

Современный взгляд на микробиологическую лабораторию

• **Александр ПОЛТАВСКИЙ**,
микробиолог

Лечение инфекционных заболеваний, борьба с растущей резистентностью бактерий к антибиотикам – традиционная большая проблема для любых медицинских учреждений. На переднем крае борьбы с ней – микробиологическая лаборатория. Именно надёжность её работы определяет эффективность антимикробной терапии и рациональное применение антибактериальных препаратов (АБП).

Бактерии живут на Земле более двух миллиардов лет, из них лишь последние несколько тысяч лет они сосуществуют с человеком. Как видно, болезнетворные микробы имели достаточно времени для приспособления к поражению человеческого организма и ежечасно продолжают совершенствовать свои способности, так что недооценивать их недопустимо. Человек же до конца XIX в. вообще не имел представления о микроорганизмах, а существенные успехи в противостоянии им были достигнуты лишь в XX в.: мы научились выделять возбудителей болезней, идентифицировать их, изучать их свойства, бороться с ними.

Одним из величайших открытий стало открытие антибиотиков, лекарственных препаратов с антимикробными свойствами. Сегодня терапия с помощью антибактериальных препаратов (АБП) является основным оружием против бактериальных заболеваний. Но перед медициной встала новая проблема – неграмотное использование АБП провоцирует изменение резистентности микроорганизмов, что может сделать антибиотик бесполезным и свести на нет все усилия клинических микробиологов, эпидемиологов и терапевтов.

В данной статье вы познакомитесь как с проверенными временами основами работы баклабораторий, так и с инновациями в сфере лабораторных микробиологических исследований, которые призваны на современном уровне решать проблемы идентификации микроорганизмов и оценки их чувствительности к антибиотикам.

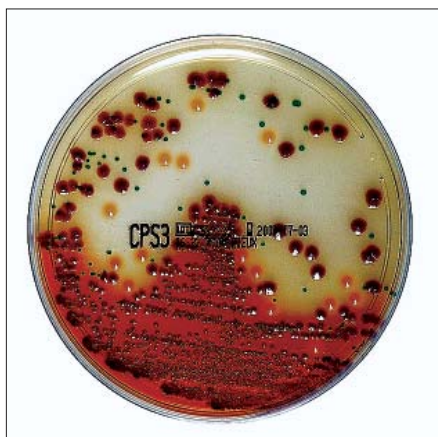
«Сладкий» дым отечества

Микробиология – особая отрасль, и не только потому, что является весьма специализированной и сложной для непосвящённых. Высокая изменчивость микроорганизмов вынуждает лабораторию всегда быть начеку; це-

на ошибки – не только здоровье и жизнь пациента, но и эпидемиологическое благополучие региона. Ежедневно микробиологи встречаются с целым рядом проблем, которые влияют на эффективность микробиологических исследований: рост стоимости лечения, неверное применения антибиотиков, бич современности – внутрибольничные инфекции, рост антибиотико-резистентности микроорганизмов. Вместе с тем, растут и требования к качеству результата микробиологического анализа – быстрее, информативнее, надёжнее...

Однако уровень развития микробиологических исследований в Украине не отвечает современным потребностям. В нашей стране уровень стандартизации и автоматизации микробиологических исследований остается одним из самых низких среди европейских стран. Это приводит к многочисленным ошибкам анализов, которые часто остаются незамеченными, результаты выдаются с большой задержкой и не соответствуют запросам клиницистов, что формирует низкий спрос на микробиологические исследования.

Чехарда с ведомственной и отраслевой принадлежностью бактериологических лабораторий привела к тому, что этот вид диагностики занимает мизерную долю среди всех видов лабораторных исследований и традиционно финансируется по остаточному принципу. Исследования по санитарной микробиологии выполняются лабораториями СЭС, часто без учета специфики лечебных учреждений. В то же время, в странах Европейского Союза бактериологические исследования составляют до 30-50% (!) всех лабораторных исследований, проводятся с использованием бактериологических анализаторов, коммерческих готовых питательных сред, систем экспресс-диагностики, референсных систем, оборудования для



Хромогенная среда для быстрой дифференцировки *E. coli*, *Proteus* и *Enterococci*

культивирования гемокультур и пр.

