

Бактериологическое исследование

Приготовление бактериальных питательных сред является основой работы в бактериологической лаборатории. Его главный принцип — создание для бактерии такой среды, которая максимально воспроизводит её естественные условия обитания. Процесс приготовления делится на четыре основных этапа:

1. Взвешивание: сухой порошок (экстракты, пептоны, соли) отвешивают в соответствующем количестве и растворяют в необходимом объёме дистиллированной воды (это указано на этикетке питательной среды).

2. Растворение/кипячение: смесь нагревают до полного растворения (особенно в случае агаровых сред).

3. Стерилизация: самый критический этап. Обычно проводится в автоклаве (при температуре 121 °С в течение 15–20 минут), чтобы уничтожить все посторонние микроорганизмы и споры.

4. Разлив: стерильную среду разливают в чашки Петри или пробирки в стерильных условиях.

По консистенции различают твёрдые, жидкие и полужидкие питательные среды. Основное различие между ними — содержание агар-агара (уплотняющего вещества, получаемого из морских водорослей).

Характеристика	Жидкая среда (бульон)	Полужидкая среда	Твёрдая среда (агар)
Содержание агара	0	0,2%–0,5%	1,5–2%
Внешний вид	Прозрачная или мутная жидкость	Желеобразная, мягкая масса	Плотная желеобразная масса
Основное назначение	Быстрое и массовое накопление бактериальной массы	Изучение подвижности бактерий; культивирование микроаэрофильных бактерий; сохранение микробной культуры	Выделение чистой культуры и изучение колоний
Форма роста бактерий	Бактерии преимущественно растут во всём объёме (жидкость мутнеет)	Неподвижные бактерии — вдоль линии укола; подвижные бактерии — распространяются от линии укола в глубину среды	Бактерии образуют изолированные точки (колонии) на поверхности



техника посева

День I

Материал следует высевать на искусственные питательные среда с бактериологической петлей. Посев используется в микробиологии для выделения отдельных колоний микроорганизмов. Это метод механического выделения бактерий. Существуют разные способы посева материала: секторный посев **Рис:1**, Зигзагообразный посев, непрерывный посев и посев по вертикальной линии - **Рисунок 2**.

