

Определение чувствительности
к антибиотикам.

Культивирование анаэробов.

Диагностика с помощью
бактериофагов

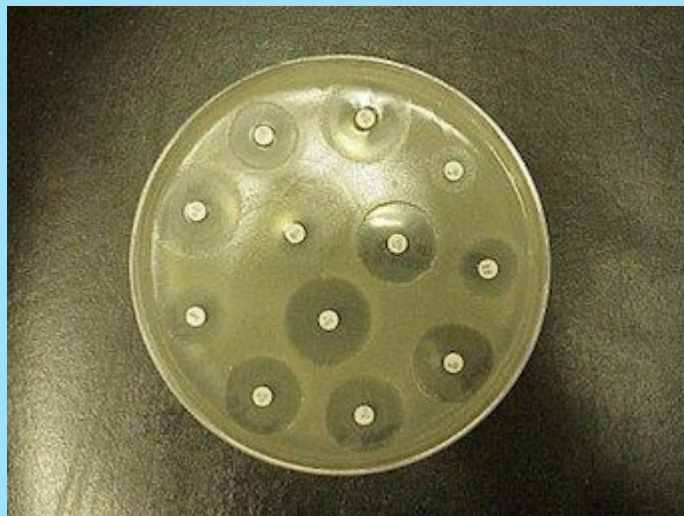
Определение чувствительности бактерий к антибиотикам диск-диффузионным методом на среде Мюллера-Хинтона



Варианты дисков с антибиотиками



Картриджи с дисками



Диспенсе



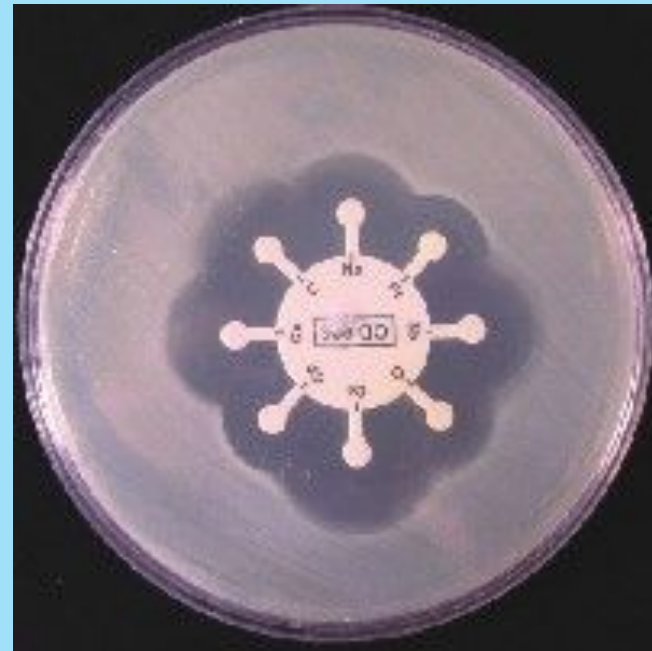
Нанесение дисков

Полидиски - новый вариант диско-диффузионного метода определения антибиотикочувствительности

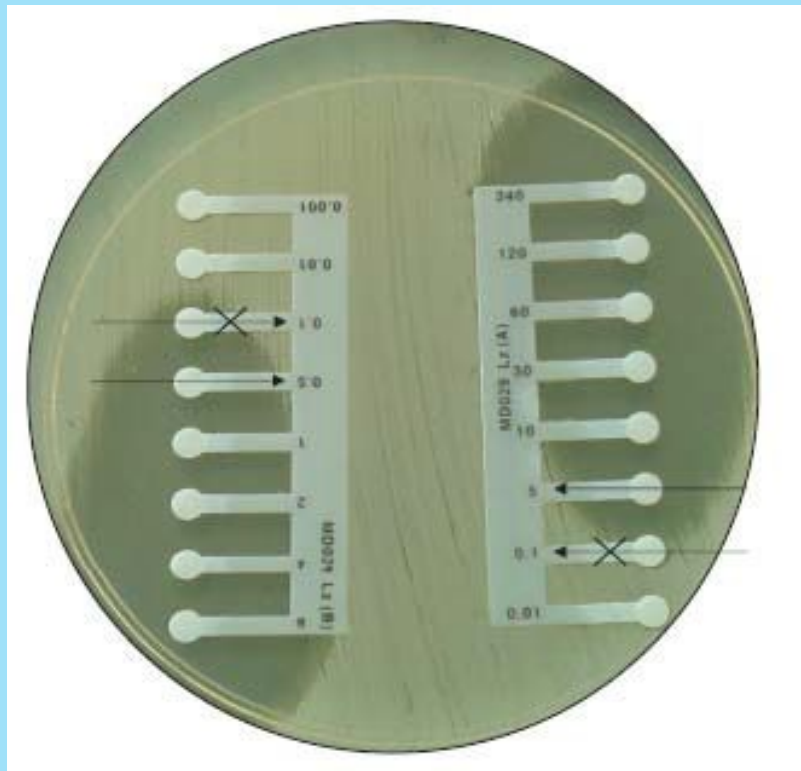
Гексадиски представляют собой набор из 6 одиночных дисков, радиально прикрепленных к пластиковой сердцевине



