

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**



**МЕТОД МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ**

(инструкция по применению)

**Учреждение-разработчик:**

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»

**Авторы:** д.м.н., доцент Рожко А.В., к.м.н., доцент Ю.И. Ярец,  
к.б.н., доцент Н.И. Шевченко.

Гомель, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич  
30.06.2016

Регистрационный № 211-1215

**МЕТОД МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОЙ РАНЕВОЙ ИНФЕКЦИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Республиканский научно-практический  
центр радиационной медицины и экологии человека»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, доц. А.В. Рожко, канд. мед. наук, доц. Ю.И. Ярец,  
канд. биол. наук, доц. Н.И. Шевченко

Гомель 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод микробиологической диагностики посттравматической раневой инфекции, вызванной бактериями-продуцентами биопленки. Метод позволяет установить стадию развития раневой инфекции, а в дальнейшем — обосновать тактику лечения, в частности определить необходимость назначения антисептиков для промывания раны, методов дебридмента, системной антибактериальной терапии.

Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей лабораторной диагностики, врачей-бактериологов, врачей-хирургов, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с посттравматической раневой инфекцией.

Известно, что 99% бактерий обладают способностью формировать биопленку путем создания слизистого полимерного слоя. Это обеспечивает резистентность бактерий к антибактериальным лекарственным средствам (антисептикам, антибиотикам), клеточным и гуморальным факторам иммунной защиты, а также обуславливает особенности патогенеза инфекции, вызванной бактерией-продуцентом биопленки.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

### **1. Стандартное оборудование, расходные материалы:**

- чашки Петри одноразовые пластиковые или многоразовые стеклянные;
- питательные среды, используемые для выделения и идентификации бактерий в процессе микробиологического исследования;
- среда обогащения — триптиказо-соевый бульон, содержащая 0,25 % глюкозы;
- среда «агар Мюллер–Хинтон»;
- консервирующая среда, содержащая 10–15 % глицерина в триптиказо-соевом бульоне;
- спиртовые горелки для микробиологических исследований, бактериологические петли, пробирки стеклянные, ватно-марлевые пробки;
- пробирки стеклянные со скошенным триптиказо-соевым агаром;
- холодильник бытовой;
- термостат;
- морозильная камера, обеспечивающая замораживание при  $-70^{\circ}\text{C}$ ;
- денситометр (спектрофотометр) для определения оптической плотности суспензии микроорганизмов.

### **2. Дополнительное оборудование и реактивы:**

- оптически чистые плоскодонные 96-луночные пластиковые иммунологические планшеты;
- микропланшетный спектрофотометр;
- дозаторы одноканальные переменного объема;
- дозаторы многоканальные (8-канальные) для иммунологических планшетов;
- пробирки центрифужные;
- 0,1 % водный раствор генцианвиолета;

- 1 % водный раствор Congo red;
- 10 мМ фосфатный буфер (рН = 7,2);
- спирт 96° этиловый.

### 3. Материал для исследования:

- клинические штаммы бактерии (выделенные от пациента с раневым повреждением), предварительно выращенные в виде изолированных колоний чистой культуры на поверхности соответствующей плотной питательной среды, а также идентифицированные стандартными микробиологическими методами;

- замороженные клинические штаммы бактерий, находящиеся в консервирующей среде (10–15 % глицерина в триптиказо-соевом бульоне) в условиях морозильной камеры при -70°С. Штаммы должны быть предварительно разморожены при комнатной температуре, субкультивированы в среде обогащения (5 мл триптиказо-соевого бульона, содержащего 0,25 % глюкозы) и выращены на поверхности плотной питательной среды «агар Мюллер–Хинтон».

### **Ограничения метода**

1. Метод может быть выполнен только на базе микробиологической лаборатории, работающей с бактериями III и IV группы патогенности.

2. Лимитированное количество нутриентов питательной среды, находящейся в лунке иммунологического планшета и небольшой размер лунки, не дает возможности контролировать рост биопленки в период времени, превышающий 48 ч.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Посттравматическая раневая инфекция, не классифицированная в других рубриках (Т79.3), термические и химические ожоги (Т20-Т32), травмы от воздействия внешних причин (S00-T00-14), хронические язвы кожи (L98.4), нижних конечностей (L97).

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

Постановка микробиологического метода определения способности бактерий формировать биопленку.

Приготовление инокулюма

1. Для приготовления инокулюма отбирают однотипные, четко изолированные колонии чистой культуры бактерий. Бактериологической петлей переносят незначительное количество материала с верхушек колоний в пробирку с 5 мл стерильной среды обогащения (триптиказо-соевый бульон, содержащий 0,25 % глюкозы).

