

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Саратовский государственный медицинский университет
имени В.И. Разумовского»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научно-исследовательский институт травматологии,
ортопедии и нейрохирургии

Бабушкина И.В., Ульянов В.Ю.,
Мамонова И.А., Гладкова Е.В.

**МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБНЫХ
БИОПЛЕНОК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИМПЛАНТАТ-
АССОЦИИРОВАННОЙ ИНФЕКЦИИ IN VITRO**

учебно-методическое пособие

Бабушкина И.В., Ульянов В.Ю., Мамонова И.А., Гладкова Е.В.

**ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК ВОЗБУДИТЕЛЯМИ
ИМПЛАНТАТ-АССОЦИИРОВАННОЙ ИНФЕКЦИИ IN VITRO**

учебно-методическое пособие

Заказ № 3340-21/26081. Подписано в печать 10.08.2021.

Усл. печ. л. 2,33. Тираж 100 экз.

Отпечатано: Издательский центр ООО «Амирит»
410009 г. Саратов ул. Чернышевского, 88 литер «у».
тел. 8 (8452) 24 86 33, 8 800 700 86 33
zakaz@amirit.ru

Саратов
2021

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Саратовский государственный медицинский университет
имени В.И. Разумовского»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научно-исследовательский институт травматологии,
ортопедии и нейрохирургии

Бабушкина И.В., Ульянов В.Ю.,
Мамонова И.А., Гладкова Е.В.

**МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ МИКРОБНЫХ
БИОПЛЕНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИМПЛАНТАТ-
АССОЦИИРОВАННОЙ ИНФЕКЦИИ IN VITRO**

учебно-методическое пособие

Саратов
2021

УДК 576.8:616-089.843:617-022
ББК 28.4
Ф79

Учебно-методическое пособие предназначено для слушателей центра дополнительного профессионального образования института подготовки кадров высшей квалификации и дополнительного профессионального образования при освоении дополнительной профессиональной программы повышения квалификации «Современные методы клинических исследований в лабораторной диагностике» в рамках системы непрерывного медицинского (фармацевтического) образования для врачей по специальности «клиническая лабораторная диагностика».

Составители: к. м. н. Бабушкина И.В., д. м. н., доцент Ульянов В.Ю.,
к. б. н. Мамонова И.А., к. б. н. Гладкова Е.В.

Рецензенты: д. м. н. профессор Ю.П. Солдатов, руководитель учебного отдела ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России;
к. б. н. доцент Т.С. Кириязи, и о. заведующего кафедрой медико-биологических дисциплин Саратовского медицинского университета «Реавиз».

*Учебно-методическое пособие утверждено на заседании
научной проблемной комиссии СГМУ
по травматологии, ортопедии и нейрохирургии
(протокол № 7 от 10.08.2021 г.)*

© СГМУ, 2021

Содержание

1. Введение	6
1.1. Общие положения и область применения	6
1.2. Методы формирования микробных биопленок	8
2. Изучение микробных биопленок возбудителей имплантат-ассоциированной инфекции.....	10
2.1. Порядок исследования образцов биологического материала	10
2.2. Формирование биопленок в полистироловом планшете	12
2.3. Учет и интерпретация полученных результатов	13
2.3.1. Оценка биопленкообразующей способности штамма	13
2.3.2. Подсчет массы бактериальной биопленки	14
2.3.3. Оценка вероятности формирования биопленки при инфекционно-воспалительном процессе в области оперативного вмешательства	14
Вопросы для самоконтроля.....	16
Основная литература	17
Дополнительная литература.....	18
Периодические издания.....	18
Приложение 1. Оборудование, расходные материалы, питательные среды, реагенты и реактивы	19

1. Введение

1.1. Общие положения и область применения

По данным ВОЗ, в последние десятилетия во всем мире растет число инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, которые представляют серьезную проблему общественного здоровья в силу своей распространенности, отрицательного влияния на показатели заболеваемости, смертности и степени тяжести состояния пациентов, а также опасности для медицинских работников и значительного экономического ущерба^{1, 2}. По оценке Национального института здоровья США, 80 % всех бактериальных инфекций человека, в том числе инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, обусловлены формированием микробных биопленок. Интенсивное внедрение в медицинскую практику эндопротезирования крупных суставов, обусловленное его высоким реабилитационным потенциалом, неизбежно сопровождается увеличением числа случаев осложнений различного характера, наиболее тяжелыми из которых являются инфекционные осложнения области хирургического вмешательства³. Ведущая роль в развитии инфекционного процесса принадлежит способности микроорганизмов колонизировать биогенные и абиогенные поверхности и формировать микробную биопленку.