Не уделяется должное внимание оценке чувствительности микроорганизмов к АБП. Сегодня в большинстве баклабораторий Украины чувствительность микроорганизмов определяется в лучшем случае ручным «дисковым» методом, который является весьма субъективным и требует значительного времени и усилий персонала даже при анализе всего нескольких антибиотиков в одной концентрации каждый. Вследствие этого, типичной клинической практикой является назначение пациентам заведомо высоких доз антибиотиков с целью получения терапевтического эффекта наверняка. Такой подход, уже сегодня приведший к появлению полирезистентных штаммов патогенных микроорганизмов и повышению восприимчивости населения к бактериальным инфекциям, нельзя считать современным и терапевтически корректным. Уже сегодня он составляет прямую угрозу здоровью населения Украины и других стран: например, согласно плану ВОЗ борьбы с туберкулезом на 2007–2015 гг., Украина входит в группу риска для стран ЕС (!) по этой инфекции.

«Кухня» баклаборатории

Особенностью любой микробиологической лаборатории, – и важным отличием её от прочих структур КДЛ, – является необходимость соблюдения некоторых стандартных требованиях как к организации помещений лаборатории, так и к обеспечению работы в них. Делается это с целью обеспечения оптимальных условий для биологической безопасности и недопущению распространения инфекционного материала в пределах лаборатории и наружу.

Подробную информацию о нормах организации баклабораторий можно найти, например, в «Правилах влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю», утверждённых Государственной санитарно-эпидемиологической службой и МОЗ Украины 28.01.2002 г. Независимо от уровня и специализации лаборатории, её методической и инструментальной оснащённости, требования к планировке помещений практически одинаковы. По существующим

требованиям лаборатория условно делится на «чистую» зону, свободную от исследуемого микробиологического материала, и «грязную» или «заразную» зону, в которой осуществляется работа в непосредственном контакте с микроорганизмами. К помещениям «чистой» зоны относят: гардеробы для домашней и рабочей одежды персонала, комната для персонала, туалет, кладовые для лабораторной посуды и бактериальных препаратов, автоклавная для стерилизации посуды и питательных сред («чистая» автоклавная), средовая с боксом для розлива питательных сред и т.п. В «грязную» зону входят: помещение для приема и регистрации проб, комнаты для посева, для проведения исследований, боксы с предбоксником, моечная, автоклавная для обеззараживания отработанного материала («грязная» автоклавная) и т.п.

При количестве микробиологических исследований в лаборатории до 10 тысяч в год допускается совмещать в одном помещении проведение посева материала и идентификацию данного вида микроорганизмов (возбудителей) или группы возбудителей; при размещении лаборатории в качестве структурного подразделения, она должна быть изолирована от других помещений. Это далеко не полный список всех требований предъявляемых к устройству и работе в микробиологических лабораториях. Разработку плана-схемы, выдачу разрешений микробиологическим лабораториям осуществляют режимные комиссии.

Этапы микробиологического исследования

Традиционные этапы микробиологического исследования:

1. Забор и транспортировка материала.
2. Посев на агаровые культуральные среды разной селективности.
3. Инкубирование для изоляции и/или накопления «чистой» культуры микроорганизмов.
4. Идентификация культур.
5. Определение чувствительности культур к АБП.
6. Утилизация или хранение культур. Основной целью являются этапы

4 и 5, поскольку именно они определяют диагностику и дальнейшее лечение. Общая длительность процесса занимает от 2–3х суток до нескольких недель и в целом зависит от биологических свойств микроорганизмов и ростовых свойств используемых культуральных сред.

К сожалению, скорость роста микроорганизмов на культуральных средах накладывает ограничение на скорость получения результата всего анализа, а получение «чистой культуры» остаётся необходимым его условием. Однако использование новых достижений микробиологии позволяет достичь определённого выигрыша во времени и освободить лаборанта от дополнительных действий. Например, использование хромогенных агаровых культуральных сред, которые специфично окрашивают культуру в процессе её роста, по сути даёт возможность одновременную изоляцию и цветовую качественную идентификацию необходимого патогена (см. фото). Композиция таких сред весьма сложна, приготовить их в лаборатории нереально даже в разовом исполнении, поэтому коммерческие среды поставляются в готовом виде, в чашках Петри, полностью пригодные для непосредственного использования.

При необходимости можно воспользоваться знаменитыми тест-системами API® (bio-Mérieux, Франция), появление которых в своё время совершило революцию в микробиологии, поскольку стало первой в истории успешной попыткой оптимизировать рутинные процедуры микробиологического исследования. API – это планшеты, в микролунках которых находятся дегидрированные биохимические субстраты (см.



Тест-системы API – золотой стандарт для идентификации микроорганизмов

фото). При внесении суспензии культуры в лунки, она взаимодействует с субстратами, в результате чего — «цветная реакция», аналогичная рядам Гисса. Идея предельно проста, однако, сам факт освобождения лаборантов от рутинного приготовления субстратов, фабричная стандартизация этого процесса и более высокая надежность продукта стали хорошим плацдармом для развития новых технологий в микробиологии.

