации экссудата из брюшной полости предшествовал забор его проб одновременно двумя способами – стерильным тампоном в пробирку с транспортной питательной средой для дальнейшего бактериологического исследования и стерильным шприцем в пробирку эппендорф для последующего исследования методом ГХ-МС. Идентификацию выделенных микроорганизмов бактериологическим методом осуществляли согласно приказу МЗ СССР № 535 от 22.04.1985, исследование проб экссудата методом ГХ-МС осуществляли по Н.В. Верховцевой, Г.А. Осипову [8], с использованием системы Agilent 6890/5973N (Agilent, США).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Jamovi (версия 1.6.23). Полученные количественные данные были проверены на нормальность распределения при помощи критерия Шапиро–Уилка. При отсутствии нормального распределения количественные данные описывали при помощи медианы, 1-го и 3-го квартилей. Номинальные данные описывали путем расчета абсолютных значений и процентных долей. Для оценки различий состава перитонеального экссудата у пациентов различного пола и возраста анализ проведен методом ординаций при помощи многомерного неметрического шкалирования.

Таблица 2. Спектр оперативных вмешательств у пациентов с вторичным распространенным перитонитом ($n=42$)

Вид оперативного вмешательства	Число случаев, n (%)
Аппендэктомия	16 (38,10)
Ушивание перфорации желудка/луковицы двенадцатиперстной кишки	11 (26,19)
Обструктивная резекция ободочной кишки	5 (11,90)
Ушивание язвы тощей/подвздошной кишки	3 (7,15)
Резекция желудка по Бильрот-2	2 (4,76)
Холецистэктомия	2 (4,76)
Ушивание анастомоза	2 (4,76)
Резекция тощей/подвздошной кишки	1 (2,38)

Рис. 1. Таксономический состав микробиоты, представленной в экссудатах пациентов с вторичным распространенным перитонитом, по данным газовой хроматографии – масс-спектрометрии

Fig. 1. Taxonomic composition of microbiota presented in exudates of patients with secondary generalized peritonitis, according to the method of gas chromatography-mass spectrometry

Результаты

По данным бактериологического исследования из 42 клинических проб экссудата брюшной полости с положительным высевом были 24 (57,14%). В моноварианте возбудитель был обнаружен в 16 пробах, в ассоциации – в 8 пробах. При этом 2-вариантные ассоциации встречались в 7 случаях, 3-вариантные – только в 1 случае. Всего было идентифицировано 33 бактериальные культуры, представленные следующими микроорганизмами: *E. coli* – 12 (57,14%), *Proteus spp.* – 6 (18,18%), *K. pneumoniae* – 5 (15,15%), *P. aeruginosa* – 4 (12,12%), *Candida spp.* – 3 (9,10%), *A. baumannii* – 2 (6,06%), *S. epidermidis* – 1 (3,03%). Таким образом, доля энтеробактерий составила 23 (69,69%), неферментирующих грамотрицательных бактерий – 6 (18,18%).

По данным ГХ-МС, в отличие от метода прямого посева, во всех исследованных экссудатах детектированы следы присутствия микроорганизмов. Концентрация микробных маркеров, а следовательно, и соответствующее им общее количество микроорганизмов колебались в пределах от $E+01$

до $E+10$ клеток/мл, медиана составила $3,30E+08$ ($1,32E+07$; $1,53E+09$) клеток/мл. Анализ видового состава позволил определить представителей 24 родов, относящихся к 4 крупным филумам: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* и *Bacteroidetes* (рис. 1). Большинство из них являлись минорными ассоциантами полимикробного консорциума. Среди актинобактерий (35,70% всех выявленных микроорганизмов) преобладали представители родов *Propionibacterium*, *Rhodococcus* и *Actinomyces*, их доля составила почти 80% в данном филуме. Наиболее многочисленная группа фирмикутов (37,40%) имела и самый разнообразный видовой состав. В перитонеальных экссудатах пациентов детектированы различные виды бацилл (*Bacillus cereus*, *B. megaterium*), клостридий (*Clostridium histolyticum*, *C. propionicum*, *C. ramosum*, *C. difficile* и *C. perfringens*) и зубактерий (*Eubacterium bifforme*, *E. cylindroides*, *E. hadrum*, *E. lentum* и *E. ventriosum*). Протеобактерии (26,55%) были представлены только γ - и ϵ -подгруппами: *Moraxella spp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Helicobacter pylori*, *Campylobacter mucosalis* соответственно.