2. Используя спектрофотометр (денситометр), доводят оптическую плотность инокулюма точно до 0,5 по стандарту МакФарланда. Количество бактерий в инокулюме соответствует  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Инокулюм необходимо использовать в течение 15 мин после приготовления.

## Инокуляция и инкубация

Способность штамма бактерии формировать биопленку исследуют в динамике с оценкой результатов через определенные временные периоды — 2; 4; 6; 18; 24; 48 ч. В связи с этим для анализа необходимы 6 иммунологических планшетов – по одному для каждого временного промежутка:

1. Полученный инокулюм делят на 2 части.
2. Суспензию штамма из первой части инокулируют в первую лунку стерильного плоскодонного пластикового иммунологического планшета в количестве 100 мкл.
3. В суспензию штамма из второй части добавляют 50 мкл 1 % водного раствора Congo Red и инокулируют во вторую лунку этого же пластикового планшета в количестве 100 мкл.
4. В третью лунку, которая служит контролем (контроль №1), вносят 100 мкл стерильной среды обогащения (триптиказо-соевый бульон, содержащий 0,25 % глюкозы).
5. В 2,5 мл стерильной среды обогащения (триптиказо-соевый бульон, содержащий 0,25 % глюкозы) вносят 50 мкл 1 % водного раствора Congo Red. Из полученной смеси берут 100 мкл и вносят в четвертую лунку планшета (контроль № 2).
6. Берут остальные 5 чистых планшетов и повторяют действия, указанные в пп. 2–5.
7. Планшеты накрывают крышками во избежание высыхания инокулюмов и помещают в термостат при температуре +37°C.
8. После окончания каждого срока инкубации, т. е. через 2; 4; 6; 18; 24; 48 ч инокулюм из всех лунок соответствующего планшета удаляют пипетированием.
9. Каждую лунку планшета 3-кратно промывают 10 мМ фосфатным буферным раствором (рН = 7,2). Для удобства можно использовать 8-канальный дозатор.
10. Действия для инокулюма из первой части (см. пп. 2, 4):
  - в первую лунку для детекции накопления биомассы биопленки добавляют 50 мкл 0,1 %-го раствора генцианвиолета и оставляют при комнатной температуре в течение 10 мин для окраски. Те же действия производят для лунки контроля № 1;
  - через 10 мин несвязавшийся краситель из первой лунки и лунки контроля № 1 удаляют путем однократной отмывки 10 мМ фосфатным буфером;
  - в первую лунку и в лунку контроля № 1 добавляют 200 мкл 95 % этанола для экстракции связавшегося красителя.
11. Действия для инокулюма из второй части (см. пп. 3, 5):
  - во вторую лунку добавляют 200 мкл 95 % этанола для экстракции связавшегося красителя Congo Red в процессе инкубации. Те же действия повторяют для лунки контроля № 2.

### Детекция результатов:

1. 125 мкл раствора генцианвиолет/этанол из первой лунки (соответствует первой части инокулюма) переносят в оптически чистую лунку;

2. 125 мкл раствора из лунки контроля № 1 переносят в оптически чистую лунку.

3. 125 мкл раствора Congo Red/этанол из второй лунки (соответствует второй части инокулюма) переносят в оптически чистую лунку.

4. 125 мкл раствора из лунки контроля № 2 переносят в оптически чистую лунку.

5. Проводят количественную оценку полученных спиртовых экстрактов на микропланшетном спектрофотометре. Оптическую плотность раствора генцианвиолет/этанол определяют при длине волны 540 нм, оптическую плотность раствора Congo Red/этанол — 490 нм.

6. Результат выражают в единицах оптической плотности.

Интерпретация результатов

При интерпретации полученных результатов необходимо учитывать способность проанализированных штаммов бактерий накапливать основное вещество биопленки и образовывать биомассу. Для оценки динамики формирования биопленки результаты оцениваются для каждого из временных интервалов — после 2; 4; 6; 18; 24; 48 ч инкубации. Для удобства оценки можно пользоваться таблицей 1.

Таблица 1. — Интерпретация результатов определения оптической плотности

Значение оптической плотности	Накопление основного вещества биопленки	Образование биомассы биопленки
$\leq OD_k$	Отсутствует	Отсутствует
$OD_k < OD_o \leq 2 \times OD_k$	Низкая	Низкая
$2 \times OD_k < OD_o \leq 4 \times OD_k$	Умеренная	Умеренная
$> 4 \times OD_k$	Выраженная	Выраженная

Примечание —  $OD_k$  — оптическая плотность контроля (№№ 1 и 2),  $OD_o$  — оптическая плотность исследуемого (опытного) образца. Для экстрактов генцианвиолет/этанол, используемых для оценки биомассы биопленки,  $OD_k$  рассчитывают по формуле:  $OD_k = OD_{\text{контроля № 1}} + 3 \times SD_{\text{контроля № 1}}$ , где  $SD$  — стандартное отклонение. Для экстрактов Congo red/этанол, используемых для оценки основного вещества биопленки,  $OD_k$  рассчитывают по формуле:  $OD_k = OD_{\text{контроля № 2}} + 3 \times SD_{\text{контроля № 2}}$ .

