

ბაქტერიოლოგიური კვლევა

ბაქტერიული საკვები ნიადაგების მომზადება ბაქტერიოლოგიურ ლაბორატორიაში მუშაობის საფუძველია. მისი მთავარი პრინციპი ბაქტერიისთვის ისეთი გარემოს შექმნაა, რომელიც მაქსიმალურად იმეორებს მის ბუნებრივ საარსებო გარემოს.

მომზადების პროცესი ოთხ ძირითად ეტაპად იყოფა:

1. **აწონვა:** მშრალი ფხვნილის (ექსტრაქტები, პეპტონები, მარილები) აწონვა ხდება შესაბამისი რაოდენობით და უნდა გაიხსნას შესაბამისი რაოდენობით გამოხდილ წყალში. (ეს მითითებულია საკვები ნიადაგის ეტიკეტზე).
2. **გახსნა/ხარშვა:** ხდება ნარევის გაცხელება სრულ გახსნამდე (განსაკუთრებით აგარიანი ნიადაგების შემთხვევაში).
3. **სტერილიზაცია:** ყველაზე კრიტიკული ეტაპი. ჩვეულებრივ ხდება ავტოკლავში (121° C ტემპერატურაზე, 15-20 წუთი), რათა განადგურდეს ყველა უცხო მიკროორგანიზმი და სპორა.
4. **ჩამოსხმა:** სტერილური ნიადაგის ჩამოსხმა ხდება პეტრის ფინჯნებზე ან სინჯარებში სტერილურ პირობებში.

ნიადაგები კონსისტენციის მიხედვით არის მყარი, თხევადი და ნახევრადთხევადი საკვები ნიადაგები. მათ შორის მთავარი განსხვავება აგარ-აგარის (ზღვის წყალმცენარეებისგან მიღებული გამამკვრივებელი საშუალება) შემცველობაა.

მახასიათებელი	თხევადი ნიადაგი (ბულიონი)	ნახევრად თხევადი	მყარი ნიადაგი (აგარი)
აგარის შემცველობა	0	0.2%-დან 0.5%-მდე	1.5-2%
ვიზუალური მხარე	გამჭვირვალე ან შემღვრეული სითხე	ჟელესური, რბილი მასა	ჟელესური მასა
მთავარი დანიშნულება	ბაქტერიული მასის სწრაფი და დიდი რაოდენობით დაგროვება.	ბაქტერიების მოძრაობის შესწავლა; მიკროაეროფილური ბაქტერიების კულტივირება; მიკრობული კულტურის შენახვა	სუფთა კულტურის გამოყოფა და კოლონიების შესწავლა.
ბაქტერიების ზრდის ფორმა	ბაქტერიები უპირატესად იზრდებიან მთელ მოცულობაში (სითხე იმღვრება).	უძრავი ბაქტერიები - ჩხვლეტის გასწვრივ; მოძრავი ბაქტერიები - ბაქტერიები ჩხვლეტის ხაზიდან ნიადაგის სიღრმეში	ბაქტერიები ქმნიან იზოლირებულ წერტილებს (კოლონიებს) ზედაპირზე.