Октодиски представляет собой набор из 8 одиночных дисков, радиально прикрепленных к сердцевине.



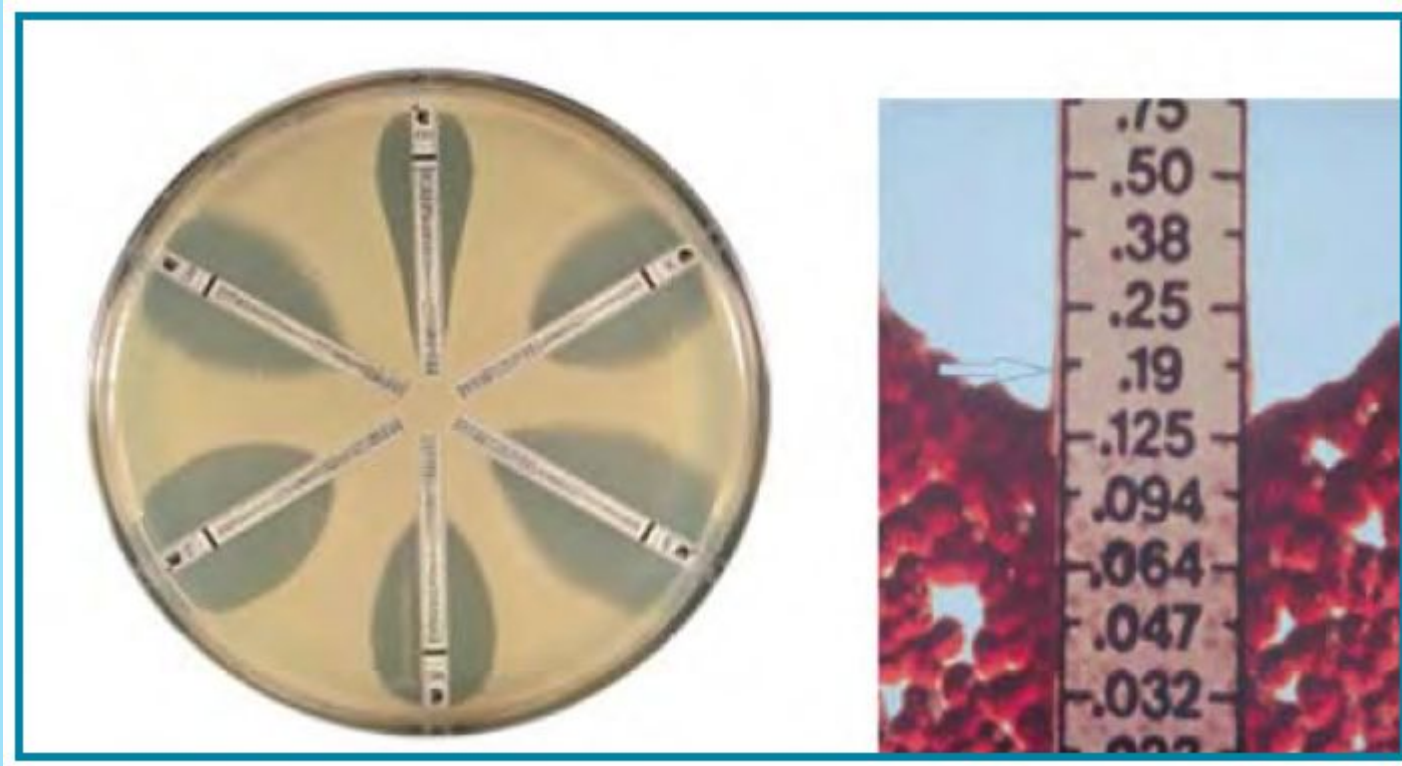
HiComb™ MIC Test (ХайКомб МИК тест)



Полоски с градиентом концентраций для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) антибиотиков представляют собой полоски, к которым прикреплены диски, пропитанные не одной, а рядом убывающих концентраций определенного антибиотика.

