

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
ОО «Федерация лабораторной медицины»



Федерация лабораторной медицины
ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы
общественное объединение

Н.М. Бисенова, А.М. Дусмагамбетова, Г.А. Бейсембаева, А.В. Лавриненко, Ж.Ж. Ибраева

УНИФИЦИРОВАННЫЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

Методические рекомендации



Астана 2024
<https://flm.kz>
flmastana@mail.ru

УДК 616-093

ББК 52.64

У59

Рецензенты:

1. Кушугулова А.Р. - Руководитель Лаборатории Микробиома Центра наук о жизни ЧУ National Laboratory Astana, Назарбаев Университет, д.м.н., профессор
2. Ахметова С.Б. – к.м.н., профессор кафедры биомедицины НАО «Медицинский университет Караганды»

Авторы:

Бисенова Н.М. - д.б.н., профессор, руководитель микробиологической лаборатории АО «Национальный научный медицинский центр»;
Дусмагамбетова А.М. – к.м.н., заведующий лабораторным отделением ГКП на ПХВ «Городская поликлиника №5» акимата г.Астана;
Бейсембаева Г.А. – к.м.н., заведующий централизованной лабораторией КГП «Областная клиническая больница», г. Караганда;
Лавриненко А.В. - PhD, заведующий научно-исследовательской лаборатории НАО «Медицинский университет Караганда»;
Ибраева Ж.Ж. - заведующий бактериологической лабораторией, РГП "Больница Медицинского центра Управления делами Президента Республики Казахстан" на ПХВ

Унифицированные микробиологические исследования в клинической микробиологии: Методические рекомендации. - г.Астана, 2024 г.: ОО «Федерация лабораторной медицины» – 66 с.

В методических рекомендациях «Унифицированные микробиологические исследования в клинической микробиологии» рассмотрены основные вопросы, связанные с преаналитическим, аналитическими этапами работы врача-клинического микробиолога. Рассмотрены вопросы, касающиеся правильного забора и выбора клинического материала для микробиологического исследования, определения используемых методических подходов в микробиологическом исследовании (выбор метода диагностики). Рассмотрены основные группы этиологически значимых групп микроорганизмов, методы проведения их родовой и видовой идентификации. Рассмотрены методы определения чувствительности к антибиотикам с интерпретацией результатов. Методическое пособие ориентировано на студентов медицинских ВУЗов, изучающих клиническую микробиологию, преподавателей, практических врачей-микробиологов.

ISBN 978-601-305-571-8

УДК 616-093

ББК 52.64

Утверждено и разрешено к изданию типографским способом РГП на ПХВ «Национальный научный центр развития здравоохранения имени Салидат Каирбековой» МЗ РК (№461 от «25» июня 2024 года)

ISBN 978-601-305-571-8

© Бисенова Н.М.и др., 2024

Авторы



**Бисенова
Нэля Михайловна**

д.б.н., профессор, руководитель
микробиологической лабораторий АО
«Национальный научный
медицинский центр»



**Дусмагамбетова
Айгуль Мукатовна**

к.м.н, заведующий лабораторным отделением
ГКП на ПВХ «Городская поликлиника №5»
акимата г. Астана



**Бейсембаева
Гульнар Амиргалыевна**

к.м.н., заведующий
централизованной лабораторией
КГП «Областная клиническая
больница» г. Караганда



**Лавриненко
Алёна Владимировна**

PhD., заведующий
научно-исследовательской
лабораторией НАО
«Медицинский университет
Караганды»



**Ибраева
Жанар Жумагуловна**

Заведующий бактериологической
лабораторией РГП «Больница
медицинского центра Управления
делами Президента Республики
Казахстан» на ПХВ

Содержание

Перечень сокращений, условных обозначений, символов	4
Понятия и правила, используемые в методических рекомендациях	5
ВВЕДЕНИЕ	9
Глава 1. Этапы микробиологического исследования	10
1.1. Преаналитический этап	10
1.2. Аналитический этап	10
1.2.1 Посев на питательные среды	10
1.2.2 Алгоритм аналитического этапа.	10
1.2.3. Постаналитический этап	13
Глава 2. Исследование жидкостей организма из стерильных в норме полостей	13
2.1. Исследование ликвора	13
2.2. Исследование перитонеальной, синовиальной, плевральной, суставной, перикардальной жидкостей	16
2.3. Исследование микрофлоры глаз	18
2.4. Исследование микрофлоры верхних дыхательных путей (нос, глотка) и уха	20
2.5. Исследование микрофлоры нижних дыхательных путей	22
2.6. Исследование микрофлоры ран, пунктатов, экссудатов различных органов	32
2.7. Исследование микрофлоры мочи	34
2.8. Исследование крови	40
2.9. Исследование кала на патогенную и условно-патогенную микрофлору	43
2.10. Исследование желчи (дуоденального содержимого).	44
2.11. Микробиологическое исследование грудного молока.	45
Глава 3. Специфические диагностические тесты	46
3.1. Аэробные грамположительные кокки	46
3.2. Аэробные грамположительные палочки.	48
3.3. Аэробные грамотрицательные кокки.	49
3.4. Аэробные грамотрицательные палочки.	50
3.5. Анаэробные бактерии	53
Глава 4. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам	54
Список литературы	58
Приложение 1. Правила сбора и транспортировки биоматериала для бактериологического исследования	60

