

# **МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2016 г.

Регистрационный № 211-1215

## **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

В настоящей инструкции по применению 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, использования 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), к клеточным и гуморальным факторам иммунной защиты, а также обуславливает особенности патогенеза инфекции, вызванной бактерией-продуцентом биопленки.

### **Показания к применению**

Посттравматическая раневая инфекция, не классифицированная в других рубриках (T79.3), термические и химические ожоги (T20-T32), травмы от воздействия внешних причин (S00-T00-14), хронические язвы кожи (L98.4), нижних конечностей (L97).

### **Противопоказания для применения:**

Противопоказаний нет.

### **Перечень необходимых медицинских изделий, расходных материалов и т.д.:**

1. Стандартное оборудование, расходные материалы:
  - чашки Петри одноразовые пластиковые или многоразовые стеклянные;
  - питательные среды, используемые для выделения и идентификации бактерий в процессе проведения 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 планшетоов;
- пробирки центрифужные;
- 0,1% водный раствор генцианвиолета;
- 1% водный раствор Congo red;
- 10мМ фосфатный буфер (рН 7,2);
- 96° этиловый спирт.

## 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°C. 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, работающих 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 часов.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА С УКАЗАНИЕМ ЭТАПОВ

Постановка микробиологического метода определения способности бактерий формировать биопленку:

### 1. Приготовление инокулюма:

1.1. 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 (среда триптиказо-соевый бульон, содержащая 0,25% глюкозы);

1.2. 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 минут после приготовления.

### 2. Инокуляция и инкубация.

Исследование способности штамма бактерии формировать биопленку проводят в динамике с оценкой результатов через определенные временные периоды – 2, 4, 6, 18, 24, 48 часов. В связи с этим для анализа необходимы 6 иммунологических планшетов – по одному для каждого временного промежутка:

2.1. полученный инокулюм делят на 2 части;

2.2. суспензию штамма из первой части инокулируют в первую лунку стерильного плоскодонного пластикового иммунологического планшета в количестве 100 мкл;

2.3. 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;

2.4. в третью лунку, которая служит контролем (контроль №1), вносят 100 мкл стерильной среды обогащения (среда «Триптиказо-соевый бульон», содержащая 0,25% глюкозы);

2.5. в 2,5 мл стерильной среды обогащения (среда «Триптиказо-соевый бульон», содержащая 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);

2.6. берут остальные 5 чистых планшетов и повторяют действия, указанные в пп. 2.2. – 2.5;

2.7. планшеты накрывают крышками во избежание высыхания инокулюмов и помещают в термостат при температуре +37°C;

2.8. после окончания каждого срока инкубации, то есть через 2, 4, 6, 18, 24, 48 часов инокулюм из всех лунок соответствующего планшета удаляют пипетированием;

2.9. каждую лунку планшета 3-хкратно промывают 10ММ фосфатным буферным раствором (рН 7,2). Для удобства можно использовать 8-канальный дозатор;

2.10. действия для инокулюма из первой части (см. пп. 2.2, 2.4):

- в первую лунку для детекция накопления биомассы биопленки добавляют 50 мкл 0,1% раствора генцианвиолета и оставляют при комнатной температуре в течение 10 минут для окраски. Те же действия производят для лунки контроля №1;

- через 10 минут 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;

2.11. действия для инокулюма из второй части (см. пп. 2.3, 2.5):

- 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.

### 3. Детекция результатов:

3.1 125 мкл раствора генцианвиолет/этанол из первой лунки (соответствует первой части инокулюма) переносят в оптически чистую лунку;

3.2 125 мкл раствора из лунки контроля №1 переносят в оптически чистую лунку;

3.3 125 мкл раствора Congo Red /этанол из второй лунки (соответствует второй части инокулюма) переносят в оптически чистую лунку;

3.4 125 мкл раствора из лунки контроля №2 переносят в оптически чистую лунку;

3.5 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 определяют при длине волны 490 нм.

3.6 результат выражают в единицах оптической плотности.

### 4. 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 часов 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
$OD_k < ODo \leq 2 \times OD_k$	низкая	низкая
$2 \times OD_k < ODo \leq 4 \times OD_k$	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:

$$OD_k = OD_{\text{контроля}\#1} + 3 \times SD_{\text{контроля}\#1}, \text{ где } SD - \text{стандартное отклонение.}$$

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 этими клиническая оценка состояния раневой инфекции в длительно-незаживающих ранах представляет трудности. При этом результаты клинической оценки раневой инфекции не всегда взаимосвязаны 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 эффективностью 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 часа инкубации	Способность к накоплению основного вещества биопленки через 24 часа 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 и ошибок при выполнении и пути их устранения. Контроль качества метода. Техника безопасности**

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 минус 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°C до +8°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 клиничко-

диагностических лабораторий и инструкциям по 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)