Большое значение в подтверждении диагноза перипротезной инфекции и дифференциальной диагностике с асептическим воспалением имеют микробиологические исследования, однако традиционное микробиологическое исследование не обладает достаточной чувствительностью и специфичностью при инфекции, связанной с формированием биопленок, и может привести к неправильной интерпретации полученных данных. Сложности диагностики и лечения имплантат-ассоциированного воспаления связаны с переходом ее возбудителей в sessильную форму и формированием микробной биопленки, что снижает информативность традиционных

¹ Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП): Информационный бюллетень за 2018 г. / В.Г. Акимкин, А.В. Тутельян, О.А. Орлова, А.А. Голубкова, О.А. Квасова, Н.В. Сычева, Т.С. Скачкова – М.: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2019. - 51 с.

² Глобальная задача по обеспечению безопасности пациентов 2005-2006 [Электронный ресурс] – URL: https://www.who.int/patientsafety/information_centre/GPSC_Launch_RU.pdf

³ Афинягина А.Г., Даровская Е.Н. Микробные биопленки ран: состояние вопроса // Травматология и ортопедия России. – 2011. – № 3. – С. 119-125.

микробиологических методов диагностики и ограничивает спектр эффективных антимикробных препаратов для лечения имплантат-ассоциированной инфекции⁴.

Биологические плёнки способствуют формированию устойчивости бактерий к неблагоприятным факторам окружающей среды, включая воздействие антибактериальных препаратов, образуя экзополисахаридный матрикс, обладающий протективными функциями^{5, 6, 7}. При наличии микробных биопленок возможно получение ложноотрицательных результатов при проведении микробиологических исследований, так как зрелый экзополисахаридный матрикс препятствует механическому переносу бактерий на диагностические питательные среды.

В формировании биопленки выделяют несколько стадий:

- первичное (обратимое) прикрепление микроорганизмов к поверхности (адгезия, адсорбция) из окружающей среды;
- окончательное (необратимое) прикрепление, связанное с синтезом внеклеточных полимеров;
- созревание биопленки, состоящее в том, что адгезированные бактериальные клетки способствуют прикреплению последующих клеток, при этом внеклеточный матрикс биопленки фиксирует структуру, происходит накопление питательных веществ в матриксе и деление клеток внутри биопленки;
- рост зрелой биоплёнки с изменением размера и формы, матрикс на этой стадии играет защитную роль;
- дисперсия биопленки, состоящая в распространении бактериальных клеток, которые отделяются от биопленки и прикрепляются к поверхности с формированием новой колонии⁸.

Большие проблемы в медицинской практике создает способность бактерий образовывать биопленки на поверхностях различных инструментов, оборудования. Микроорганизмы, входящие в состав биопленок, в 100–1000 раз менее чувствительны к большинству антибиотиков и другим биоцидным веществам. Такая устойчивость

⁴ Тец В.В. Клеточные сообщества / Под ред. В. Теца. СПб., 1998. – С. 15-73.

⁵ Окулич В.К., Кабанова А.А., Плотников Ф.В. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии. – Витебск: ВГМУ, 2017. – 300 с.

⁶ Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий / И.В. Чеботарь, А.Н. Маянский, Е.Д. Кончакова, А.В. Лазарева, В.П. Чистякова // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2012. – Т. 14, № 1. – С. 51-58.

⁷ Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок / Т.А. Смирнова, Л.В. Диденко, Р.Р. Азизбекаев, Ю.М. Романова // Микробиология. – 2010. – Т. 79, № 4. – С. 435-446.

⁸ Обзор биофизических особенностей микробной адгезии / Н.В. Серегина, Т.В. Честнова, В.А. Жеребцова, В.А. Хромушин // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – Т. XV, № 3. – С. 175-177.

обусловлена несколькими механизмами: затруднением или неспособностью биоцидов проникать внутрь матрикса, связыванием и инактивацией их полимерами и белками матрикса, замедленной скоростью деления бактерий в биопленках, наличием в биопленках метаболически неактивных клеток, мало чувствительных к биоцидам⁹.

Сочетание высокой антибиотикорезистентности с широким набором факторов вирулентности сессильных микроорганизмов указывает на то, что у пациентов с имплантат-ассоциированной инфекцией именно в биопленках накапливается высокий патогенный потенциал, вследствие чего пленкообразующие штаммы становятся возбудителями тяжелых инфекционных осложнений эндопротезирования крупных суставов.

Выявление таких биологических особенностей возбудителей имплантат-ассоциированной инфекции как способность к пленкообразованию с помощью предлагаемых оригинальных и модифицированных диагностических тестов позволят оптимизировать методические подходы к диагностике инфекционных осложнений эндопротезирования крупных суставов, оценке антибиотикочувствительности их возбудителей и разработке тактики лечения, а также к организации и проведению дезинфекционных мероприятий по элиминации возбудителя.