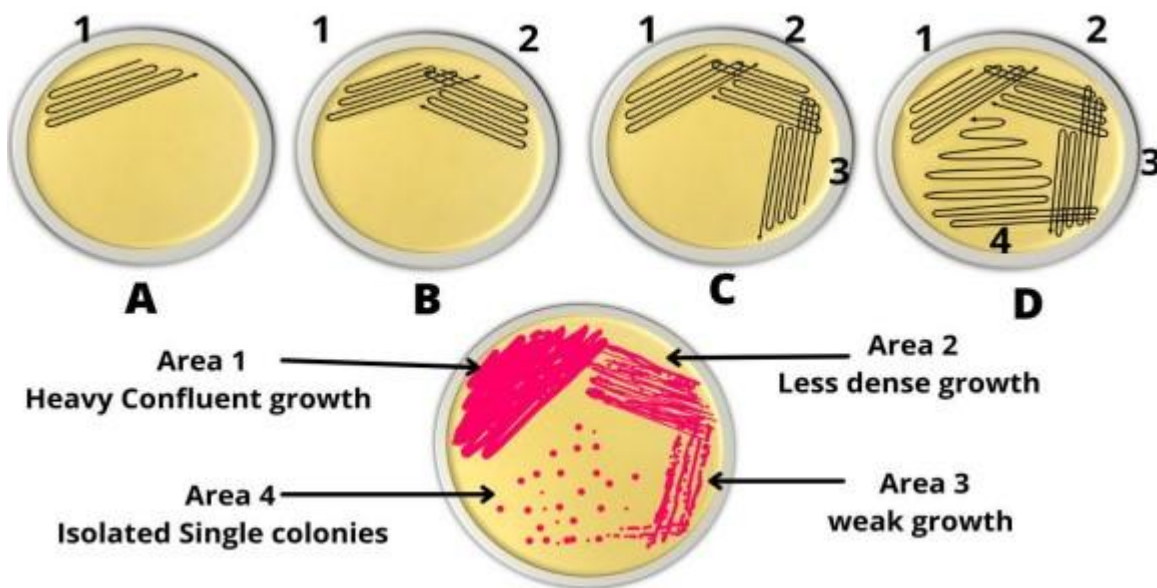


Рисунок 1

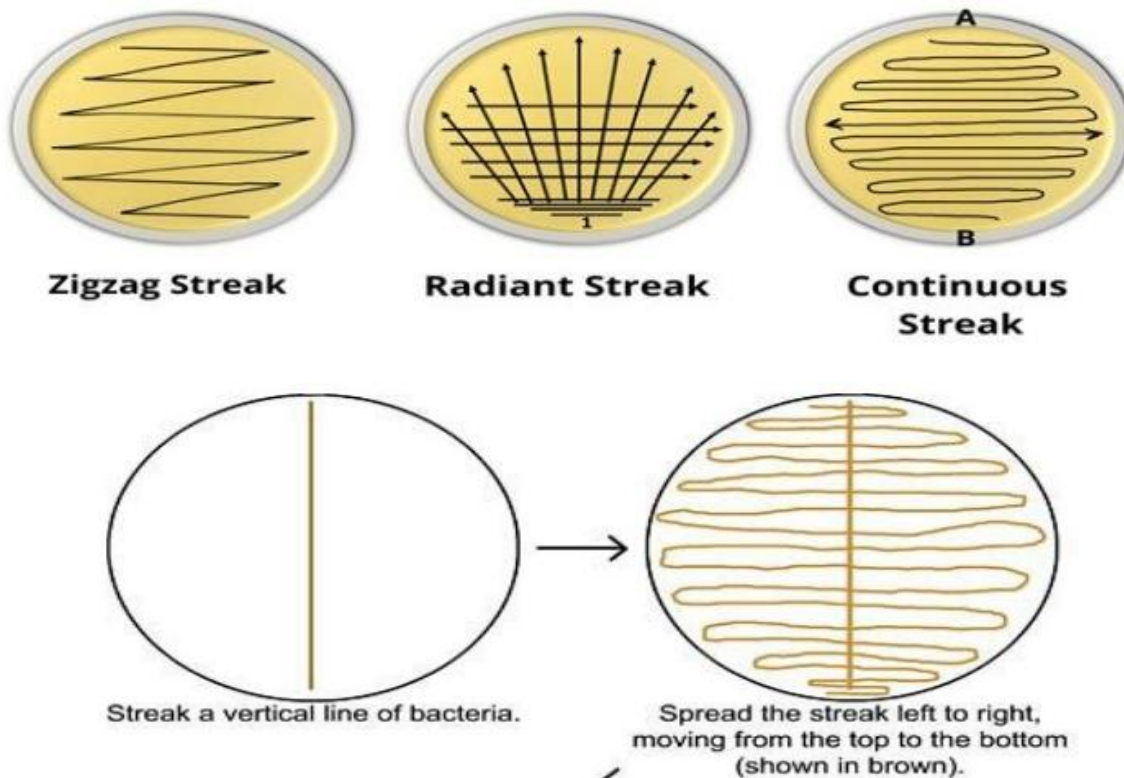


Рисунок 2

День II

Через 18-24 часа инкубации в термостате при температуре 37°C Колонии из агара следует окрасить по Граму, провести биохимические исследования для выявления микроба (API-системы (Система идентификации кишечной группы бактерий и других грамотрицательных палочек, оксидазная, каталазная пробы).

День III

Тест на устойчивость к антибиотикам методом диско-диффузии (метод Кирби-Бауэра). Для определения чувствительности бактерий к различным антимикробным соединениям широко применяют тест Кирби-Бауэра и агар Мюллера-Хинтона. Агар Мюллера-Хинтона не является селективной или дифференцирующей средой. Большинство организмов хорошо растут на нем.

Этап I.

Приготовление бактериальной суспензии «Приготовление посевного материала». В 2 мл физиологического раствора добавляем колонии бактерий. Полученную суспензию сравниваем с 0,5 стандартом МакФарланда (соответствует одному миллиону бактерий). Если суспензия более мутная, чем 0,5 раствора МакФарланда, в пробирку с посевным материалом следует последовательно добавлять дополнительный физиологический раствор, поскольку при добавлении большего количества бактерий результаты будут недостоверными.

Этап II.