Перечень сокращений, условных обозначений, символов

АБТ	антибактериальная терапия
БАЛ	бронхоальвеолярный лаваж
ВДП	верхние дыхательные пути
ВЛКК	внутрилабораторный контроль качества
ВОК	внешняя оценка качества
ВОЗ	всемирная организация здравоохранения
ВП	внебольничная пневмония
СОП	стандартная операционная процедура
ИМП	инфекция мочевыводящих путей
ИФА	иммуноферментный анализ
КДЛ	клинико-диагностическая лаборатория
МПК	минимально подавляющая концентрация
ПЗ	пункт забора и приема биологического материала
ПЦР	полимеразно-цепная реакция
РИФ	реакция иммунофлюоресценции
ХОБЛ	хроническая обструктивная болезнь легких
ASM	American Society for Microbiology
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing -

Понятия и правила, используемые в методических рекомендациях

Биологический материал доклинических (неклинических) и клинических исследований – образцы биологических жидкостей, тканей, секретов и продуктов жизнедеятельности человека и животных, биопсийный материал, гистологические срезы, мазки, соскобы, смывы, полученные при проведении доклинических (неклинических) и клинических исследований и предназначенные для лабораторных исследований;

Первичная проба, образец — отдельная порция жидкости, выдыхаемого воздуха, волос или тканей организма, взятая для проведения исследований, изучение или анализ свойств одной или нескольких частей которой позволяет сделать выводы о состоянии в целом;

Проба — одна или несколько частей, взятых из первичной пробы

Транспортная система – состоит из транспортной среды и тампона для забора.

Лабораторная диагностика – комплекс лабораторных исследований биологических материалов, полученных от пациентов, направленных на диагностику заболеваний, контроль эффективности лечения и коррекцию лечения;

Преаналитический этап лабораторных исследований – процессы, хронологически начинающиеся с запроса врача и включающие запрос на проведение исследования, подготовку и идентификацию пациента, отбор первичных образцов и их транспортировку в лабораторию и за ее пределы и заканчивающиеся с началом аналитического исследования;

Постаналитический этап лабораторных исследований – процессы, следующие после исследования, включающие проверку результатов, сохранение и хранение биологического материала, утилизацию пробы и отходов, форматирование, интерпретацию, оформление и выдачу результатов исследований, и их хранение;

Пункт забора и приема биологического материала (далее – ПЗ) – юридическое лицо или структурное подразделение медицинской организации, в котором проводится взятие, прием биологического материала пациента и проведение лабораторных исследований на портативных анализаторах и экспресс тестах;

Клинико-диагностическая лаборатория (далее – КДЛ) – структурное подразделение организации здравоохранения или самостоятельное юридическое лицо, выполняющая лабораторные исследования биологического материала (общеклинические, биохимические, гемастазисологические, полимеразно-цепной реакции, иммунологические (иммунохроматографические, иммуноферментные, иммунохемотропные, электрохемотропные), серологические, микробиологические, физико-химические, микроскопические, цитологические, цитохимические, цитогенетические, молекулярно-генетические, химико-токсикологические), с целью получения информации для диагностики, предупреждения и (или) лечения болезни, оценки состояния здоровья человека, а также обеспечения консультативной

помощи по вопросам лабораторной диагностики, включая интерпретацию результатов исследования;

Бактериологическая лаборатория – лаборатория, выполняющая исследования по выделению бактерий из биологического материала и объектов окружающей среды, определению антигенов и антител;

Идентификация- определение (установление) видовой принадлежности микроба. В настоящее время общепринятый метод идентификации основан на изучении определенного набора наиболее важных фенотипических признаков исследуемого микроорганизма.