Более современной альтернативой являются микробиологические анализаторы, позволяющие автоматизировать считывание тест-систем и интерпретировать полученный результат. Начальные этапы работы на любом бактериологическом анализаторе схожи: в первую очередь необходимо получить чистую молодую (18–24 часа) культуру возбудителя, после чего провести микроскопию и окрашивание по Граму, а также поставить ряд ориентировочных тестов. Эта первичная информация о возбудителе определяет выбор тестов или готовых тест-систем для дальнейшей работы с культурой уже на приборе. Использование готовых коммерческих тест-систем (панелей, стрипов, планшет и т.п.), с одной стороны, существенно упрощает и ускоряет схему проведения идентификации возбудителя и определение антибиотикограммы, а с другой стороны, по-



Автоматический микробиологический анализатор VITEK 2 Compact

зволяет получить высокоспецифичный стандартизованный результат.

Особое место в бактериологии занимают современные полностью автоматизированные приборы, в которых заполнение тест-систем суспензией, инкубация культур, считывание результата (идентификация и антибиотикограмма) и его обработка проходят без рутинного участия лаборанта. Такие приборы разрабатывались для ускорения получения результатов идентификации и чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, путем повышения стандартизации всех этапов анализа и повышения качества работы. Например, реализованный в анализаторах VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Франция, см. фото) динамический мониторинг биохимических реакций микроорганизмов с многочисленными субстратами, а также оригинальное программное обеспечение позволяют получить результат по идентификации микроорганизмов через 2–3 часа, а антибиотико-чувствительность — уже через 6 часов после получения чистой культуры патогенна.

Такие технические новинки, высвобождая время лаборанта, тем самым влияют на рабочий

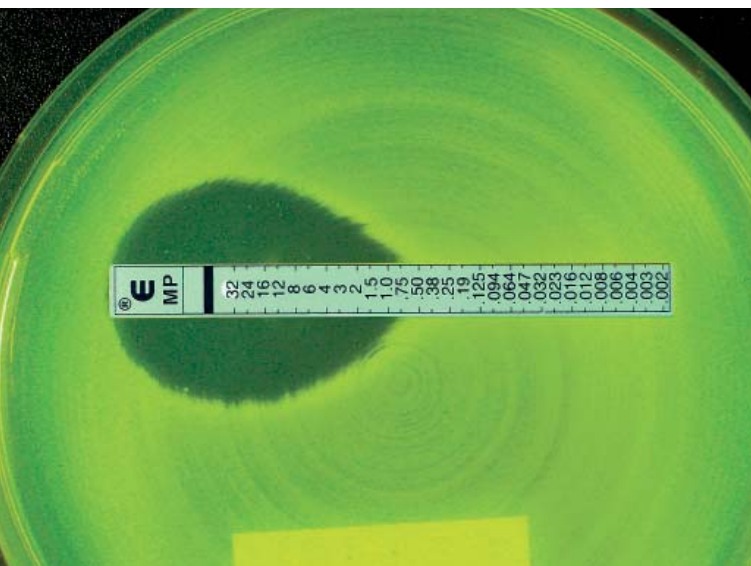
поток всей клинической микробиологической лаборатории. Заботой лаборанта микробиолога остается: предподготовка образца, получение чистой культуры, постановка ориентировочных тестов, приготовление суспензии тестируемых микроорганизмов, установка тест-систем в прибор и введение данных о пациенте.

Анализаторы VITEK 2 Compact могут быть использованы вместе с не менее интересной разработкой фирмы bioMérieux — анализаторами бактериального роста BacT/ALERT® 3D (см. фото). Это уникальное оборудование способно быстро анализировать кровь и другие первично стерильные жидкости организма, неспецифически выявляя септическое загрязнение (в среднем — уже через несколько часов!). После полученного позитивного результата, говорящего о контаминации, кровь высевается на среды для наращивания культуры микроорганизмов или может непосредственно анализироваться с помощью VITEK 2 Compact.

Точное определение патогенного микроорганизма и развернутую антибиотикограмму с указанием индивидуальных эффективных концентраций антибиотиков можно получить уже к концу 2-х суток после взятия крови у пациента. В отличие от этого, применяемые сегодня протоколы позволяют получить подобный результат через 2–2,5 недели. Таким образом, использование описанного оборудования дает существенный



Автоматический анализатор стерильности крови BacT/ALERT



Зоны задержки роста при использовании тест-системы E-test

выигрыш во времени получения результата, что позволяет раньше начинать целенаправленные терапевтические мероприятия и может значительно повысить выживаемость пациентов.