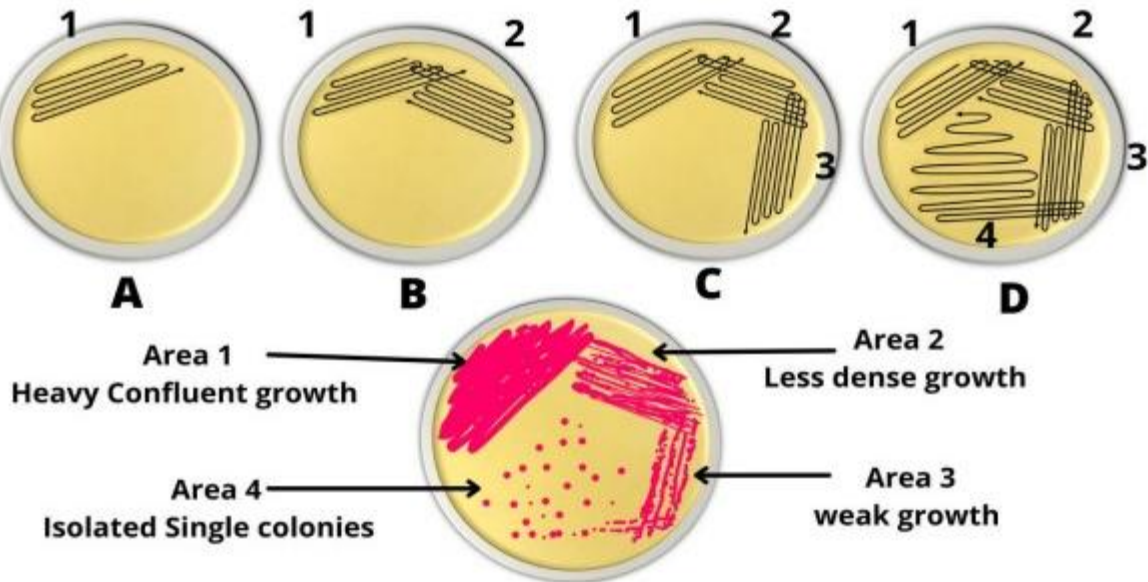


დათესვის ტექნიკა

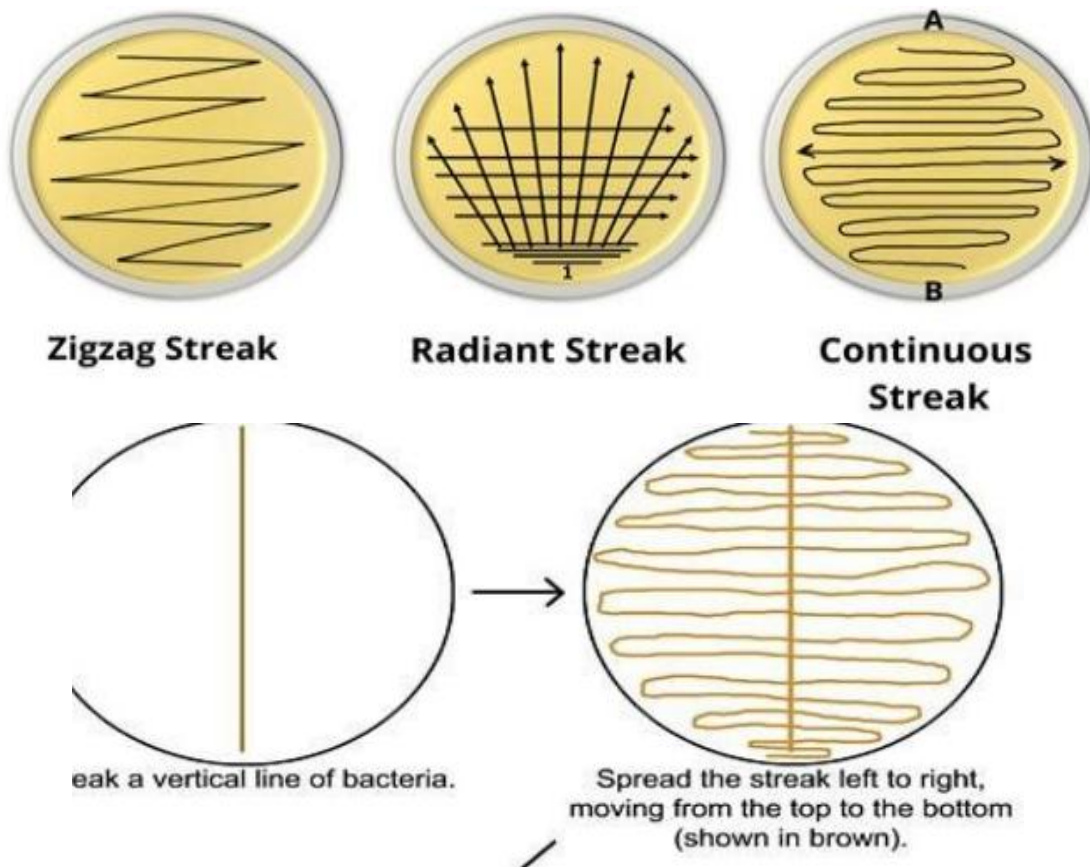
დღე I

მასალა უნდა დაითესოს ხელოვნურ საკვებ ნიადაგებზე ბაქტერიოლოგიური მარყუჟით. დათესვა გამოიყენება მიკრობიოლოგიაში მიკროორგანიზმების ცალკეული კოლონიების იზოლირებისთვის. ეს არის ბაქტერიების მექანიკური იზოლაციის ტექნიკა. არსებობს მასალის დათესვის სხვადასხვა მეთოდი: **სექტორული დათესვა** (სურ:1), **ზიგზაგისებური დათესვა**, **უწყვეტი დათესვა**, და **ვერტიკალური ხაზით დათესვა** (სურათი 2).