1.2. Методы формирования микробных биопленок

Существует ряд методов культивирования микробных биопленок, имеющих медицинское значение, которые дают возможность изучать особенности жизнедеятельности микробных биопленок, скорость и условия их формирования, исследовать адгезивную способность микроорганизмов к абиотическим и биотическим объектам, влияние химических и физических факторов на формирование и разрушение биопленок, выявлять в популяции микроорганизмов изоляты, обладающие повышенной способностью к образованию биопленок. Однако, большинство методов, позволяющих культивировать микроорганизмы в виде биопленок, используются в основном в научных исследованиях и не находят применения в клинической практике.

В исследовании G.D. Christensen (1985)¹⁰ впервые описан метод культивирования, индикации и изучения способности формирования микроорганизмами биопленок в

⁹ Маянский А.Н., Чеботарь И.В. Стафилококковые биопленки: структура, регуляция, отторжение // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2011. – № 1. – С. 101-108.

¹⁰ Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices / G.D. Christensen, W.A. Simpson, J.J. Younger, L.M.

медицинской практике с помощью спектрофотометрического метода исследования, авторами последующих работ использованы модификации этого принципа^{11, 12}. В дальнейшем изучение биопленок было связано с разработкой методов культивирования на различных объектах^{13, 14}.

Методология выращивания биопленок разделилась на два направления: динамическое – культивирование при имитации естественных условий обитания микроорганизмов и статическое. В динамических условиях с использованием биореакторов (лабораторных ферментеров) создаются условия для постоянного потока жидкости и адгезия микроорганизмов происходит на поверхности системы фильтров и/или на внутренних частях биореактора, затем адгезированные микроорганизмы образуют матрикс биопленки. Преимущество таких моделей заключается в максимальном приближении к условиям живых систем. Динамические методы культивирования используются ограничено в связи с большими объемами потребления питательных сред, сложностью оборудования, необходимостью стерилизации аппаратов, низкой производительностью методов, высокой стоимостью эксплуатации^{15, 16, 17}.

Вторая группа методов основана на создании статических условий культивирования микроорганизмов. Эти методы формирования биопленки основаны на сорбции молекул красителя на структурах биопленки с последующей их отмыжкой (десорбцией) в органические растворители и позволяет дать условную количественную характеристику образовавшимся микробным сообществам: масса матрикса биопленки пропорциональна количеству красителя, сорбирующегося на поверхности биопленки и оптической плотности образца. В статических условиях культивирования биопленок наиболее часто применяется метод с применением пластиковой посуды в различных модификациях,

Baddour, F.F. Barrett, D.M. Melton, E.H. Beachey // Journal of Clinical Biology. – 1985. – Vol. 22, No. 6. – P. 996-1006.

¹¹ Genetic approaches to study of biofilms / G. O'Toole, L. Pratt, P. Watnick, D.K. Newman, V.B. Weaver, R. Kolter // Methods in Enzymology. – 1999. – No. 310. – P. 91-109.

¹² Novel model for multispecies biofilms that uses rigid gas-permeable lenses / R. Peyyala, S.S. Kirakodu, J.L. Ebersole, K.F. Noval // Applied and Environmental Microbiology. – 2011. – Vol. 77, No. 10. – P. 3413-3421.

¹³ Coenye T., Nelis H.J. In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation // Journal of Microbiological Methods. – 2010. – No. 83. – P. 89-105.

¹⁴ O'Toole G., Heidi B. Kaplan and Roberto Kolter. Biofilm formation as microbial development // Annual Review of Microbiology. – 2000. – No. 54. – P. 49-79.

¹⁵ Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections // Science. – 1999. – Vol. 284, No. 5418. – P. 318-322.

¹⁶ Aslam S., Darouiche R.O. Role of antibiofilm-antimicrobial agents in controlling device-related infections // International Journal of Artificial Organs. – 2010. – Vol. 34, No. 9. – P. 752-758.

¹⁷ Metabolic differentiation in biofilms as indicated by carbon dioxide production rates / O. Kroukamp, G.M. Wolfardt, L. Boonzaaier, S.N. Liss // Applied and Environmental Microbiology. – 2010. – Vol. 76, No. 4. – P. 1189-1197.

который характеризуется удобством, высокой производительностью и наглядностью. Принцип метода состоит в том, что суспензия бактерий вносится в лунки планшета, после инкубации в оптимальных условиях планктонная фаза популяции бактерий удаляется вместе с питательной средой, образовавшиеся биопленки выявляются различными способами.

Наиболее часто используется метод с применением 96-луночных пластиковых планшетов в различных модификациях. Метод удобен, высокопроизводителен и достаточно нагляден, однако требует стандартизации, так как одни и те же микроорганизмы обладают разной адгезивной способностью к различным поверхностям. Количественный учет связанного красителя на спектрофотометре позволяет проводить количественное сравнение способности к образованию биопленки различными микроорганизмами.

2. Изучение микробных биопленок возбудителей имплантат-ассоциированной инфекции

2.1. Порядок исследования образцов биологического материала

При проведении исследований используются питательные среды, расходные материалы и средства, перечисленные в Приложении 1 к настоящему методическим рекомендациям, либо аналогичные или с лучшими характеристиками.