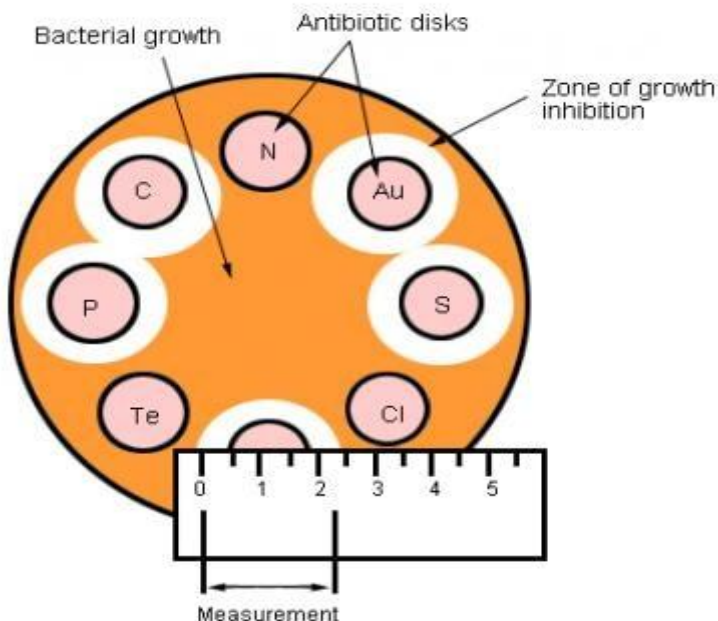
Бактериальная суспензия с древесной ватой обратит на почву Мюллера-Хинтина.

Этап III

- 1) Осторожно извлеките один диск из картриджа с помощью пинцета.
- 2) Частично снимите крышку с чашки Петри. Поместите диск и осторожно нажмите щипцами, чтобы обеспечить полный контакт с поверхностью агара. Не перемещайте диск после его контакта с поверхностью агара, даже если диск находится в неправильном положении, поскольку некоторые препараты начинают диффундировать сразу при контакте с агаром.
- 3) Продолжайте размещать по одному диску на поверхности агара. После того, как все диски будут на месте, переверните чашки и Поместите их в инкубатор с воздухом при температуре 35°C на 16-18 часов.

Мы считываем результаты в соответствии со стандартом Европейского комитета по тестированию чувствительности к противомикробным препаратам (EUCAST).

Процедура: Диаметр зоны ингибирования следует измерять линией вокруг каждого антибиотика и сравнивать со стандартом EUCAST.



Детекция бета-лактамаз ESBL (Extended-Spectrum Beta-Lactamase) расширенного спектра методом двойных дисков (Double Disk Synergy Test, DDST), Это простой и надёжный тест, который используется для определения того, вырабатывает ли бактерия фермент ESBL. Цефалоспорины третьего поколения называют антибиотиками с расширенным спектром действия β -лактамов, а ферменты, расщепляющие β -лактамное кольцо этих антибиотиков третьего поколения, называют β -лактамазами расширенного спектра (ESBL). Наиболее распространёнными производителями ESBL являются: *Klebsiella*, *Proteus* и *Escherichia coli*.

Активность этих ферментов подавляется клавулановой кислотой (ингибитор β -лактамаз). Принцип теста заключается в следующем: если бактерия вырабатывает ESBL, то под воздействием клавулановой кислоты наблюдается расширение зоны ингибиции вокруг диска цефалоспорины в направлении диска амоксициллин-клавуланат (AMC). То есть клавулановая кислота ингибирует фермент ESBL, диффундирует к диску цефалоспорины третьего поколения, восстанавливает его активность и формирует классическую синергетическую зону.



На чашку Петри в центре помещают диск, пропитанный амоксициллином с клавулановой кислотой, а вокруг него — диски цефалоспоринов третьего поколения: Cefotaxime, Cefixime, Ceftazidime, Ceftriaxone, а также монобактам (Aztreonam). Результаты читают после инкубации при 35–37 °C в течение 18–24 часов.

Наблюдение

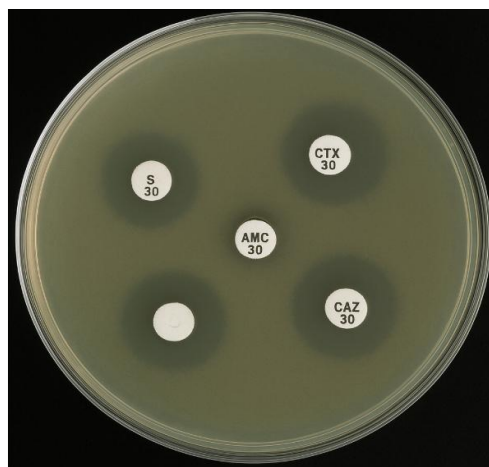
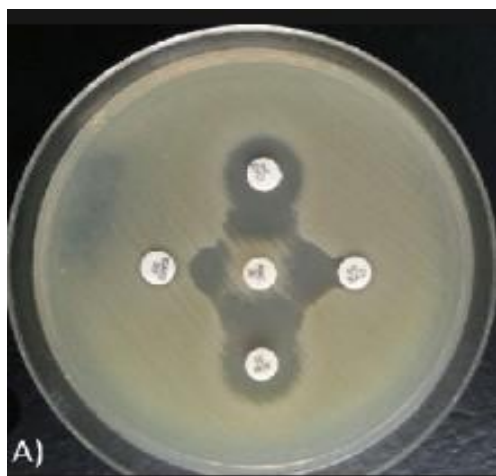
Если зона ингибиции вокруг диска цефалоспорины расширена в направлении диска AMC (образуется «крыло»)