Раневая инфекция, вызванная бактериями-продуцентами биопленки, является характерной чертой длительно незаживающих ран различной этиологии. Персистирующая инфекция за счет низкой метаболической активности бактерий, находящихся в составе биопленки, вызывает неэффективный иммунный ответ. Это, в свою очередь, сопровождается слабовыраженной пролонгированной воспалительной реакцией со стороны раны. В связи с этим клиническая оценка состояния раневой инфекции в длительно незаживающих ранах представляет трудности. При этом результаты клинической оценки раневой инфекции не всегда связаны с качественными и количественными результатами микробиологического посева образцов из ран. В связи с тем, что классическое бактериологическое исследование не предназначено для анализа формирования биопленки, в практике

часто приходится сталкиваться с такой проблемой, как расхождение результатов бактериологического посева и эффективности проводимой антибактериальной терапии.

На основании результатов определения способности бактерий, выделенных из длительно незаживающих ран, формировать биопленку делается заключение о наличии раневой инфекции (рана является критически колонизированной или инфицированной) или ее отсутствии (рана является колонизированной) (таблица 2).

Таблица 2. — Диагностика состояния раневой инфекции на основании результатов определения способности бактерий формировать биопленку

Способность к накоплению биомассы биопленки через 24 ч инкубации	Способность к накоплению основного вещества биопленки через 24 ч инкубации	Интерпретация
Отсутствует или низкая	Умеренная или выраженная	Рана является колонизированной: <i>в ране присутствуют бактерии без активной репликации</i>
Умеренная или выраженная	Отсутствует или низкая	Рана является критически колонизированной или инфицированной: <i>активное размножение бактерий в ране приводит к задержке заживления и развитию местной воспалительной реакции</i>

## ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Осложнений нет. Ошибки могут быть связаны с нарушением технологии выполнения анализа.

### Пути устранения:

1. Контроль чистоты анализируемой культуры бактерий, последовательности операций и аккуратное выполнение анализа является обязательным.

2. Использование реагентов с истекшим сроком годности запрещено.

Клинические изоляты бактерий в лаборатории должны исследоваться таким образом, чтобы возможность контаминации культуры отсутствовала. Для продолжительного хранения штаммов и создания архива готовят суспензию бактерий в стабилизирующем растворе (консервирующей среде) — 10–15 %

глицерина в триптиказо-соевом бульоне и хранят в замороженном состоянии при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  и ниже в морозильной камере.

Для непродолжительного хранения штаммов их выращивают в пробирке со скошенным триптиказо-соевым агаром и хранят в холодильнике при температуре от  $+2^{\circ}\text{C}$  до  $+8^{\circ}\text{C}$ , субкультивируя еженедельно.

Контроль качества проводимых лабораторных исследований осуществляется согласно приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 873 от 10.09.2009 «Об утверждении инструкций по контролю качества клинических лабораторных исследований».

При выполнении исследований необходимо соблюдать меры безопасности согласно действующим приказам Министерства здравоохранения Республики Беларусь, санитарным правилам (СП 17-129-РБ 2000 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и гельминтами»), инструкциям по охране труда для клинико-диагностических лабораторий, а также эксплуатации медицинских измерительных приборов, разработанных и утвержденных в учреждениях.

УТВЕРЖДАЮ  
Руководитель организации

\_\_\_\_\_  
(подпись)

\_\_\_\_\_  
(инициалы, фамилия)

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

## АКТ

### о практическом использовании результатов исследования

В \_\_\_\_\_  
(сфера, в которой нашли практическое применение результаты исследования\*)

Комиссия в составе \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ настоящим подтверждает, что

\_\_\_\_\_  
(название структурного подразделения организации)

*проведено опытно-промышленное испытание (осуществлено внедрение в технологический процесс, в учебный процесс и др. \*\*)*

\_\_\_\_\_  
(указываются конкретные научные результаты, которые нашли применение)

полученных \_\_\_\_\_

(фамилия, имя, отчество автора (авторов) исследования)

при выполнении программы (проекта, темы НИР\*\*) \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(название программы, проекта, темы НИР\*\*)

для \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(указываются решаемые практические задачи)

на основании чего \_\_\_\_\_

(приводятся конкретные результаты практического использования)

Экономический эффект от использования результатов составил \_\_\_\_\_

(расчет прилагается)\*\*\*.

Члены комиссии:

\_\_\_\_\_  
(подпись)

\_\_\_\_\_  
(инициалы, фамилия)

\_\_\_\_\_  
(дата)