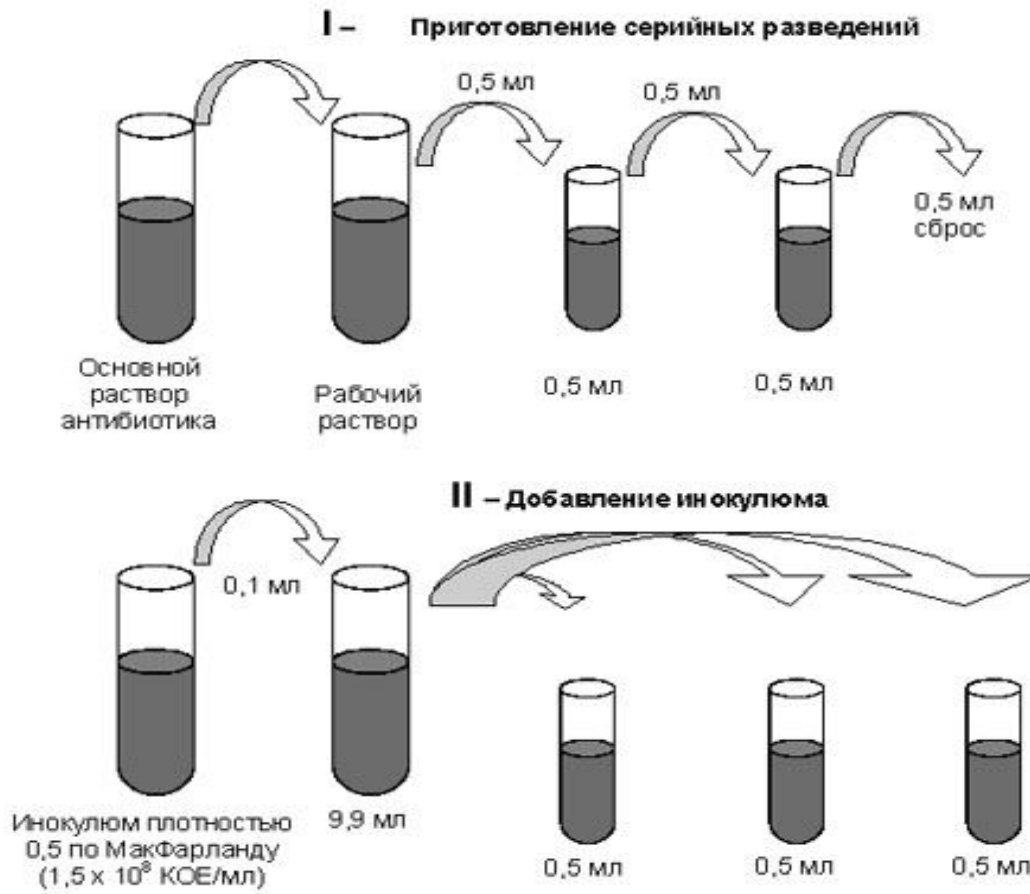
Полоски укладывают на поверхность агара, засеянного испытуемой культурой в виде «газона». После инкубирования формируется эллипсоидная зона задержки роста, позволяющая определить МИК антибиотика.

Определение МПК с помощью Е-теста



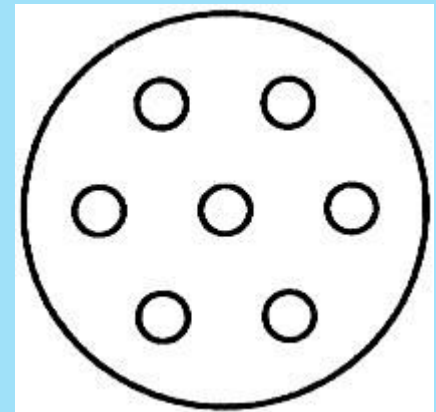
Определение МПК (минимальной подавляющей концентрации)

- **МПК** – минимальная концентрация антимикробного агента, при которой отсутствуют признаки роста бактерий в жидкой питательной среде.