Основные задачи микробиологической диагностики имплантат-ассоциированной инфекции:

1. Выделение и идентификация возбудителя до вида;
2. Определение способности возбудителя формировать биопленку;
3. Определение спектра чувствительности выделенного микроорганизма и биопленки к антимикробным препаратам;
4. Разработка рациональной антимикробной терапии на основе результатов лабораторного анализа.

Материал для микробиологического исследования при диагностике инфекционных осложнений эндопротезирования крупных суставов^{18, 19}

- отделяемое поверхностных и интраоперационных ран;
- тканевые биоптаты;
- пунктат из полости сустава;
- соникационная жидкость с удаленных компонентов эндопротеза после ультразвуковой обработки.

Взятие материала из поверхностных и интраоперационных ран осуществляется стерильными тампонами Transportswab. Удаляют отделяемое раны из поверхностных слоев, взятие материала производят из глубоких участков и/или краев раны с помощью стерильного тампона, который помещают в транспортную среду или производят прямой посев на питательные среды.

Тканевые биоптаты забирают интраоперационно (из 3-5 точек для каждого пациента) общим объемом около 1 см³ в одноразовый стерильный пластмассовый контейнер. Биоптаты взвешивают для количественного определения микробной обсемененности, гомогенизируют, готовят разведения биоматериала, высевают по 0,3 мл на плотные и жидкие питательные среды. Для не количественного исследования фрагменты биоптата помещают в жидкие питательные среды, избегая контаминации образцов. Повторные высевы на плотные питательные среды проводят на 5 и 14 сутки.

Удаленные компоненты эндопротеза помещают в стерильный пакет, добавляют 50-100 мл стерильного раствора 0,9% NaCl, обрабатывают с помощью ультразвуковой установки при частоте ультразвуковых колебаний 37 кГц в течение 10 минут, затем жидкость высевают в количестве 0,3 мл на плотные питательные среды. Выделение и идентификацию микроорганизмов осуществляют по общепринятой методике (Приказ МЗ СССР №535 от 22.04.1985 г. «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений»). Высев исследуемого материала производят на селективные и дифференциально-диагностические питательные среды: 5% кровяной агар (основа агара Agarnutrient), среда Эндо (EndoAgar, Special), желточно-

¹⁸ СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

¹⁹ Приказ Минздрава СССР от 22 апреля 1985 г. № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».

солевой агар (основа агара Gelatin Mannitol Salt Agar (Staphylococcusagar №110)). Посевы инкубируют при 37 °С до 14 суток. После окончания инкубации при появлении бактериального роста изучают морфологические, культуральные и тинкториальные свойства микроорганизмов; для дифференциации бактерий проводят окраску по Граму (набор реагентов для окраски по Граму). Идентификацию возбудителей проводят на микробиологическом анализаторе BD BBL™ Crystal™ AutoReader с применением панелей Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID Kit, Crystal™ Gram-Positive ID Kit или с использованием тест-систем для идентификации микроорганизмов.

Для пробоподготовки используют нефелометр Densi-La-Meter, предназначенный для определения мутности бактериальной взвеси в единицах по МакФарланду (от 0,0 до 15). Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам проводят диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам». В исследовании использовали питательную среду Mueller-Hinton-Agari сенси-диски с антибиотиками.

2.2. Формирование биопленок в полистироловом планшете

Для формирования микробных биопленок используют культуру, культивированную на агаре Мюллера-Хинтона при температуре 37 °С. Культивирование проводят в течение 18-20 ч при температуре 37 °С.

Количественную оценку интенсивности формирования биопленок клиническими штаммами грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов проводят в 96-луночном плоскодонном полистироловом планшете, использование которого дает возможность одновременно изучать несколько штаммов микроорганизмов. Плоское дно лунок дает возможность спектрофотометрического измерения оптической плотности элюатов красителя.

Этапы культивирования микробной биопленки в полистироловом планшете:

1. Приготовление взвеси изучаемого штамма в бульоне Мюллера-Хинтона с использованием Densi-La-Meter (Pliva-Lachema Diagnostika, Чехия) с оптической мутностью 1,0 McF (по шкале McFarland), что эквивалентно $3,0 \cdot 10^8$ КОЕ/мл.

2. Инокуляция взвеси в лунки планшета по 200 мкл с использованием стерильных наконечников и многоканального дозатора. Один штамм рекомендуется использовать в 12 повторностях, что дает возможность получить статистически достоверные данные и позволяет изучать одновременно 6 штаммов на одном планшете. В качестве

отрицательного контроля используют лунки с 200 мкл бульона Мюллера-Хинтона без добавления бактериальной суспензии, положительным контролем служат штаммы с установленной способностью к пленкообразованию *S. aureus* ATCC 6538, *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 и др.