სურათი 1



სურათი 2



დღე II

18 -24 სთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ თერმოსტატში 37°C-ზე მყარი საკვები ნიადაგიდან უნდა მოვახდინოთ გრამის მეთოდით შეღებვა, ბიოქიმიური ტესტების ჩატარება მიკრობის იდენტიფიკაციის მიზნით. (API-სისტემები (ნაწლავური ჯგუფის ბაქტერიების და სხვა გრამუარყოფითი ჩხირების საიდენტიფიკაციო სისტემა), ოქსიდაზა, კატალაზა ტესტები).

დღე III

ანტიბიოტიკომგრძნობელობის ტესტი დისკო-დიფუზიის მეთოდით (კირბი-ბაუერის მეთოდი). კირბი-ბაუერის ტესტი ფართოდ გამოიყენება ბაქტერიების მგრძნობელობის დასადგენად სხვადასხვა ანტიმიკრობული ნაერთების მიმართ და გამოიყენება მიულერ-ჰინტონის აგარი (Mueller Hinton agar). მიულერ-ჰინტონის აგარი არ არის სელექტიური ან სადიფერენციაციო ნიადაგი. მასზე კარგად იზრდება ორგანიზმების უმრავლესობა.

საფეხური I - ბაქტერიული სუსპენზიის მომზადება „ინოკულუმის მომზადება“

ვამატებთ ბაქტერიულ კოლონიებს 2მლ ფიზიოლოგიურ ხსნარში. ვადარებთ მიღებულ სუსპენზიას 0.5 McFarland სტანდარტს (შეესაბამება მილიონ ბაქტერიას). თუ სუსპენზია უფრო მღვრიე არის ვიდრე 0.5 მაკფარლანდის ხსნარი, ფიზიოლოგიური ხსნარი უნდა დაემატოს ინოკულუმის სინჯარაში თანმიმდევრობით, ვინაიდან თუ მეტი ბაქტერია შევიტანეთ შედეგები არასარწმუნო იქნება.

საფეხური II - ბაქტერიული სუსპენზია ხე-ბამბით შეგვავქვს მიულერ -ჰინტონის ნიადაგზე.

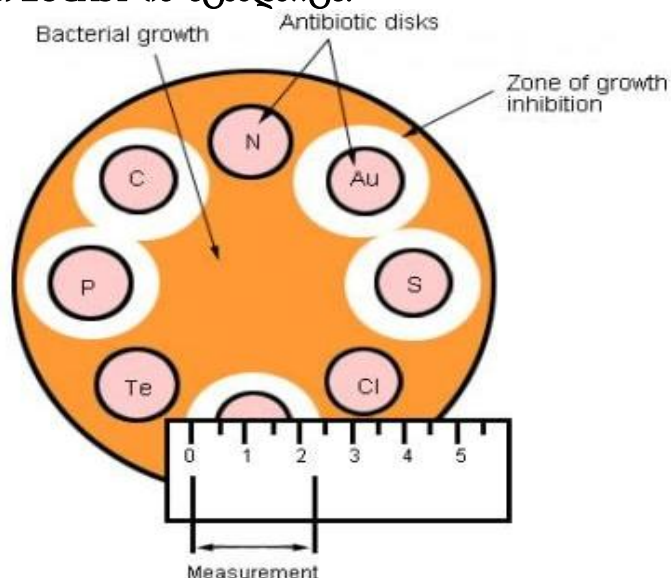
საფეხური III - 1) პინცეტის გამოყენებით ფრთხილად ამოიღეთ ერთი დისკი კარტრიჯიდან.

2) ნაწილობრივ მოხსენით პეტრის ფინჯანს თავსახური. მოათავსეთ დისკი და ნაზად დააწეეთ პინცეტით, რათა უზრუნველყოთ სრული კონტაქტი აგარის ზედაპირზე. არ გადაადგილოთ დისკი მას შემდეგ, რაც ის დაუკავშირდება აგარის ზედაპირს, თუნდაც დისკი არ იყოს სათანადო ადგილას, რადგან ზოგიერთი პრეპარატი იწყებს დიფუზიას მაშინვე აგართან შეხებისას.

3) განაგრძეთ თითო დისკის დადება აგარის ზედაპირზე. მას შემდეგ, რაც ყველა დისკი ადგილზე იქნება, გადაატრიალეთ ფინჯნები და მოათავსეთ ისინი 35°C ჰაერის ინკუბატორში 16-18 საათის განმავლობაში.