Концентрация антибиотика в сыворотке крови (мкг/мл) после введения среднетерапевтических доз препарата (К)

Антибиотик	Концентрация в сыворотке (ЕД/мл)	Антибиотики	Концентрация в сыворотке (ЕД/мл)
Ампициллин	15–25	Полимиксин В	10–15
Бензилпенициллин	0,5–2	Рифампицин	15–25
Ванкомицин	10–15	Стрептомицин	20–25
Гентамицин	6–8	Тетрациклины	3–5
Канамицин	15–20	Тобрамицин	6–8
Линкомицин	10–15	Фузидиевая кислота	10–20
Метициллин	10–15	Хлорамфеникол	5–10
Оксациллин	4–6	Цефалексин	15–25
Олеандомицин	3–5	Эритромицин	3–5



Чувствительность штаммов *Staphylococcus* spp. к антибактериальным препаратам (%)

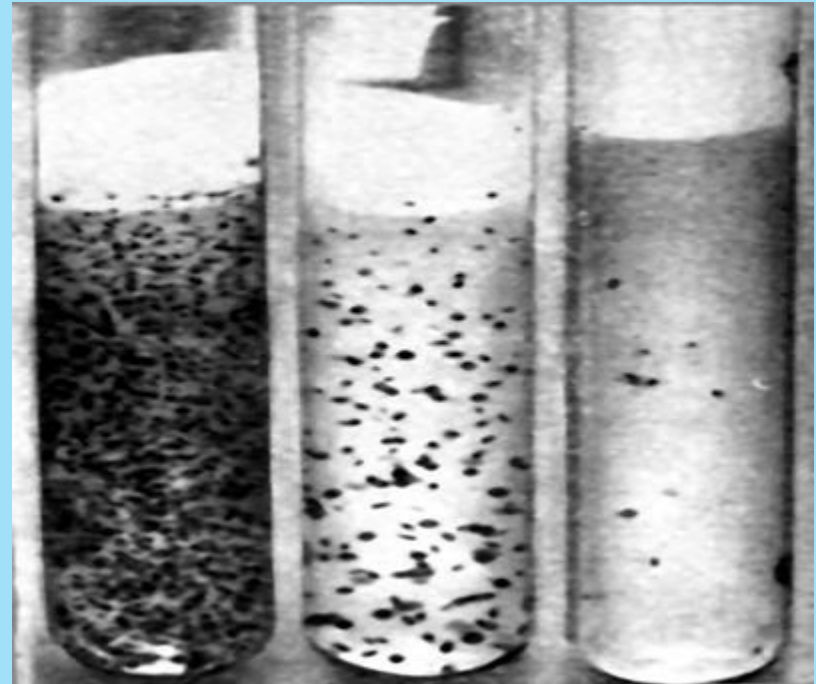
Антибиотик	Чувствительность	Умеренная чувствительность	Устойчивость (Резистентность)
Ампициллин	83,3	10,6	6,1
Ристомицин	83,3	10,6	6,1
Цефотаксим	98,5	0	1,5
Цефтриаксон	97,0	1,5	1,5
Тетрациклин	100,0	1,5	12,3
Ципрофлоксацин	100,0	0	0
Канамицин	100,0	0	0
Ко-тримоксазол	93,9	0	6,1

Методы культивирования анаэробных микроорганизмов



Рис. 56. Посев уколом.

Посев уколом анаэробных бактерий в столбик сахарного агара



Изолированные по методу Вейнберга колонии анаэробов в сахарном агаре

Метод Виньял-Вейона



- в расплавленный и остуженный до 50°C агар вносят исследуемую анаэробную культуру, перемешивают и отбирают в пастеровскую пипетку, конец которой запаивают. Через 24 — 48 часов в столбике агара вырастают ясно видимые колонии микроорганизмов — анаэробов

Анаэростат



Анаэростат предназначен для культивирования в чашках Петри микроорганизмов группы облигатных анаэробов и микроаэрофилов.

Анаэростат представляет собой цилиндрическую емкость, герметично закрываемую с помощью ленточного замка. В крышку вмонтирован вакуумметр и вентиль для присоединения вакуумного насоса и внешней системы источника газа.

Создание анаэробной или микрофильной атмосферы для культивирования микроорганизмов в анаэростате может производиться двумя способами:

- с помощью газогенерирующих пакетов типа Газпак;
- вакуумзаместительным заполнением бескислородными газами (газовыми смесями).