3. Инкубация микробной взвеси при температуре 37 °С в течение 1-4 суток в зависимости от возбудителя и задач эксперимента. Рекомендуется помещать планшеты в стерильный герметичный пакет или заклеивать стерильной пленкой для предотвращения высыхания питательной среды.

4. После окончания инкубации удаляют надосадочную жидкость с планктонной культурой вручную с использованием дозаторов или с помощью автоматических планшетных промывателей (вошеров) трехкратно, используя 150 мкл дистиллированной воды за один цикл. После последнего цикла промывки воду полностью удаляют.

5. Окраска биопленки с помощью 0,1% водного раствора кристаллического фиолетового: добавляют по 200 мкл красителя в каждую лунку с использованием многоканального дозатора. Оставляют планшеты с красителем на 20 минут при комнатной температуре, после чего удаляют краситель из лунок. Краситель, не связавшийся с биопленкой, удаляют трехкратной промывкой дистиллированной водой с помощью многоканального дозатора или автоматического промывателя.

6. Планшеты высушивают на фильтровальной бумаге, после чего для количественной оценки интенсивности пленкообразования проводят экстракцию красителя, добавляя по 200 мкл 96 % этанола. Экспозиция 20 минут при комнатной температуре.

7. Измерение оптической плотности элюатов проводят с помощью спектрофотометра при длинах волн 490 нм и 560 нм.

2.3. Учет и интерпретация полученных результатов

2.3.1. Оценка биопленкообразующей способности штамма

Оценка оптической плотности спиртовых экстрактов генцианового фиолетового отражает вероятность формирования микробной биопленки в перипротезной области изучаемым штаммом возбудителя имплантат-ассоциированной инфекции и характер инфекционного процесса.

Для определения биопленкообразующей способности штамма рассчитывают среднее значение оптической плотности двенадцати опытных лунок (ОПО_{ср} – средняя оптическая плотность опытных лунок).

Для контрольных лунок (отрицательный контроль) подсчитывают значение $ОПК' = ОПК_{ср} + 3 \times \sigma$ (от ОПК),

где ОПК – оптическая плотность контроля;

ОПК_{ср} – среднее значение оптической плотности контроля.

Полуколичественная оценка способности штаммов формировать биопленку основана на следующей схеме интерпретации полученных результатов: в случае, если средняя оптическая плотность опытного штамма (ОПО_{ср}) меньше или равна величине ОПК, способность штамма формировать биопленку отсутствует.

Низкая способность штамма к пленкообразованию детектируется в случае, если средняя оптическая плотность опытных лунок (ОПО_{ср}) выше ОПК, но ниже двукратной величины ОПК. У штаммов с умеренной способностью к биопленкообразованию величина ОПО_{ср} находится в диапазоне между двукратной и четырехкратной величинами ОПК. Высокая способность к формированию биопленок определяется у штаммов, для которых характерно четырехкратное превышение ОПО_{ср} над ОПК.

2.3.2. Подсчет массы бактериальной биопленки

Пересчет единиц оптической плотности в массу бактериальной биопленки в мкг на одну лунку 96-луночного полистиролового плоскодонного планшета осуществляют с помощью формулы [5], в которой предлагается сопоставление оптической плотности элюатов контрольных и опытных проб с массой высушенной неокрашенной биопленки.

$$X = 226,28 * [E_{оп} \text{ пробы} - E_{оп} \text{ контроля}]^{1,2755},$$

где X – масса биопленки.

2.3.3. Оценка вероятности формирования биопленки при инфекционно-воспалительном процессе в области оперативного вмешательства

При сопоставлении оптической плотности элюатов кристаллического фиолетового, характеризующих интенсивность биопленкообразования данным штаммом с оптической плотностью планктонной культуры в надсадочной жидкости оценивается вероятность развития инфекционно-воспалительного процесса с формированием биопленки в области оперативного вмешательства. Способ прогнозирования предполагает оценку результатов

по отдельным показателям в баллах и затем по сумме баллов всех показателей возможно прогнозирование имплантат-ассоциированной инфекции²⁰.

Используют следующие показатели:

1) *Оптическая плотность спиртовых экстрактов биопленок, окрашенных генциановым фиолетовым*

- значение оптической плотности более или равное 0,15 соответствует 2 баллам;

- значение оптической плотности экстрактов менее 0,15 соответствует 1 баллу;

2) *Оптическая плотность планктонной культуры*

- оптическая плотность более или равное 0,91 соответствует 1 баллу;

- оптическая плотность менее 0,91 соответствует 2 баллу.

Интерпретация результатов:

4 балла – наличие биопленкообразующей способности у данного штамма;

3 балла – для подтверждения способности штамма к формированию биопленки необходимы дополнительные исследования;

2 балла – отсутствие биопленкообразующей способности у данного штамма.