Анализ результатов ГХ-МС методом ординаций с помощью неметрического шкалирования показал, что численность и состав микробиоты перитонеального экссудата пациентов не зависели от пола и возраста (рис. 2).

Обсуждение

В представленных в литературе исследованиях, посвященных изучению этиологии ВРП, при использовании бактериологического метода отмечен широкий диапазон уровня положительных высево́в возбудителей: от 24 до 93%. Это объясняется различными методами и техниками, используемыми для сбора и передачи образцов, а также способами выделения чистых культур [9, 10]. По данным Y. Moenadjat и соавт. (2016), процент положительных высево́в из перитонеального экссудата пациентов с абдоминальной инфекцией в 6 хирургических центрах Индонезии варьировал от 43 до 59% [11]. Доля положительных результатов бактериологического исследования экссудатов при ВРП, вызванном перфорацией червеобразного отростка или дивертикулов ободочной кишки, была несколько выше, чем при других патологиях, – 69–74% [12, 13]. В нашем исследовании в общей выборке количество положительных проб составило 57,14%.

Известно, что ВРП характеризуется полимикробной этиологией. Бактериологическим методом из экссудата пациента выделяют от 4,5 до 9 возбудителей. Процент встречаемости монови́довых культур и ассоциаций в материале приблизительно равный [14]. С.В. Кемеров и соавт. (2016) проанализировали в динамике микробиоту экссудатов пациентов с ВРП; полученные данные свидетельствуют, что рост монокультуры наблюдался в 78% случаев в 2005 г. и в 75% в 2015 г. [15]. Еще более низкая доля смешанных культур в перитонеальном экссудате при перитонитах показана F. Zhou и соавт. [6]. По нашим данным, у пациентов с ВРП в большинстве проб, проанализированных бактериологическим методом, определялись монокультуры микроорганиз-

Рис. 2. Ординационные диаграммы микробного состава экссудата в зависимости от: А – пола пациентов (мужчины – синие точки, женщины – красные точки); Б – возраста пациентов (до 50 лет – зеленые точки, >50 лет – красные точки)

Fig. 2. Ordination diagrams of the microbial composition of exudate depending on: А – gender of patients (men – blue points, women – red points); Б – age of patients (up to 50 years old – green points, more than 50 years old – red points)

мов, тем не менее более трети положительных высево́в имели полимикробный спектр возбудителей.

Согласно результатам детекции микробных маркеров с помощью масс-спектрометрии, представительство бактерий в экссудатах пациентов с ВРП оказалось существенно выше, чем число клеток, полученных с помощью метода прямого посева. Указанный факт объясняется тем, что в последнем случае выделяются только жизнеспособные клетки микроорганизмов, при этом большая часть представителей кишечной микробиоты гибнет в нетипичных условиях, а также тем, что некоторые микроорганизмы не могут быть выделены традиционными бактериологическими методами, т.е. попросту не учитываются в большинстве клинических исследований [4].

Заключение

Бактериологический метод идентификации возбудителей ВРП, помимо явных преимуществ (простота выполнения, доступность используемых средств, экономичность), имеет ряд недостатков, связанных с длительностью исследования, а также с отсутствием универсальной питательной среды для всех микроорганизмов, представленных в пробе экссудата. Диагностика этиопатогенов осложненной абдоминальной хирургической инфекции методом ГХ-МС более быстрая, чувствительная и универсальная, а также эффективная для индикации аэробных и анаэробных микроорганизмов. Невозможность дифференцировать живые и нежизнеспособные микроорганизмы, а также оценить их антибиотикочувствительность являются существенными недостатками метода и ограничивают его широкое применение для идентификации возбудителей ВРП.

Благодарности. Авторы выражают благодарность кандидату геолого-минералогических наук, руководителю группы физико-химических исследований М.А. Шишкину и инженеру Н.П. Шерстобитовой за проведение анализа ГХ-МС.