Штамм – чистая культура микроорганизма

Бактериоскопия (мазок на флору) – метод визуального анализа биологического материала под микроскопом.

Бактериологические исследования – это совокупность методик, направленная на установление причины инфекционного заболевания, путем выделения микроорганизмов из биологического материала человека (кровь, моча, мокрота, спинномозговая жидкость и пр.) с последующим определением чувствительности выделенных патогенов к антимикробным препаратам.

Внутрилабораторный контроль качества (далее – ВЛКК) – комплекс внутренних мероприятий медицинской лаборатории по проведению оперативной и регулярной самооценки работы лаборатории и выдаваемых ею результатов, направленных на самоконтроль стабильности аналитической системы, выявление и устранение случайных и систематических погрешностей;

Внешняя оценка качества (далее – ВОК) – комплекс мероприятий медицинской лаборатории по добровольной внешней оценке работы лаборатории правильности выдаваемых ею результатов с привлечением внешних организаций, путем участия в сравнительных испытаниях;

Настоящие **Правила** устанавливают порядок организации и проведения клинических микробиологических лабораторных исследований.

Клинические микробиологические лабораторные исследования проводятся в медицинских организациях или иных организациях, осуществляющих медицинскую деятельность (далее - медицинская организация) на основании лицензии и Разрешения комиссии по контролю за соблюдением требований в области биологической безопасности (Режимной комиссии), предусматривающей выполнение работ (услуг) по медицинской микробиологии и (или) по бактериологии и (или) лабораторной микологии и (или) паразитологии и (или) лабораторной диагностике.

Клинические микробиологические исследования проводятся в целях этиологической диагностики инфекционных и паразитарных болезней, предупреждения возникновения и распространения инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, диагностики состояния микробиоты человека.

Клинические микробиологические лабораторные исследования включают в себя следующие виды: микроскопические, бактериологические,

иммунологические, молекулярно-генетические.

Клинические микробиологические лабораторные исследования проводятся с использованием следующих технологий: микроскопических, культуральных, биохимических, иммунологических (включая серологические), молекулярно-биологических и физико-химических (включая масс-спектрометрические) технологий.

Предметом клинических микробиологических лабораторных исследований является биологический материал человека (далее - биоматериал).

Клинические микробиологические лабораторные исследования проводятся медицинскими работниками при наличии высшего и среднего профессионального образования, предусмотренного квалификационными требованиями к медицинским работникам, прошедшими **аккредитацию** или имеющими сертификат специалиста и (или) документ о дополнительном профессиональном образовании (повышение квалификации) по заявленной деятельности в сфере выполнения клинических микробиологических лабораторных исследований.

Сбор биоматериала проводится медицинским работником или самим пациентом или иным лицом, осуществляющим уход за пациентом, если это касается естественных выделений пациента, с последующей доставкой к месту выполнения лабораторных исследований в контейнере в соответствии с санитарно-эпидемиологическими нормами и при определенном температурном режиме, в зависимости от места, условий и методов проведения клинических микробиологических лабораторных исследований.

Направление на лабораторное исследование содержит: наименование медицинской организации, направляющей пациента на лабораторное исследование, адрес ее местонахождения; фамилию, имя, отчество (при наличии) пациента, пол, дату его рождения, иные данные (при наличии); номер медицинской карты пациента (при наличии), получающего медицинскую помощь в амбулаторных условиях, или номер медицинской карты стационарного больного в случае, если исследования проводятся при оказании медицинской помощи в стационарных условиях или в условиях дневного стационара; диагноз основного заболевания, код диагноза в соответствии с Международной статистической классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем (далее - МКБ); наименование лабораторных исследований; вид биоматериала; тип пробы или указание локализации, откуда был взят биоматериал, и способ взятия (при необходимости); дату и время назначения лабораторного исследования; дату и время взятия биоматериала; фамилию, имя, отчество (при наличии) и должность медицинского работника (врача, фельдшера, акушерки), назначившего лабораторное исследование.

Преаналитический до лабораторный (внелабораторный) этап микробиологического исследования включает: выбор микробиологического исследования в соответствии с порядками оказания медицинской помощи, показаниями к микробиологическому исследованию и с учетом стандартов и

протоколов медицинской помощи; оформление направления на микробиологическое исследование; инструктаж пациента по правилам подготовки к микробиологическому исследованию; инструктаж пациента по правилам взятия биоматериала, предполагающего самовзятие образцов; взятие (сбор) биоматериала, его маркировку, хранение и транспортировку к месту проведения исследования. В медицинской организации проводится регулярный инструктаж (обучение) врачей-специалистов и медицинских работников со средним профессиональным образованием по правилам проведения преаналитического долабораторного (внелабораторного) этапа микробиологического исследования вне лаборатории.