²⁰ Программа оценки интенсивности образования биопленок возбудителей имплантат-ассоциированной инфекции / В.Ю. Ульянов, И.В. Бабушкина, И.А. Мамонова, Е.В. Гладкова // Свидетельство о регистрации программы для ЭВМ 2021617712, 18.05.2021. Заявка № 2021617105 от 18.05.2021.

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте характеристику этиопатогенетической роли биопленкообразования при имплантат-ассоциированной инфекции.
2. Перечислите и охарактеризуйте основные стадии образования биопленок на абиотических и биогических поверхностях.
3. Опишите основные методы экспериментального формирования биопленок.
4. Каковы основные задачи микробиологической диагностики имплантат-ассоциированной инфекции?
5. Какие биологические материалы могут использоваться для микробиологического исследования при диагностике имплантат-ассоциированного воспаления?
6. Каковы основные этапы культивирования микробной биопленки в полистироловом планшете?
7. Перечислите этапы учета и критерии интерпретации результатов оценки биопленкообразования.
8. Каковы основные способы оценки биопленкообразующей способности штамма?
9. Опишите методику подсчета массы бактериальной биопленки.
10. Каковы способы оценки вероятности формирования биопленки при имплантат-ассоциированной инфекции?

Основная литература

1. Кишкун, А. А. Клиническая лабораторная диагностика : том 1 : учебник : в 2 т. / А. А. Кишкун, Л. А. Беганская. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2021. - 784 с. - ISBN 978-5-9704-6084-9. - Текст : электронный // ЭБС «Консультант студента» : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970460849.html> (дата обращения: 19.08.2021). - Режим доступа : по подписке.
2. Кишкун, А. А. Клиническая лабораторная диагностика : том 2 : учебник : в 2 т. / А. А. Кишкун, Л. А. Беганская. - 2-е изд., перераб. и доп. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2021. - 624 с. - ISBN 978-5-9704-6085-6. - Текст : электронный // ЭБС «Консультант студента» : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970460856.html> (дата обращения: 19.08.2021). - Режим доступа : по подписке.
3. Новикова И.А. Введение в клиническую лабораторную диагностику : учебное пособие / Новикова И.А.. — Минск : Вышэйшая школа, 2018. — 368 с. — ISBN 978-985-06-2913-5. — Текст : электронный // Электронно-библиотечная система IPR BOOKS : [сайт]. — URL: <http://www.iprbookshop.ru/90748.html> (дата обращения: 19.08.2021). — Режим доступа: для авторизир. Пользователей
4. Долгов, В. В. Клиническая лабораторная диагностика. В 2 томах. Том 1. : национальное руководство / Под ред. В. В. Долгова - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 928 с. (Серия «Национальные руководства») - ISBN 978-5-9704-2467-4. - Текст : электронный // ЭБС «Консультант студента» : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970424674.html> (дата обращения: 19.08.2021). - Режим доступа : по подписке.
5. Долгов, В. В. Клиническая лабораторная диагностика. В 2 томах. Том 2 : национальное руководство / Под ред. В. В. Долгова - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 808 с. (Серия «Национальные руководства») - ISBN 978-5-9704-2131-4. - Текст : электронный // ЭБС «Консультант студента» : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970421314.html> (дата обращения: 19.08.2021). - Режим доступа : по подписке.

Дополнительная литература

1. Мионов, С. П. Ортопедия. Глава 39. Перипротезная инфекция в области крупных суставов конечностей / под ред. Миронова С. П. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2018. - 784 с. - ISBN 978-5-9704-4520-4. - Текст : электронный // ЭБС "Консультант студента" : [сайт]. - URL : <https://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970445204.html> (дата обращения: 19.08.2021). - Режим доступа : по подписке.
2. Мухачев, С.Г. Методика лабораторного культивирования аэробных микроорганизмов и определение энергетических параметров микробного роста : учебное пособие / Мухачев С.Г.. — Казань : Казанский национальный исследовательский технологический университет, 2011. — 78 с. — ISBN 978-5-7882-1106-0. — Текст : электронный // Электронно-библиотечная система IPR BOOKS : [сайт]. — URL: <http://www.iprbookshop.ru/61984.html> (дата обращения: 19.08.2021). — Режим доступа: для авторизир. пользователей.
3. Белик, К.Д. Биомеханика. Основные понятия. Эндопротезирование тканей и органов : учебное пособие / Белик К.Д., Пель А.Н.. — Новосибирск : Новосибирский государственный технический университет, 2014. — 104 с. — ISBN 978-5-7782-2523-7. — Текст : электронный // Электронно-библиотечная система IPR BOOKS : [сайт]. — URL: <http://www.iprbookshop.ru/45079.html> (дата обращения: 19.08.2021). — Режим доступа: для авторизир. пользователей.