Литература

1. Calandra T., Cohen J. The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit // *Crit. Care Med.* 2005. Vol. 33, N 7. P. 1538–1548. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000168253.91200.83>
2. Sartelli M. A focus on intra-abdominal infections // *World J. Emerg. Surg.* 2010. Vol. 5, N 1. P. 1–20. DOI: <https://doi.org/10.1186/1749-7922-5-9>
3. Sartelli M., Chichom-Mefire A., Labricciosa F.M., Hardcastle T., Abu-Zidan F.M., Adesunkanmi A.K. et al. The management of intra-abdominal infections from a global perspective: 2017 WSES guidelines for management of intra-abdominal infections // *World J. Emerg. Surg.* 2017. Vol. 12, N 29. P. 1–34. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13017-017-0141-6>
4. She R.C., Romney M.G., Jang W., Walker T., Karichu J.K., Richter S.S. Performance of the BacT/Alert Virtuo Microbial Detection System for the culture of sterile body fluids: prospective multicentre study // *Clin. Microbiol. Infect.* 2018. Vol. 24, N 9. P. 992–996. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.011>
5. Федосова Н.Ф., Лядов К.В., Осипов Г.А. Новые подходы к анализу инфекционных послеоперационных и посттравматических осложнений // *Инфекции в хирургии.* 2010. Т. 8, № 2. С. 56–62.
6. Zhou F., Sun S., Sun X., Chen Y., Yang X. Rapid and sensitive identification of pleural and peritoneal infections by droplet digital PCR // *Folia Microbiol.* 2021. Vol. 66. P. 213–219. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00834-0>
7. Hardick J., Won H., Jeng K., Hsieh Y.-H., Gaydos C.A., Rothman R.E. et al. Identification of bacterial pathogens in ascitic fluids from patients with suspected spontaneous bacterial peritonitis by use of broad-range PCR (16S PCR) coupled with high-resolution melt analysis // *J. Clin. Microbiol.* 2012. Vol. 50, N 7. P. 2428–2432. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.00345-12>
8. Верховцева Н.В., Осипов Г.А. Метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии в изучении микробных сообществ почв агроценоза // *Проблемы агрохимии и экологии.* 2008. № 1. С. 51–54.
9. Gladman M.A., Knowles C.H., Gladman L.J., Payne J.G. Intra-operative culture in appendicitis: traditional practice challenged // *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* 2004. Vol. 86, N 3. P. 196–201. DOI: <https://doi.org/10.1308/003588404323043346>
10. Maltezou H.C., Nikolaidis P., Lebesii E., Dimitriou L., Androulakis E., Kafetzis D.A. Piperacillin/Tazobactam versus cefotaxime plus metronidazole for treatment of children with intra-abdominal infections requiring surgery // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2001. Vol. 20, N 9. P. 643–646. DOI: <https://doi.org/10.1007/s100960100581>
11. Moenadjat Y., Lalisang T.J., Saunar R.S., Usman N., Handaya A.Y., Iswanto J. et al. Epidemiology of microorganisms in intraabdominal infection/complicated intraabdominal infections in six centers of surgical care in Indonesia: a preliminary study // *N. Ropanasuri J. Surg.* 2017. Vol. 2, N 2. P. 46–53. DOI: <https://doi.org/10.7454/nrjs.v2i2.35>
12. Jang J.Y., Lee S.H., Shim H., Choi J.Y., Yong D., Lee J.G. Epidemiology and microbiology of secondary peritonitis caused by viscus perforation: a single-center retrospective study // *Surg. Infect.* 2015. Vol. 16, N 4. P. 436–442. DOI: <https://doi.org/10.1089/sur.2014.148>
13. Boueil A., Guégan H., Colot J., D'Ortenzio E., Guerrier G. Peritoneal fluid culture and antibiotic treatment in patients with perforated appendicitis in a Pacific Island // *Asian J. Surg.* 2015. Vol. 38, N 4. P. 242–246. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2015.03.005>
14. Obinwa O., Casidy M., Flynn J. The microbiology of bacterial peritonitis due to appendicitis in children // *Ir. J. Med. Sci.* 2014. Vol. 183, N 4. P. 585–591. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11845-013-1055-2>
15. Кемеров С.В., Доржиева Т.С., Степин Д.А., Кемерова З.С. Исследование микробного пейзажа перитонеального экссудата при остром распространенном перитоните // *Казанский медицинский журнал.* 2016. Т. 97, № 5. С. 806–811.

