

## ОБМЕН ОПЫТОМ

# Алгоритм ускоренного бактериологического исследования с использованием хромогенных питательных сред

**О.В. Полухина**

заведующая бактериологической лабораторией Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

**Т.Н. Суборова**

д-р биол. наук, ст. науч. сотр. научно-исследовательской лаборатории военной хирургии Научно-исследовательский центр Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург

**С.А. Егорова**

канд. мед. наук, науч. сотр.

**М.А. Макарова**

канд. мед. наук, науч. сотр.

**Л.А. Кафтырева**

д-р мед. наук, главный внештатный специалист по бактериологии Комитета по здравоохранению г. Санкт-Петербурга, проф. кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова, заведующая лабораторией кишечных инфекций

**ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»**

**В статье приведен алгоритм использования хромогенных питательных сред при бактериологическом исследовании биологического материала. Применение хромогенных питательных сред позволяет сократить сроки исследования и через 18–24 часа после посева получить информацию о выделенных микроорганизмах, клинически значимой резистентности к антимикробным препаратам и выдать рекомендации для проведения этиотропной терапии и профилактических мероприятий в рамках инфекционного контроля.**

В настоящее время для проведения бактериологических исследований разработан и представлен на рынке широкий спектр дифференциальных питательных сред нового поколения — хромогенных и флуорогенных, которые позволяют идентифицировать различные микроорганизмы непосредственно в процессе культивирования. Поскольку хромогенные и селективные субстраты входят в состав питательных сред, используемых для первичного посева, то выделение «чистой культуры» микроорганизма и его идентификация происходят одновременно и не требуют постановки дополнительных тестов, что значительно сокращает время и материальные затраты на исследование. Использование хромогенных (флуорогенных) сред при исследовании проб биологического материала на этапе первичного посева делает возможным ускоренное получение ответа (через 18–24 ч).

Большой выбор представленных на рынке хромогенных сред различных производителей позволяет подобрать оптимальный набор для исследования в соответствии с задачами и возможностями лаборатории.

Основными возбудителями внутрибольничных инфекций (ВБИ) в стационарах являются *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, грамотрицательные неферментирующие бактерии (ГОНБ) (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*), *Enterococcus* spp., грибы рода *Candida*, которые способны вызывать инфекции кровотока, мягких тканей, дыхательных и мочевыводящих путей, особенно у ослабленных и иммунокомпрометированных пациентов, а также пациентов, находящихся в отделении реанимации и интенсивной терапии. Эти микроорганизмы представляют угрозу для пациентов и медицинского персонала, поскольку способны длительно сохраняться в больничной среде, а также распространяться от пациента к пациенту при невыполнении изоляционно-ограничительных мероприятий и несоблюдении гигиены рук медицинскими работниками. Ранняя постановка этиологического диагноза позволяет своевременно назначить эмпирическую этиотропную терапию и провести мероприятия инфекционного контроля, направленные на предотвращение распространения микроорганизмов в стационаре.

## Опыт использования хромогенных питательных сред в работе бактериологической лаборатории

Хромогенная неселективная среда для выделения и подсчета уропатогенных бактерий позволяет через 18 ч инкубации изолировать и подсчитать микроорганизмы, в т. ч. присутствующие в ассоциации, и идентифицировать бактерии, наиболее часто вызывающие инфекции мочевыводящих путей (*E. coli*, *Enterococcus* spp., *Proteus* spp.), по цвету колоний, который определяется специфической ферментативной активностью в присутствии хромогенных субстратов. Используя дополнительно рутинные тесты, можно выполнить предварительную или окончательную идентификацию других патогенов. Несмотря на то что подобные среды разрабатывались прежде всего для исследования проб мочи, во многих лабораториях в настоящее время их все шире используют для посева других видов биологического материала.

В течение пяти лет в бактериологической лаборатории Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России (ФГБУ «РНЦРХТ») для первичного посева проб биологического материала, полученных от пациентов с гнойно-септическими инфекциями (ГСИ) дополнительно стали использовать две хромогенные среды производства DRG (Франция), предназначенные для скрининга штаммов энтеробактерий, резистентных к цефалоспорином расширенного спектра, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра (CHROMagar ESB), и карбапенем-резистентных грамотрицательных бактерий (CHROMagar KPC).