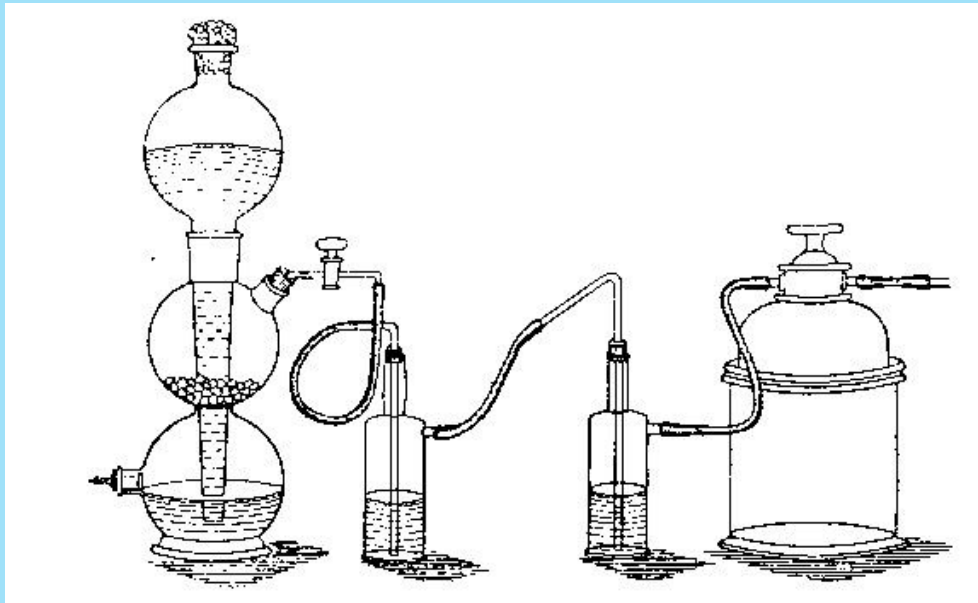
Аналоги анаэроштата



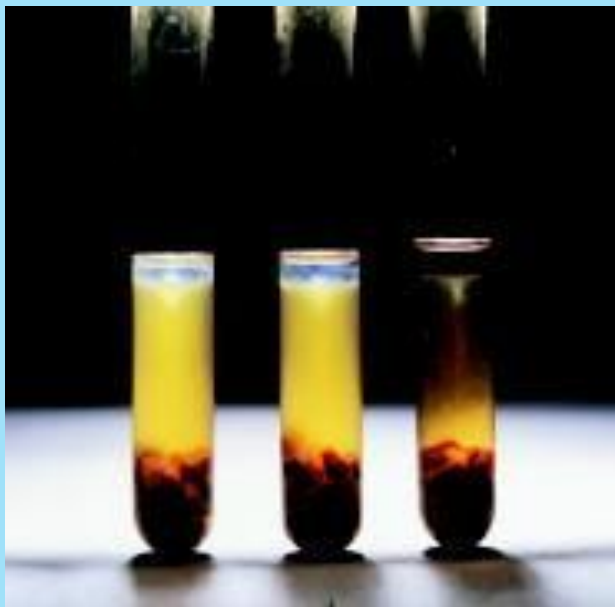


Аппарат Киппа

- Для выращивания анаэробов в бескислородной среде можно использовать водородную атмосферу, образующуюся в аппарате Киппа действием серной кислоты на металлический цинк. Водород перед поступлением в сосуд с культурами проходит для удаления остатков кислоты и O_2 , через промывные склянки с 10 % раствором азотнокислого свинца и с щелочным раствором пирогаллола.



СРЕДА КИТТА-ТАРОЦЦИ



Среда Китта-Тароцци — содержит кусочки печени, обладающие высокой адсорбционной способностью, 0.5% глюкозы. Перед посевом среду кипятят на водяной бане не менее 15 минут, сверху заливают слоем вазелинового масла, чтобы предохранить посев от прокипячения кисл



Professor Dr. Theodor
Kitt (1858-1941)



Giulio Tarozzi (1868-1948)