შედეგების წაკითხვას ვახდენთ ევროპის ანტიმიკრობულ მგრძნობელობაზე ტესტირების კომიტეტის მიერ (EUCAST) მოწოდებული სტანდარტის მიხედვით.

პროცედურა: თითოეული ანტიბიოტიკის ირგვლივ სახაზავით უნდა გავზომოთ ზონის ინჰიბიციის დიამეტრი და შევადაროთ EUCAST-ის სტანდარტს.



1. **ESBL (Extended-Spectrum Beta-Lactamase)- გაფართოებული სპექტრის ბეტა ლაქტამაზის დეტექცია ორმაგი დისკების მეთოდით (Double Disk Synergy Test, DDST), არის მარტივი და სანდო ტესტი, რომელიც გამოიყენება იმის დასადგენად, გამოიმუშავენ თუ არა ბაქტერია ESBL-ფერმენტს. მესამე თაობის ცეფალოსპორინებს უწოდებენ გაფართოებული ბეტა-ლაქტამური სპექტრის ანტიბიოტიკებს, ხოლო ფერმენტებს, რომლებიც შლიან მესამე თაობის ანტიბიოტიკების ბეტა-ლაქტამურ რგოლს, უწოდებენ გაფართოებული სპექტრის ბეტა ლაქტამაზებს (ESBL). ESBL-ის ყველაზე გავრცელებული მწარმოებლები არიან: *Klebsiella*, *Proteus* და *E. coli*.**

ამ ფერმენტების აქტივობა კლავულანის მჟავით (β-ლაქტამაზის ინჰიბიტორი) იზღუდება. პრინციპი შემდეგში მდგომარეობს: თუ ბაქტერია გამოიმუშავენს ESBL-ს, მაშინ კლავულანის მჟავის ზემოქმედებით შეინიშნება ცეფალოსპორინის დისკის ინჰიბიციის ზონის გაფართოება ამოქსაცილინ-კლავულანის (AMC) დისკისკენ, ანუ კლავულანის მჟავა თრგუნავს ESBL ფერმენტს, ის დიფუნდირდება III თაობის ცეფალოსპორინისკენ, აღადგენს მის აქტივობას და ქმნის სინერგიის კლასიკურ ზონას (keyh).



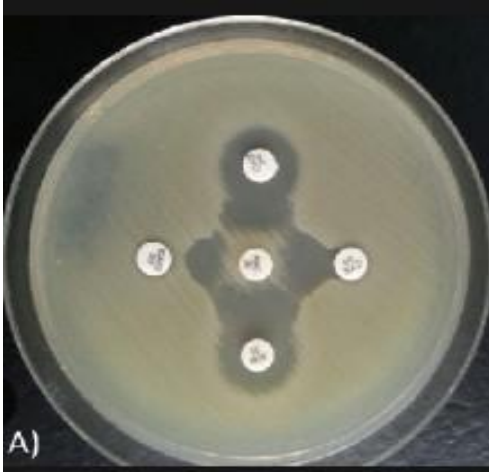
პეტრის ფინჯანზე ცენტრში ათავსებენ ამოქსაცილინი+კლავულანის მჟავით გაჟღენთილ დისკს, ირგვლივ კი მესამე თაობის ცეფალოსპორინებს: Cefotaxime, Cefixime, Ceftazidime, Ceftriaxone, მონობაქტამს (aztreonam).

შედეგებს ვკითხულობთ 35–37°C - ზე 18–24 საათის ინკუბაციის შემდეგ.

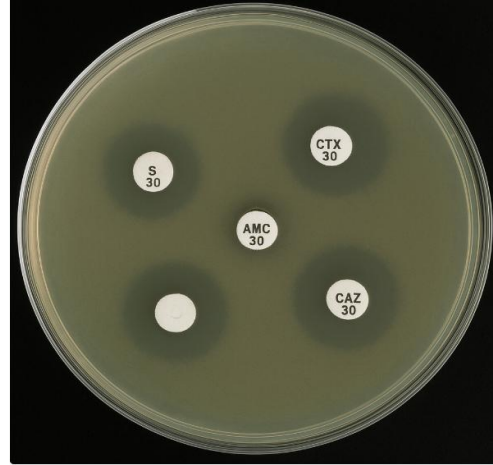
შედეგის შეფასება:

დაკვირვება	ინტერპრეტაცია
თუ ცეფალოსპორინის დისკის ირგვლივ ინჰიბიციის ზონა უფრო ფართოა AMC-ის მიმართულებით (იშლება როგორც “ფრთა”)	ESBL დადებითია — ბაქტერია გამოიმუშავენს გაფართოებული სპექტრის ბეტა-ლაქტამაზას.
თუ ცეფალოსპორინის ზონა სიმეტრიულია, გამიჯნულია, არ ეხება ერთმანეთს და გაფართოება არ მიდის AMC-ისკენ	ESBL უარყოფითია — ბაქტერია არ გამოიმუშავენს ESBL-ს.