Минимальная ингибирующая концентрация (МИК)

Необходимо признать, что получение антибиотикограммы дисковым методом, опирающемся на интерпретацию зон задержки роста на агаре Мюллера-Хинтона, пришедшему на смену агару АГВ, следует считать устаревшим методом.

Сегодня в мире каждый уважающий себя врач стремится сделать антибиотико-терапию максимально щадящей, не потеряв при этом в её эффективности, — и опирается на минимальные ингибирующие концентрации (МИК) антибиотиков: определяется минимальная доза АБП, к которой чувствителен тестируемый микроорганизм, и рассчитывается терапевтическая активность антибиотика как отношение его МИК к концентрации, рекомендуемой по его инструкции. Существуют два пути определения МИК: ручной (E-test) и автоматизированный (VITEK 2).

E-test® (AB-Biodisk, Швеция) представляет собой внешнее подобие индикаторной полоски, на которую нанесен градиент концентрации одного антибиотика. Полоска плашмя размещается на чашке Петри, поверх по-

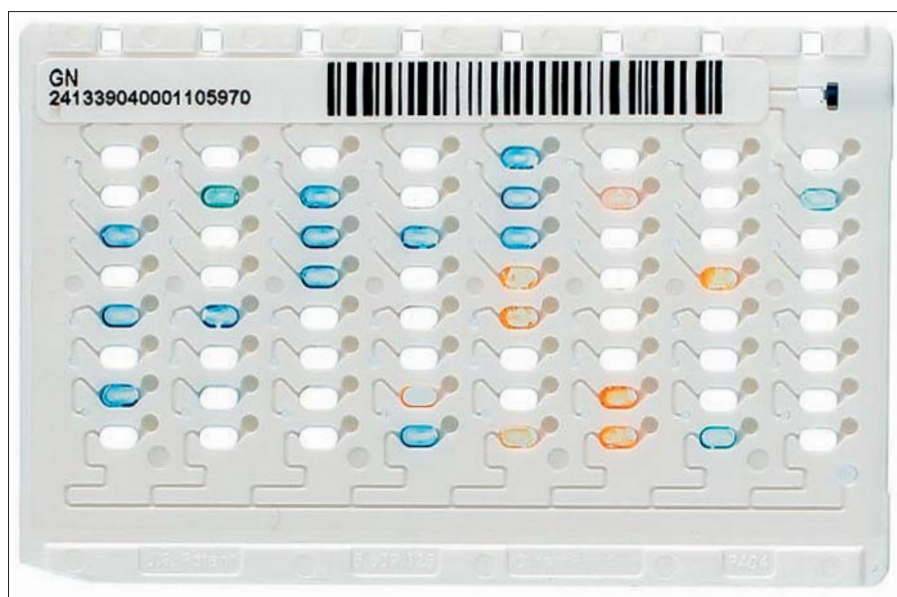
сеянной культуры (см. рис. E-test.tif). В результате стандартной инкубации выявляются задержки роста культуры в местах наиболее эффективных концентраций антибиотика — просто, как всё гениальное!

Колориметрическая технология VITEK® 2 (bioMérieux, Франция-США) представляет собой самую современную в мире возможность определения уровня

стойкости микроорганизмов на основе МИКов. Тест-система представляет собой пластиковую карточку размером с «кредитку», в которой находятся лунки с 20 антибиотиками в разных концентрациях (см. фото внизу). Для работы с карточкой нужна суспензия культуры микроорганизмов и анализатор VITEK® 2, который автоматически заправляет карточку суспензией, инкубирует её и динамически анализирует изменения роста культуры. Неоспоримыми преимуществами этого подхода являются широкий спектр анализируемых АБП, скорость получения результата: МИКи для 20 антибиотиков в среднем за 6–8 часов, — и его высокая надёжность. ■

Резюме:

Микробиологические исследования должны иметь приоритетное развитие среди других видов лабораторной диагностики. Это обусловлено массовым снижением иммунитета, широким распространением инфекционных заболеваний, поражающих все контингенты населения, бесконтрольностью применения антибиотиков и антисептиков, а также самой востребованностью микробиологической диагностики практически при всех видах медицинской помощи. Использование современных решений в медицинских учреждениях Украины позволит значительно повысить надежность и своевременность диагностики, существенно повысить эффективность отечественного здравоохранения в целом и вывести украинское здравоохранение на уровень европейских стандартов.



Тест-система для колориметрической технологии VITEK® 2