Если зона вокруг цефалоспорины симметричная, разделена, не смещается к диску AMC

Интерпретация

ESBL-положительно — бактерия вырабатывает β -лактамазу расширенного спектра

ESBL-отрицательно — бактерия не вырабатывает ESBL



На изображении 1 зона вокруг всех расположенных дисков (слева, справа, сверху и снизу) расширена в сторону диска АМС — то есть у всех наблюдается эффект синергии («keyhole effect»). Это означает, что результат положительный — ESBL (+).

На изображении 2 зоны симметричны, и расширение не направлено в сторону АМС. Это означает, что зона ингибирования вокруг диска с цефалоспорином быстро и равномерно распространяется во всех направлениях, то есть не демонстрирует расширения в сторону диска амоксициллин-клавуланат — и, следовательно, тест является отрицательным на ESBL.

2. Тест на индуцированную резистентность к клиндамицину — D-тест

У бактерий может быть конститутивная резистентность — когда микроорганизм изначально устойчив к антибиотику, — либо индуцированная резистентность, когда бактерия первоначально выглядит чувствительной к антибиотику, но после определённого стимула (чаще всего под действием другого антибиотика) «активирует» гены, обуславливающие устойчивость к клиндамицину.

Зона вокруг диска с клиндамицином (DA-2) в норме должна быть круглой, однако в данном случае (см. изображение ниже) она приобретает форму буквы D. Это явление называется положительным результатом D-теста (D-test positive).



Причиной является наличие гена **erm** (Erythromycin Ribosome Methylase), который обуславливает резистентность. Эритромицин (диск E-15) стимулирует erm-ген; последний изменяет структуру рибосомы таким образом, что антибиотик больше не может с ней связываться. Клиндамицин в организме поначалу кажется эффективным, однако затем бактерия «понимает», как защититься. Через некоторое время (несколько дней или недель) бактерия распознаёт угрозу и активирует «спящий» erm-ген. Ген модифицирует рибосому так, что клиндамицин больше не связывается с ней, и лечение становится неэффективным. Именно поэтому проводится D-тест, который показывает, есть ли у бактерии скрытая (индуцируемая) резистентность. Если D-тест положительный, клиндамицин назначать не следует, так как он может подействовать временно, а затем лечение окажется неудачным.

Интерпретация результатов D-теста:

- Если зоны вокруг обоих дисков равномерные — D-тест отрицательный, гена erm нет, клиндамицин можно назначать.
- Если зона подавления вокруг клиндамицина «втягивается» в сторону эритромицина и приобретает форму буквы D — это означает, что у бактерии есть erm-ген, то есть индуцируемая резистентность. В таком случае клиндамицин назначать нельзя.

Подобный механизм индуцируемой резистентности, связанный с рибосомной метилированием, наблюдается не только в отношении макролидов. В лаборатории применяются D-test, tet-test и другие тесты для выявления индуцируемой резистентности.

3. Скрининг метициллин-резистентного золотистого стафилококка (MRSA)

Скрининг метициллин-резистентного золотистого стафилококка (MRSA) из носовой полости является одной из наиболее распространённых процедур для профилактики внутрибольничных инфекций и предупреждения развития послеоперационной раневой инфекции, особенно в ортопедической хирургии.

Скрининг MRSA из носовой полости (SOP)

Цель и область применения

Выявление колонизации MRSA в носовой полости пациента до госпитализации или во время неё; предоперационный скрининг с целью эпидемиологического контроля и профилактики развития раневых инфекций.

Необходимые материалы и оборудование

- Стерильный тампон (ватный аппликатор)
- Стерильный физиологический раствор (если тампон сухой)
- Питательные среды:
 - Маннитол-солевой агар

Этапы процедуры

а) Взятие материала

- Смочить стерильный тампон в стерильном физиологическом растворе.
- Введение: поместить смоченный тампон в одну ноздрю (примерно на глубину 1–2 см).
- Осторожными круговыми движениями 5 раз провести тампоном по внутренней стенке ноздри.
- Тем же тампоном повторить процедуру во второй ноздре.

б) Лабораторное исследование

- Посев: перенести материал на маннитол-солевой агар.
- Инкубация: поместить в термостат при температуре 35–37 °C на 18–24 часа.