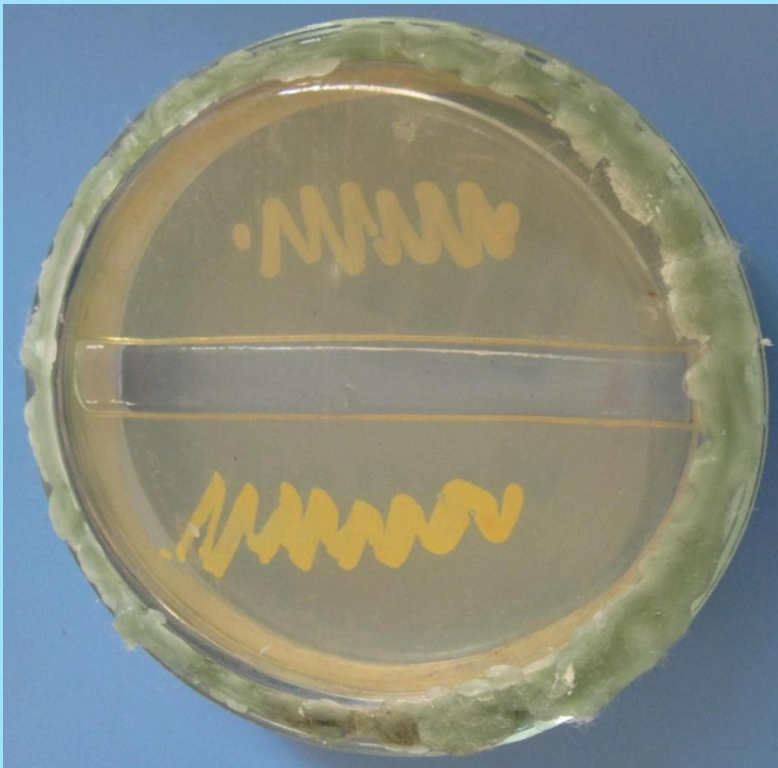
Среда Вильсона — Блейра



W. J. Wilson, 1879-1954, англ. бактериолог;
E. M. Blair;

Содержит глюкозу, сернисто-кислый натрий, хлорид железа. Анаэробы образуют черные колонии за счет восстановления сернисто-кислого натрия в сернистый натрий, который, соединяясь с хлоридом железа, образуют осадок черного цвета - сернистое железо.

СОВМЕСТНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АЭРОБОВ И АНАЭРОБОВ (МЕТОД ФОРТНЕРА)



В чашке с сахарным агаром вырезается «полоска» для невозможности смешивания разных культур бактерий.

С одной стороны выполняется посев культуры аэробных бактерий, с другой – умеренно строгих анаэробов.

Чашка закрывается, ее края запаиваются парафином (с целью не допустить попадания воздуха, кислорода внутрь чашки). Сначала вырастают в присутствии кислорода аэробы, а затем – анаэробы.

Спасибо за
внимание!