References

1. Calandra T., Cohen J. The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. *Crit. Care Med.* 2005; 33 (7): 1538–48. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000168253.91200.83>
2. Sartelli M. A focus on intra-abdominal infections. *World J Emerg Surg.* 2010; 5 (1): 1–20. DOI: <https://doi.org/10.1186/1749-7922-5-9>
3. Sartelli M., Chichom-Mefire A., Labricciosa F.M., Hardcastle T., Abu-Zidan F.M., Adesunkanmi A.K., et al. The management of intra-abdominal infections from a global perspective: 2017 WSES guidelines for management of intra-abdominal infections. *World J Emerg Surg.* 2017; 12 (29): 1–34. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13017-017-0141-6>
4. She R.C., Romney M.G., Jang W., Walker T., Karichu J.K., Richter S.S. Performance of the BacT/Alert Virtuo Microbial Detection System for the culture of sterile body fluids: prospective multicentre study. *Clin Microbiol Infect.* 2018; 24 (9): 992–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.12.011>
5. Fedosova N.F., Lyadov K.V., Osipov G.A. New approaches to the analysis of infectious postoperative and

post-traumatic complications // *Infections in surgery*. 2010; 8 (2): 56–62.

6. Zhou F., Sun S., Sun X., Chen Y., Yang X. Rapid and sensitive identification of pleural and peritoneal infections by droplet digital PCR. *Folia Microbiol*. 2021; 66: 213–9. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00834-0>

7. Hardick J., Won H., Jeng K., Hsieh Y.-H., Gaydos C.A., Rothman R.E., et al. Identification of bacterial pathogens in ascitic fluids from patients with suspected spontaneous bacterial peritonitis by use of broad-range PCR (16S PCR) coupled with high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (7): 2428–32. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.00345-12>

8. Verkhovtseva N.V., Osipov G.A. Method of the gas-chromatography-mass-spectrometry in studying of the soil microbial communities. *Problemy agrokhimii i ekologii* [Problems of Agrochemistry and Ecology]. 2008; (1): 51–4. (in Russian)

9. Gladman M.A., Knowles C.H., Gladman L.J., Payne J.G. Intra-operative culture in appendicitis: traditional practice challenged. *Ann R Coll Surg Engl*. 2004; 86 (3): 196–201. DOI: <https://doi.org/10.1308/003588404323043346>

10. Maltezou H.C., Nikolaidis P., Lebesii E., Dimitriou L., Androulakakis E., Kafetzis D.A. Piperacillin/Tazobactam versus cefotaxime plus metronidazole for treatment of children with intra-abdominal infections requiring surgery. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001; 20 (9): 643–6. DOI: <https://doi.org/10.1007/s100960100581>

11. Moenadjat Y., Lalisang T.J., Saunar R.S., Usman N., Handaya A.Y., Iswanto J., et al. Epidemiology of microorganisms in intraabdominal infection/complicated intraabdominal infections in six centers of surgical care in Indonesia: a preliminary study. *N Ropanasuri J Surg*. 2017; 2 (2): 46–53. DOI: <https://doi.org/10.7454/nrjs.v2i2.35>

12. Jang J.Y., Lee S.H., Shim H., Choi J.Y., Yong D., Lee J.G. Epidemiology and microbiology of secondary peritonitis caused by viscus perforation: a single-center retrospective study. *Surg Infect*. 2015; 16 (4): 436–42. DOI: <https://doi.org/10.1089/sur.2014.148>

13. Boueil A., Guégan H., Colot J., D'Ortenzio E., Guerrier G. Peritoneal fluid culture and antibiotic treatment in patients with perforated appendicitis in a Pacific Island. *Asian J Surg*. 2015; 38 (4): 242–6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.asjsur.2015.03.005>

14. Obinwa O., Casidy M., Flynn J. The microbiology of bacterial peritonitis due to appendicitis in children. *Ir J Med Sci*. 2014; 183 (4): 585–91. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11845-013-1055-2>

15. Kemerov S.V., Dorzhieva T.S., Stepin D.A., Kemerova Z.S. Studying the microbial landscape of peritoneal exudate in acute diffuse purulent peritonitis. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal* [Kazan Medical Journal]. 2016; 97 (5): 806–11. (in Russian)