

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°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 (pH = 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°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)