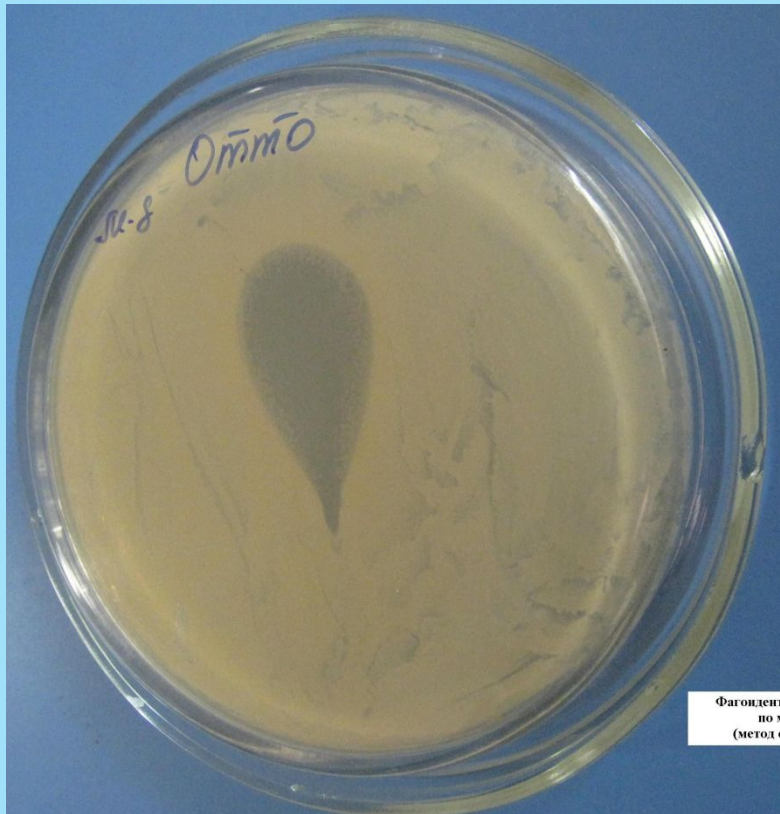
Бактериофаги

Вирулентные фаги-
Прогрессивная
инфекция

Умеренные фаги-
Лизогенная инфекция

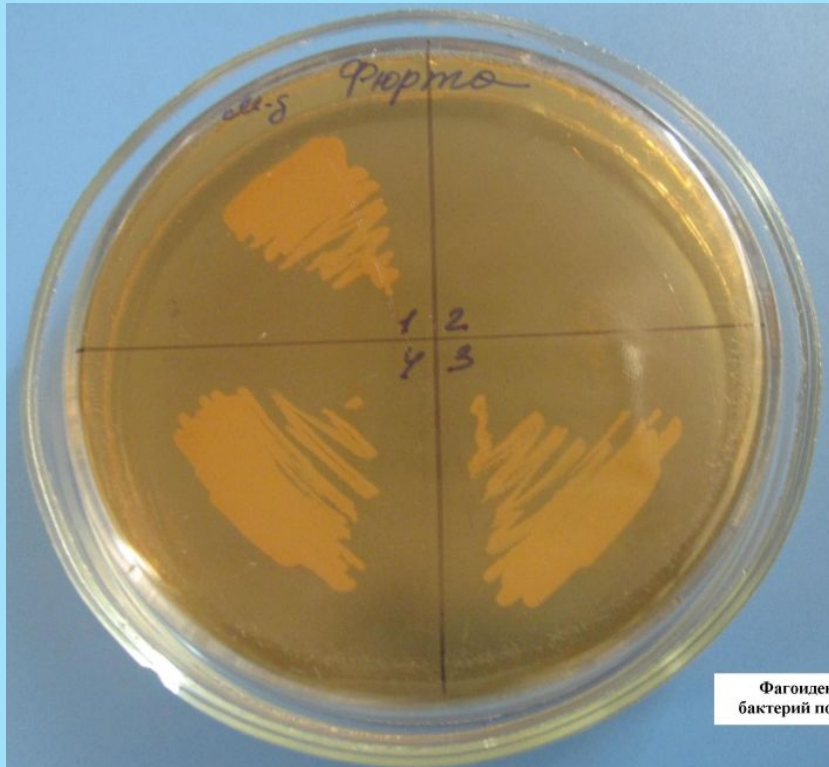
- **Лизогения** - ДНК фага включается в кольцевую хромосому бактериальной клетки. Во время деления клетки профаг (интегрированная ДНК фага) реплицируется в составе клеточного генома и переходит в следующие поколения бактерий. Бактериальная культура, инфицированная умеренным фагом, сохраняет жизнеспособность и становится лизогенной
- **Лизогенная (фаговая) конверсия** - процесс изменения свойств бактерии, под действием дополнительного набора генов, внесенных профагом в клетку, с приобретением ею токсигенных свойств (например, появление способности к образованию экзотоксина у возбудителей ботулизма, дифтерии и т.д.).

ФАГОИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ ПО МЕТОДУ ОТТО (МЕТОД СТЕКАЮЩЕЙ КАПЛИ)



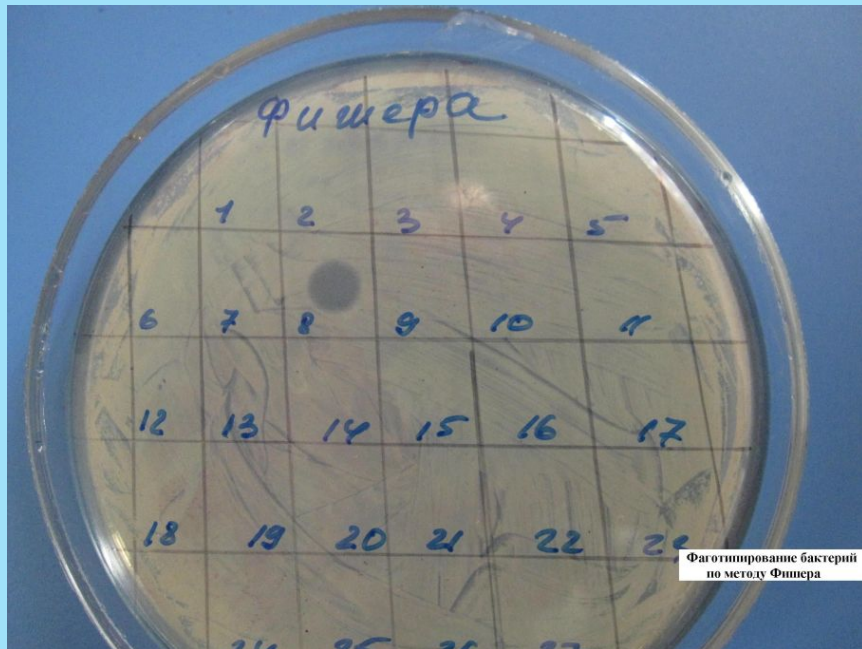
На чашку с МПА шпателем выполняется посев суточной бульонной выделенной культуры бактерий. Затем наносят каплю известного бактериофага и, наклонив чашку, дают капле несколько растечься по поверхности питательной среды. Через сутки наблюдают полную задержку роста в месте внесения диагностического фага.

ФАГОИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ ПО МЕТОДУ ФЮРТА



- В расплавленный и остуженный МПА (45-50⁰С) добавляют определенный бактериофаг и выливают в чашку Петри. Чашка с полученным агаром делится на несколько секторов, в каждый из которых засеваются неизвестные культуры, выделенные от больных. Там, где культура соответствует бактериофагу, наблюдается отсутствие роста (лизис) бактерий.