სურათი 1



სურათი 2



სურათი 1-ზე ყველა გარშემო მდებარე დისკის ზონა (მარცხნივ, მარჯვნივ, ზემოთ და ქვემოთ) გაფართოებულია AMC დისკისკენ — ანუ ყველა მათგანთან ჩანს სინერგიის ეფექტი („keyhole effect“). ეს ნიშნავს, რომ შედეგი დადებითია — ESBL (+).

სურათი 2-ზე ზონები სიმეტრიულია და გაფართოება არ მიდის AMC-ისკენ. ეს ნიშნავს, რომ ცეფალოსპორინის დისკის ირგვლივ ინჰიბიციის ზონა სწრაფად და თანაბრად ვრცელდება ყველა მიმართულებით, ანუ არ იჩენს გაფართოებას ამოქსაცილინ-კლავულანის დისკისკენ — და შედეგად ტესტი არის ESBL უარყოფითი.

2. ინდუცირებული კლინდამიცინის რეზისტენტობის ტესტი - D-ტესტი

ბაქტერიებს შეიძლება ჰქონდეთ კონსტიტუციური რეზისტენტობა, ანუ როდესაც ბაქტერია თავიდანვე რეზისტენტულია ანტიბიოტიკისადმი ან ინდუცირებული რეზისტენტობა, როდესაც ბაქტერია თავიდან მგრძნობიარე ჩანს ანტიბიოტიკის მიმართ, მაგრამ გარკვეული სტიმულის (ხშირად სხვა ანტიბიოტიკის მოქმედების) შემდეგ ის “გააქტიურებს” გენებს, რომლებიც განაპირობებენ რეზისტენტობას კლინდამიცინის მიმართ.

კლინდამიცინის (DA-2) დისკის ირგვლივ არსებულ ზონა ჩვეულებრივ წრიული უნდა იყოს, მაგრამ ამ შემთხვევაში (იხ.სურათი ქვემოთ) ის იღებს D-ის ფორმას და ამ მოვლენას ეწოდება D-ტესტის დადებითი შედეგი (D-test positive).



მიზეზი არის **erm** (Erythromycin Ribosome Methylase) გენის არსებობა, რომელიც განაპირობებს რეზისტენტობას, ერითრომიცინი (დისკი E-15) კი ასტიმულირებს erm გენს, ეს უკანასკნელი ცვლის რიბოსომის სტრუქტურას ისე, რომ ანტიბიოტიკი ვეღარ უკავშირდება მას. კლინდამიცინი ორგანიზმში თავიდან თითქოს ეფექტურია, მაგრამ შემდეგ ბაქტერია ხვდება როგორ “დაიცვას თავი”. გარკვეული დროის შემდეგ (რამდენიმე დღე ან კვირა), ბაქტერია ამოიცნობს საფრთხეს და ააქტიურებს მიძინებულ erm გენს. გენი ცვლის რიბოსომას ისე, რომ კლინდამიცინი ვეღარ ებმება მას და მკურნალობა ჩაიშლება.

სწორედ ამიტომ ტარდება **D-ტესტი**, რომელიც გვეუბნება ბაქტერიას აქვს თუ არა ეს დამალული (ინდუცირებადი) რეზისტენტობა. თუ D-ტესტი დადებითია კლინდამიცინი არ უნდა დაინიშნოს, თორემ დროებით იმუშავებს და მერე მკურნალობა ჩავარდება.

D-ტესტის შედეგების ინტერპრეტაცია:

- თუ ზონა ორივეს გარშემო თანაბარია - D-ტესტი უარყოფითია, erm გენი არ არის, კლინდამიცინი შეიძლება დაინიშნოს.
- თუ კლინდამიცინის გარშემო ჩახშობის ზონა "შეიჭრება" ერითრომიცინისკენ და მიიღებს D-ის ფორმას - ეს ნიშნავს, რომ ბაქტერიას აქვს erm გენი, ანუ ინდუცირებადი რეზისტენტობა. ასეთ დროს კლინდამიცინი არ უნდა დაინიშნოს.