Анализ результатов посева более 3 тыс. проб биологического материала показал, что в 71,0% проб выявлена монокультура микроорганизмов, а в 29,0% — микробные ассоциации. Монокультуры были выделены из 87,0% проб крови и смывов с фрагментов катетеров, 73,0–73,4% проб отделяемого нижних дыхательных путей и мочи, 61,0% проб раневого отделяемого. Использование для первичного посева хромогенной среды позволило уже через 18 ч не только выделить чистую культуру возбудителей, но и определить состав микробных ассоциаций. Микробные ассоциации

включали 2–4 вида микроорганизмов, колонии которых четко дифференцировались на хромогенной среде. Чаще встречались пробы, содержащие два вида возбудителей (23,3% проб), в 4,0% проб было выявлено три, в 1,8% проб — четыре вида бактерий. Ассоциации возбудителей, каждый из которых обнаруживался в диагностическом титре, состояли в 55,0% случаев из грамотрицательных бактерий (ГОБ), в 32,0% случаев — из ГОБ и грамположительных бактерий, остальные пробы содержали бактерии или грибы в различных сочетаниях (табл. 1).

Таблица 1

**Результаты исследования биологического материала с использованием хромогенной среды**

Биологический материал	Пробы с наличием роста микроорганизмов									
	монокультура		ассоциации микроорганизмов						всего	
			2 вида		3 вида		4 вида			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Моча	1014	73,4	304	22,0	31	2,2	33	2,4	1382	100
Раневое отделяемое	605	61,1	293	29,6	74	7,5	19	1,9	991	100
Кровь	211	86,8	30	12,4	2	0,8	0,0	0,0	243	100
Отделяемое нижних дыхательных путей	228	79,7	48	16,8	10	3,5	0,0	0,0	286	100
Фрагмент катетера	25	86,2	4	13,8	0,0	0,0	0,0	0,0	29	100
Другой материал	14	60,9	8	34,8	1	4,4	0,0	0,0	23	100
Итого	2097	71,0	687	23,3	118	4,0	52	1,8	2954	100

Важным этапом бактериологического исследования является определение чувствительности выделенных микроорганизмов к антимикробным препаратам (АМП). Подготовка культуры к исследованию и сама процедура тестирования одним из методов (диско-диффузионным, методом пограничных концентраций с использованием автоматических анализаторов или зарегистрированных наборов реагентов) занимают 18–48 ч, что задерживает назначение рациональной антимикробной терапии.

В настоящее время во многих странах частота выделения штаммов микроорганизмов, устойчивых к широкому спектру АМП, достаточно велика. К наиболее «проблемным» с позиции резистентности относят метициллин-резистентные штаммы *S. aureus* (MRSA); штаммы *Enterobacteriaceae* и ГОНБ, резистентные к цефалоспорином расширенного спектра (ЦРС) и карбапенемам; штаммы *Enterococcus* spp., устойчивые к ванкомицину. Быстрая детекция таких штаммов позволяет избежать назначения неадекватных АМП, а также предпринять меры инфекционного контроля, направленные на ограничение распространения резистентного штамма в стационаре.

В целях ограничения распространения резистентных штаммов/генов резистентности в популяции возбудителя необходимо проведение тестов, подтверждающих отдельные (клинически значимые) механизмы резистентности, например продукцию бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), карбапенемаз у *Enterobacteriaceae* и ГОНБ, наличие пенициллин-связывающего белка 2a у *S. aureus* и др. Постановка фенотипических подтверждающих тестов занимает дополнительные 18–24 ч.

Сократить время исследования помогают молекулярно-генетические методы с использованием наборов реагентов для выявления клинически значимых микроорганизмов и генов, кодирующих механизмы резистентности. Такие тесты, особенно при применении метода полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени, позволяют значительно сократить время исследования. Однако не все лаборатории располагают необходимым оборудованием и квалифицированным персоналом для их выполнения.