Идентификация

Маннитол-солевой агар меняет цвет (желтеет) при наличии золотистого стафилококка. Для полной идентификации используется традиционный метод: идентификация *S. aureus* с помощью каталаза-теста и коагулаза-теста.



в) Определение резистентности

Для подтверждения MRSA ставится **антибиотикограмма**:

- **Диско-диффузионный метод с цефокситином** (считается наилучшим предиктором наличия гена **mecA**).

Процедура: на агар Мюллера–Хинтона вносят бактериальную суспензию и размещают диск с цефокситином. Через 18–20 часов если зона ингибирования ≥ 22 мм, результат считается **отрицательным**.

Интерпретация результатов:

Результат

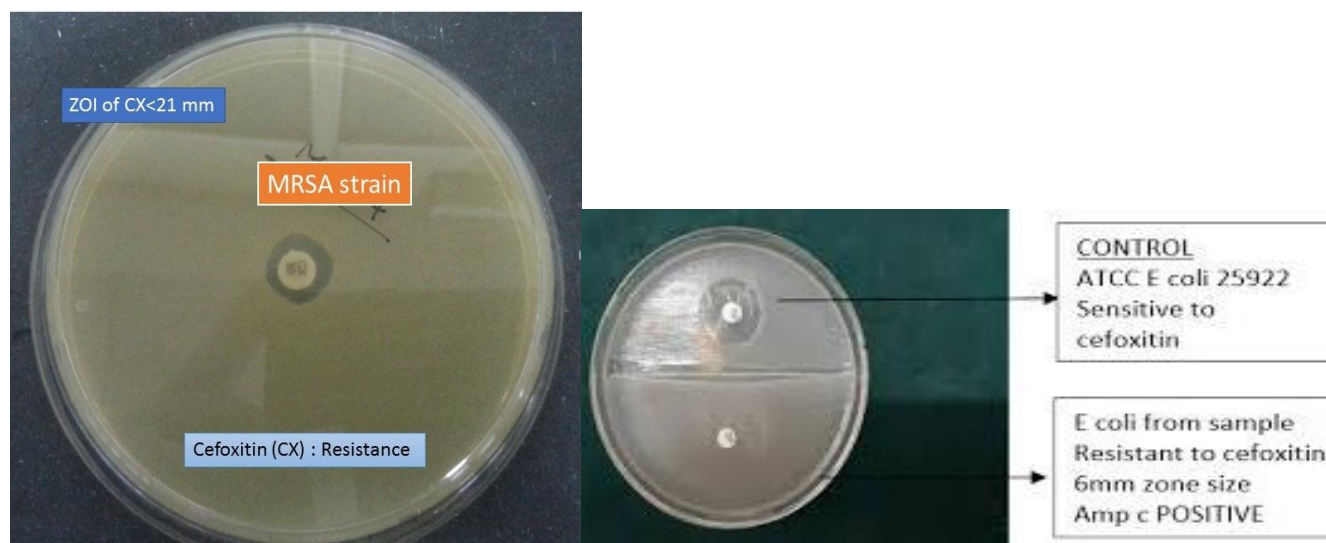
Рост отсутствует

Положительный
(MRSA)

Интерпретация

Колонизация MRSA не подтверждается.

Пациент является носителем MRSA. Требуется изоляция и протокол деколонизации.



4. Эффект Игла (Eagle Effect)

Это парадоксальное явление, названное в честь **Харри Игла**.

Суть: Эффект Игла описывает феномен, при котором бактерии или грибы, находящиеся под действием концентрации антибиотика, превышающей оптимальную бактерицидную концентрацию (ОБС), парадоксально демонстрируют **лучшие показатели выживания**, чем при самой оптимальной концентрации. (Обычно чем выше доза антибиотика, тем больше бактерий должно погибнуть. При эффекте Игла происходит обратное: при чрезмерно высокой дозе эффективность антибиотика снижается.)

Почему это происходит?

Очень высокая концентрация антибиотика «сбивает» бактерии с толку, и они переходят в «**фазу покоя**» (**стационарную фазу**), перестают расти и делиться. Так как многие антибиотики (например, пенициллины) убивают только **растущие бактерии**, эти «остановленные» микроорганизмы остаются живыми.



На изображении — бактерия чувствительна к высокой концентрации. Однако через несколько часов после инкубации развивается **толерантность**. Это означает, что слишком высокая концентрация антибиотика не эффективна против микроба. Именно поэтому при **эффекте Игла** (Eagle effect) часто одно лишь увеличение дозы пеницилина не помогает. В таких случаях врачи добавляют антибиотик другого типа (например, **клиндамицин**), который убивает бактерию не только во время деления, но и путем блокирования синтеза белка.