მსგავსი ინდუცირებადი ან რიბოსომური მეთილაციის მექანიზმი არ ხდება მხოლოდ მაკროლიდებზე, მაგალითები ასეთებია:

ანტიბიოტიკი ჯგუფი	გენები	მექანიზმი	ინდუცირება
მაკროლიდები/ ლინკოზამიდები/ სტრეპტომიცინები (MLSB)	erm	23S rRNA მეტილაცია	ერითრომიცინით ინდუცირებადი
ტეტრაციკლინები	tet(M), tet(O)	რიბოსომის დაცვა	ტეტრაციკლინით ინდუცირებადი
ამინოგლიკოზიდები	aac, aph	ფერმენტის საშუალებით ინაქტივაცია	ზოგჯერ ინდუცირებადი

ლაბორატორიაში გამოიყენება **D-test, tet-test, სხვა ინდუცირებადი ტესტები**.

3. მეთიცილინ-რეზისტენტული ოქროსფერი სტაფილოკოკის (MRSA) სკრინინგი.

მეთიცილინ-რეზისტენტული ოქროსფერი სტაფილოკოკის (MRSA) სკრინინგი ცხვირის ღრუდან ერთ-ერთი ყველაზე გავრცელებული პროცედურაა ჰოსპიტალური ინფექციების და ორთოპედულ ქირურგიაში ჭრილობის ინფექციის განვითარების საპრევენციოდ.

MRSA-ს სკრინინგი ცხვირის ღრუდან (SOP)

მიზანი და გამოყენების სფერო

პაციენტის ცხვირის ღრუში MRSA-ს კოლონიზაციის დადგენა ჰოსპიტალიზაციამდე ან მის განმავლობაში, ოპერაციის წინ სკრინინგი ეპიდემიოლოგიური კონტროლის და ჭრილობის ინფექციის განვითარების პრევენციის მიზნით.

საჭირო მასალები და აღჭურვილობა

- სტერილური ტამპონი (ხე-ბამბა)
- სტერილური ფიზიოლოგიური ხსნარი: (თუ ტამპონი მშრალია)
- საკვები ნიადაგები:

- მანიტოლ-მარილიანი აგარი

პროცედურის ეტაპები

ა) ნიმუშის აღება

- დაასველეთ სტერილური ტამპონი სტერილურ ფიზიოლოგიურ ხსნარში
- აღება: მოათავსეთ ფიზიოლოგიურ ხსნარში დასველებული ხე-ბამბა ცხვირის ერთ ნესტოში (დაახლოებით 1-2 სმ სიღრმეზე).
- ნაზი წრიული მოძრაობით 5-ჯერ შემოატარეთ ტამპონი ნესტოს შიდა კედელს.
- იგივე ტამპონით გაიმეორეთ პროცედურა მეორე ნესტოში.

ბ) ლაბორატორიული კვლევა

- დათესვა: ნიმუში გადაიტანეთ მანიტოლ-მარილიან აგარზე
- ინკუბაცია: მოათავსეთ თერმოსტატში 35–37°C ტემპერატურაზე 18-24 საათის განმავლობაში.

იდენტიფიკაცია:

- მანიტოლ მარილიან ნიადაგი ფერს იცვლის (ყვითლდება) ოქროსფერი სტაფილოკოკის არსებობისას..



- სრული იდენტიფიკაციისთვის გამოიყენება ტრადიციული მეთოდი: *S. aureus*-ის იდენტიფიცირება (კატალაზას ტესტი, კოაგულაზას ტესტი).

•

გ) რეზისტენტობის განსაზღვრა

MRSA-ს დასადასტურებლად ტარდება ანტიბიოტიკოგრამა:

- ცეფოქსიმინის დისკ-დიფუზიური მეთოდი: (ითვლება საუკეთესო პრედიქტორად *mecA* გენის არსებობისთვის).

მიულერ-ჰინტონის აგარზე შვიტანოთ ბაქტერიული სუსპენზია და მოვათავსოთ ცეფოქსიმინის დისკი. 18-20 სთ ის შემდეგ თუ ინჰიბიციიზ ზონა არის ≥ 22 mm ზე შედეგი უარყოფითია.

შედეგების ინტერპრეტაცია

შედეგი	ინტერპრეტაცია
ზრდა არ არის	MRSA კოლონიზაცია არ დასტურდება.
დადებითი (MRSA)	პაციენტი არის MRSA-ს მატარებელი. საჭიროა იზოლაცია და დეკოლონიზაციის პროტოკოლი.