Периодические издания

1. «Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия» – научно-практический журнал, посвящён проблемам антимикробной терапии и клинической микробиологии. Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU https://www.elibrary.ru/title_about_new.asp?id=8773 — Режим доступа: для авторизир. пользователей.

Приложение 1

Оборудование, расходные материалы, питательные среды, реагенты и реактивы

1. Желчно-экскулиновый агар с азидом натрия.
2. Агар для выделения стафилококков. Предназначен для селективного выделения и дифференциации клинически значимых стафилококков. Представляет собой гомогенный сыпучий светло-желтый порошок. Состав: гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, желатин, лактоза, D-маннит, натрия хлорид, калия гидрофосфат, натрия азид, агар-агар.
3. Среда Мюллера-Хинтона. Предназначена для культивирования нейссерий и определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным средствам.
4. Набор реагентов для окраски по Граму (с сафранином). Предназначен для дифференцировки микроорганизмов по отношению к окраске по Граму. Состав набора, не менее: бумага, окрашенная генцианвиолетом (100 шт.); раствор Люголя 2 x 50 мл; раствор сафранина 2 x 50 мл. Набор рассчитан на проведение не менее 100 определений.
5. Зонд-тампон для отбора, транспортировки и хранения биологических проб в комплекте с пробиркой с транспортной средой Стюарта. Предназначен для взятия, хранения и транспортировки в клиническую лабораторию биологического материала. Среда Стюарта представляет собой полужидкий, бедный питательными веществами субстрат и предназначена для сохранения и транспортировки широкого спектра микроорганизмов.
6. Питательная среда для определения антибиотикочувствительности микроорганизмов сухая.
7. Тест для обнаружения бактериальной цитохромоксидазы. Предназначен для выявления бактериальной цитохромоксидазы. Учет цветной реакции в течение не более 1 мин. При положительной реакции окраска синяя, при отрицательной – серая. В упаковке не менее 50 полосок в тубе, инструкция для пользователя. Упаковка рассчитана на проведение не менее 50 определений.
8. Тест-система для идентификации микроорганизмов. Грам-положительный идентификационный набор для микробиологического анализатора «BD BBL™ Crystal™ AutoReader». Система должна осуществлять идентификацию соответствующих групп

микроорганизмов не более 18 часов. Система должна быть индивидуально стрипирована для каждого отдельного штамма микроорганизмов. Представляет собой основание панели с лунками и крышку с 30 субстратами. Набор с панелями должен содержать пробирки с физиологическим раствором для приготовления суспензии идентифицируемых микроорганизмов. Система не должна требовать раскапывание по лункам, конструкция панелей должна позволять заливать в них бактериальную суспензию непосредственно из пробирки, полным объемом и без помощи пипетки, заполняя все лунки панели. Набор рассчитан на проведение не менее 20 тестов.

9. Тест-система для идентификации микроорганизмов. Энтеро/неферментирующий идентификационный набор для микробиологического анализатора «BD BBL™ Crystal™ AutoReader». Система должна осуществлять идентификацию соответствующих групп микроорганизмов не более 20 часов. Система должна быть индивидуально стрипирована для каждого отдельного штамма микроорганизмов и представлять собой основание панели с лунками и крышку с 30 субстратами. Набор с панелями должен содержать пробирки с физиологическим раствором для приготовления суспензии идентифицируемых микроорганизмов. Система не должна требовать раскапывание по лункам, конструкция панелей должна позволять заливать в них бактериальную суспензию непосредственно из пробирки, полным объемом и без помощи пипетки, заполняя все лунки панели. Набор рассчитан на проведение не менее 20 тестов.

10. Наконечники для дозаторов. Выполнены из первичного полипропилена, полностью автоклавируемые, стерильные.

11. Пробирки микроцентрифужные (Эппендорф). Предназначена для транспортировки, хранения и центрифугирования микропроб биоматериала. Представляет собой градуированную микроцентрифужную пробирку с защелкивающейся крышкой. Изготовлена из полипропилена, что обеспечивает возможность автоклавирования в стандартном режиме. Объем – 1,5 мл. Размеры: диаметр – 10 мм, высота – 42 мм. С делениями, цена деления – 0,5 мм. В упаковке не менее 500 штук.

12. Тампон-зонд. Предназначен для взятия и хранения образцов биологического материала с целью безопасной транспортировки в лабораторию для проведения анализа. Длина от 149 мм до 151 мм. Материал аппликатора – пластик; диаметр аппликатора – от 2,4 мм до 2,6 мм. Материал головки – хлопок; диаметр головки от 4 до 5 мм. Для взятия смывов, в том числе санитарных. Стерильный, инд. упаковка. В упаковке не менее 100 штук.

13. Контейнер для биопроб. Обеспечивает полную герметичность при транспортировке биологического материала. Объем от 59 до 60 мл. Внутренний диаметр горловины – не менее 47 мм. Высота – не менее 60 мм. Изготовлен из ультрарастяжимого полипропилена. Имеет градуировку (цена деления – 10 мл) и матовое окошко для записи. Стерильный, инд. упаковка. В упаковке не менее 290 штук.