Использование хромогенных сред с дополнительными селективными добавками (определенные пороговые концентрации АМП) позволяет решить большинство вышеперечисленных проблем. При посеве биологического материала одноэтапно проводится не только выделение и идентификация микроорганизма, но и (в зависимости от селективной добавки) обнаруживаются штаммы, устойчивые к бета-лактамам (MRSA, БЛРС-продуцирующие и карбапенем-резистентные энтеробактерии и ГОНБ) и гликопептидам — ванкомицин-резистентные энтерококки (VRE). При этом срок исследования сокращается до 18–24 ч. Кроме того, такие среды позволяют заметить «гетерогенность» популяции возбудителя по чувствительности к АМП и выявить те колонии, которые характеризуются устойчивостью. Использование хромогенных сред не требует специального оборудования, обучения персонала лаборатории и дополнительных трудозатрат.

В 2010–2014 гг. для первичного посева проб биоматериала в бактериологической лаборатории ФГБУ «РНЦПХТ» дополнительно стали использовать две хромогенные среды производства DRG (Франция), предназначенные для скрининга штаммов энтеробактерий, резистентных к ЦРС, продуцирующих БЛРС (CHROMagar ESBLE), и карбапенем-резистентных грамотрицательных бактерий (CHROMagar KPC).

Использование этих сред при первичном посеве биоматериала позволяет уже через 18 ч выдать предварительные рекомендации о возможности использования для терапии цефалоспоринов и карбапенемов. Своевременная информация о выделении таких штаммов микроорганизмов необходима также госпитальному эпидемиологу — для проведения профилактических мероприятий в рамках инфекционного контроля.

В табл. 2 приводится алгоритм бактериологического исследования биологического материала с использованием традиционных и хромогенных питательных сред, а также указана продолжительность проведения различных этапов бактериологического исследования.

Таблица 2

**Время проведения различных этапов бактериологического исследования биологического материала с использованием традиционных и хромогенных питательных сред**

Время получения результатов	Алгоритм бактериологического исследования с использованием питательных сред	
	традиционных	хромогенных
18–24 ч	1. Получение чистой культуры микроорганизмов	1. Получение чистой культуры микроорганизмов. 2. Предварительная и/или окончательная идентификация. 3. Выявление полирезистентных штаммов клинически значимых микроорганизмов
36–48 ч	1. Постановка идентификационных тестов. 2. Определение чувствительности микроорганизмов к АМП	Окончательная идентификация, определение чувствительности к АМП с использованием экспертной системы бактериологического анализатора и интерпретация результатов с использованием EUCAST <b>Исследование завершено</b>
72 ч -10 сут	Учет результатов	

Полученные данные позволяют сделать определенные выводы.

В настоящее время при традиционном бактериологическом исследовании хромогенные среды можно использовать в двух направлениях:

- для одновременного селективного выделения и идентификации микроорганизмов (возбудителей ГСИ, *Candida* spp., *Salmonella*, *E. coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Streptococcus* гр. В и др.) в пробах биологического материала, а также в пробах пищевых продуктов, воды, на объектах внешней среды при исследованиях, проводимых в рамках внутреннего контроля качества и санитарной микробиологии;
- для скрининга штаммов микроорганизмов, устойчивых к определенным классам АМП: *MRSA*, *VRE*, *Enterobacteriaceae* и ГОНБ, устойчивых к цефалоспорином и карбапенемам ( в т. ч. продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра и карбапенемазы).

Хромогенные среды имеют преимущества перед традиционно используемыми средами, т. к. одноэтапное выделение, идентификация и количественная оценка возбудителей ГСИ и инфекционных заболеваний позволяют существенно сократить сроки бактериологического исследования (с 3–5 сут до 18–36 ч).

Детекция устойчивых к АМП штаммов клинически значимых микроорганизмов в течение 18–24 ч при первичном посеве биологического материала на хромогенные питательные среды значительно упрощает и сокращает бактериологическое исследование.