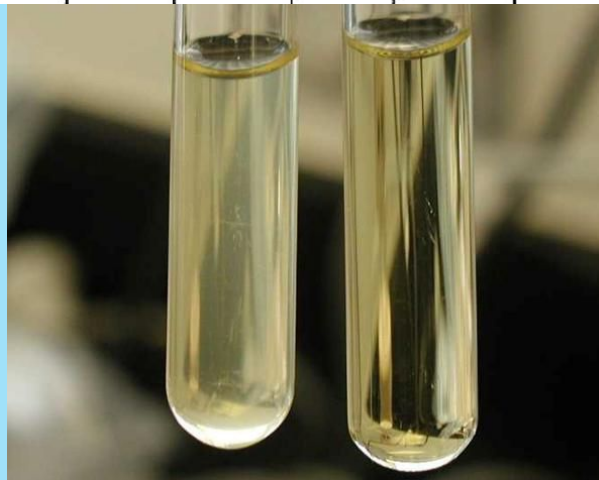
ФАГОТИПИРОВАНИЕ БАКТЕРИЙ ПО МЕТОДУ ФИШЕРА



- Испытуемую суточную бульонную культуру засевают на МПА, затем условно делят чашку на квадраты. В каждый квадрат наносят по одной капле различных фагов. После суточной инкубации в термостате отмечают квадраты, в которых отмечается лизис бактерий. Фаготип бактериальной культуры определяется типом лизирующего ее фага.

Титрование в жидкой среде по Аппельману

Ингредиенты, мл	Пробирки												
	опыт										контроль		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	культуры	фага	
Бульон	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Исследуемый фаг	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5	—	0,5	
Культура микроба	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	—	
	Разведение фага												
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	—	10^{-1}	
	Пробирки тщательно встряхивают и инкубируют при 37 °С 18—10 ч												
Результат	-	-	-	-		-	-	+	+	+	+	-	



Литическое действие бактериофагов (справа – положительный результат)

ТИТРОВАНИЕ БАКТЕРИОФАГА ПО МЕТОДУ ГРАЦИЯ

Ряд последовательных разведений фага по 1,0 мл смешивают в пробирке с 0,5 мл бактериальной культуры и добавляют в эту же пробирку расплавленный МПА. Все содержимое выливают в чашку с МПА. Дают застыть верхнему тонкому слою и ставят в термостат. При встрече фага с бактерией, происходит лизис последней и образуется негативная колония фага. Такие негативные колонии затем подсчитывают для определения титра. Титром фага называют количество фаговых частиц в 1 мл препарата фага.



Применение бактериофагов в диагностике и медицине

- Фаги выпускают в жидком виде (ампулы и флаконы), лиофильно высушенными, в таблетках и свечах. Таблетки фагов, предназначенные для применения через рот, покрыты кислотоустойчивой оболочкой, защищающей фаги от действия соляной кислоты желудочного сока.
- Препараты бактериофага составлены из вирулентных бактериофагов широкого спектра действия, активных против антибиотикорезистентных бактерий. Перед применением необходимо определить фагочувствительность возбудителя инфекции.
- Все препараты фагов подлежат обязательному контролю на отсутствие посторонней флоры, безвредность и активность (титр), который осуществляется на выпускающем их производстве. Выборочный контроль производят в Государственном НИИ стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. Выпускаемый фаг снабжен этикеткой, на которой указано: учреждение, его выпускающее, название фага, серия, номер контроля и срок годности. Каждая упаковка снабжена наставлением по применению и хранению фага.



Бактериофаг дизентерийный поливалентный

Иммунопрепарат (г.Уфа) (Россия)

Бактериофаг клебсиелл пневмонии

Микроген НПО ФГУП (Биомед НПО (г.Пермь)) (Россия)



Бактериофаг коли жидкий

Биомед (г.Пермь) (Россия)

Бактериофаг колипротейный жидкий

ИмБио-Нижегородское ГП по произ.бакпреп (Россия)

Бактериофаг сальмонеллезный

ИмБио-Нижегородское ГП по произ.бакпреп (Россия)

Бактериофаг синегнойный жидкий

Биомед (г.Пермь) (Россия)



Бактериофаг стафилококковый жидкий

Микроген НПО (Россия)

Бактериофаг стрептококковый жидкий

Микроген НПО ФГУП (Биомед НПО (г.Пермь)) (Россия)



Спасибо за внимание!