14. Пипетки для переноса жидкости (Пастера). Предназначены для дозирования растворов при проведении серологических и бактериологических исследований. Пипетки изготовлены из полиэтилена низкого давления (ПЭНД). Объем – 1 мл. Длина не менее 150 мм. На каждую пипетку нанесена рельефная градуировка (цена деления 0,25 мл). Постоянный диаметр носика позволяет всегда получать каплю заданного объема (капель в 1 мл – не менее 21 шт.). Замкнутый резервуар для заполнения обеспечивает безопасность работы. В упаковке не менее 500 штук.

15. Планшет для лабораторных исследований общего назначения. Количество лунок 96 штук. Крышка: Есть. Назначение: Для иммунологических реакций. Покрытие лунок: Нет. Прозрачный: Да. Стерильность: Есть. Тип лунки: Плоскодонная. Тип планшета: Неразборный.

16. Материал упаковочный для стерилизации: пакеты бумажные самоклеящиеся. Изготовлены из крафт-бумаги. Размер, не менее: 300 x 450 мм. Предназначены для паровой, воздушной, пароформальдегидной, этиленоксидной и радиационной стерилизации. Легко проницаемы для соответствующих стерилизующих агентов, в закрытом виде непроницаемы для микроорганизмов, сохраняют целостность после стерилизации соответствующим методом. Соответствуют требованиям ГОСТ ISO 11607-2011, EN 868.

17. Наконечники для дозаторов. Выполнены из первичного полипропилена, полностью автоклавируемы, не стерильные. Объем – 200 мкл, длина – не менее 51 мм. Совместимы с дозаторами Biohit. Наличие сертификата на отсутствие RNase, DNase и эндотоксина. В упаковке не менее 10 штативов по 96 штук каждый.

18. Мясной солевой бульон. Состав (г/л): Пептический перевар животной ткани 10,00. Мясной экстракт 10,00. Ткань бычьего сердца нейтральная 30,00. Натрия хлорид 100,00. Конечное значение pH (при 25 °C) 7,6 ± 0,2. Стерилизовать автоклавированием при 1,1 агм (121 °C) в течение 15 мин.

19. Элективно-солевой агар. Состав (г/л): Пептон ферментативный сухой 5,00. Гидролизат рыбный ферментативный 5,00. Триптон (гидролизат казеина ферментативный) 3,00. Экстракт автолизированных дрожжей осветленный 1,40. Натрий

хлористый 85,00. Агар микробиологический 11,00. Натрий углекислый 0,30. Натрий фосфорнокислый двузамещенный безводный 0,30. Конечное значение pH $7,2 \pm 0,2$. Стерилизовать автоклавированием при 1,1 атм. (121 °C) в течение 15 мин.

20. Стафилококковый агар № 110. Состав (г/л): Гидролизат казеина 10,00. Дрожжевой экстракт 2,50. Желатин 30,00. 12 МР 4.2.0161-19 Лактоза 2,00. D-Маннит 10,00. Натрия хлорид 75,00. Калия гидрофосфат 5,00. Натрия азид – агар-агар 15,00. Конечное значение pH (при 25 °C) $7,0 \pm 0,2$. Стерилизовать автоклавированием при 1,1 атм. (121 °C) в течение 15 мин. Питательные среды и реактивы для выявления и определения количества коагулазопозитивных стафилококков и *Staphylococcus aureus* готовят в соответствии с ГОСТ 31746.1.

21. Питательные среды и реактивы для выявления бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* готовят в соответствии с ГОСТ 28560.

22. 0,1% водный раствор кристаллического фиолетового.

23. 96% этанол

24. «BD BBL™ Crystal™ AutoReader».

25. Микроскоп бинокулярный.

26. Термостат суховоздушный лабораторный ТС-1/80 температура инкубации 37 °C.

27. Автоклав SYSTECVX95.

28. Пробирка полимерная с наполнителем (зондом с хлопковым наконечником);

29. Чашки Петри.

30. Стекла предметные стерильные.

31. Дозатор и стерильные сменные наконечники.

32. Петля микробиологическая.

33. Наборы, предназначенные для идентификации наиболее важных для патологии человека микроорганизмов Микро-ЛА-Тест: ЭНТЕРОтест16, СТАФИтест16, НЕФЕРМтест24, СТРЕПРОтест16.

34. Денси-ЛА-метр (Нефелометр).

35. Стандарты МакФарланда.

36. Дозаторы переменного объема полуавтоматические.

37. Спиртовка.

38. Холодильник фармацевтический.

39. Компьютер, принтер.

40. Антисептическое мыло и кожный антисептик.

41. Одноразовые перчатки.

42. КБСУ для медицинских отходов класса Б.