Преаналитический лабораторный этап микробиологического исследования включает: идентификацию образца; регистрацию образца, в том числе с применением централизованной системы (подсистемы) управления лабораторными исследованиями для микробиологических лабораторий; оценку соответствия биоматериала требованиям исследования в соответствии с определенными данной лабораторией критериями оценки (индикаторы качества преаналитического этапа); проверку соответствия типа контейнера (пробирки) и заявленного биоматериала перечню лабораторных исследований; распределение биоматериала по назначенным видам исследований (сортировку).

Аналитический этап микробиологического исследования включает: выбор методов микробиологических исследований; проведение микробиологических исследований с использованием аналитических методик, реагентов и оборудования, имеющих регистрационное удостоверение и разрешенных для применения на территории Республики Казахстан; выполнение внутреннего контроля качества и регулярного участия в межлабораторных сравнительных (сличительных) испытаниях.

Постаналитический этап микробиологического исследования включает: валидацию и интерпретацию результатов; регистрацию результатов микробиологических исследований на бумажном или электронном носителе, в том числе с применением централизованной системы (подсистемы) управления лабораторными исследованиями для микробиологических лабораторий; формирование заключения микробиологического исследования; передачу результатов исследования направившему лицу; хранение образцов выделенных культур в соответствии с требованиями санитарного законодательства; утилизацию патогенных биологических агентов, биоматериала и проб объектов окружающей среды.

Сроки проведения клинических микробиологических лабораторных исследований должны быть утверждены внутренним документом медицинской организации в соответствии с техническим оснащением лаборатории.

Информирование о случаях выявления инфекционных и паразитарных болезней осуществляется медицинскими работниками в установленном законодательством порядке.

ВВЕДЕНИЕ

В методических рекомендациях «Унифицированные микробиологические исследования в клинической микробиологии» рассмотрены основные вопросы, связанные с преаналитическим, аналитическими этапами работы врача-клинического микробиолога. Рассмотрены вопросы, касающиеся правильного забора и выбора клинического материала для микробиологического исследования, определения используемых методических подходов в микробиологическом исследовании (выбор метода диагностики). Рассмотрены основные группы этиологически значимых групп микроорганизмов, методы проведения их родовой и видовой идентификации. Рассмотрены методы определения чувствительности к антибиотикам с интерпретацией результатов. Методическое пособие ориентировано на студентов медицинских ВУЗов, изучающих клиническую микробиологию, преподавателей, практических врачей-микробиологов.

Глава 1. Этапы микробиологического исследования

1.1. Преаналитический этап

Правила забора материала для микробиологического исследования

Обязательным требованием к забору биологического материала является забор материала до начала антимикробной терапии или в момент наименьшего содержания антибиотика в организме.

Материал для микробиологического исследования берут непосредственно из очага инфекции или исследуют клинически значимый биологический материал. Необходимо соблюдать асептику, избегая контаминации биологического материала посторонней микрофлорой. Количество материала должно быть достаточным для проведения исследования. Биологический материал собирают в стерильные контейнеры для микробиологических исследований, либо специальные транспортные среды, предоставляемые лабораторией.

Правила сбора, хранения и транспортировки биоматериала для микробиологического исследования представлены в приложении 1.

Бракераж в микробиологической лаборатории проводится в соответствии с принятыми внутренними нормативными документами.

1.2. Аналитический этап

1.2.1 Посев на питательные среды

Выбор питательных сред зависит от клинического материала, целей исследования.

Приготовление питательных сред проводится в соответствии с инструкцией производителя, с проведением внутрилабораторного контроля с целью оценки их соответствия требуемому качеству.

Разрешается использование в работе сред собственного приготовления, коммерческих питательных сред, готовых питательных сред, хромогенных питательных сред.

1.2.2 Алгоритм аналитического этапа

1 день: приготовление и окраска по Граму нативного мазка в зависимости от клинического материала, не всегда бывает возможным. Посев на соответствующие питательные среды в зависимости от цели исследования (**качественный, полуколичественный, количественный**), посев на кровяной агар секторальным методом по Голду и другие питательные среды. Все чашки с посевами должны быть промаркированы (дата приготовления питательной среды, дата и время посева, наименование и регистрационный номер биоматериала). Посевы помещают в термостат при 37° на 24 часа либо в зависимости от используемых сред (рис.1).

Питательные среды для микробиологических исследований

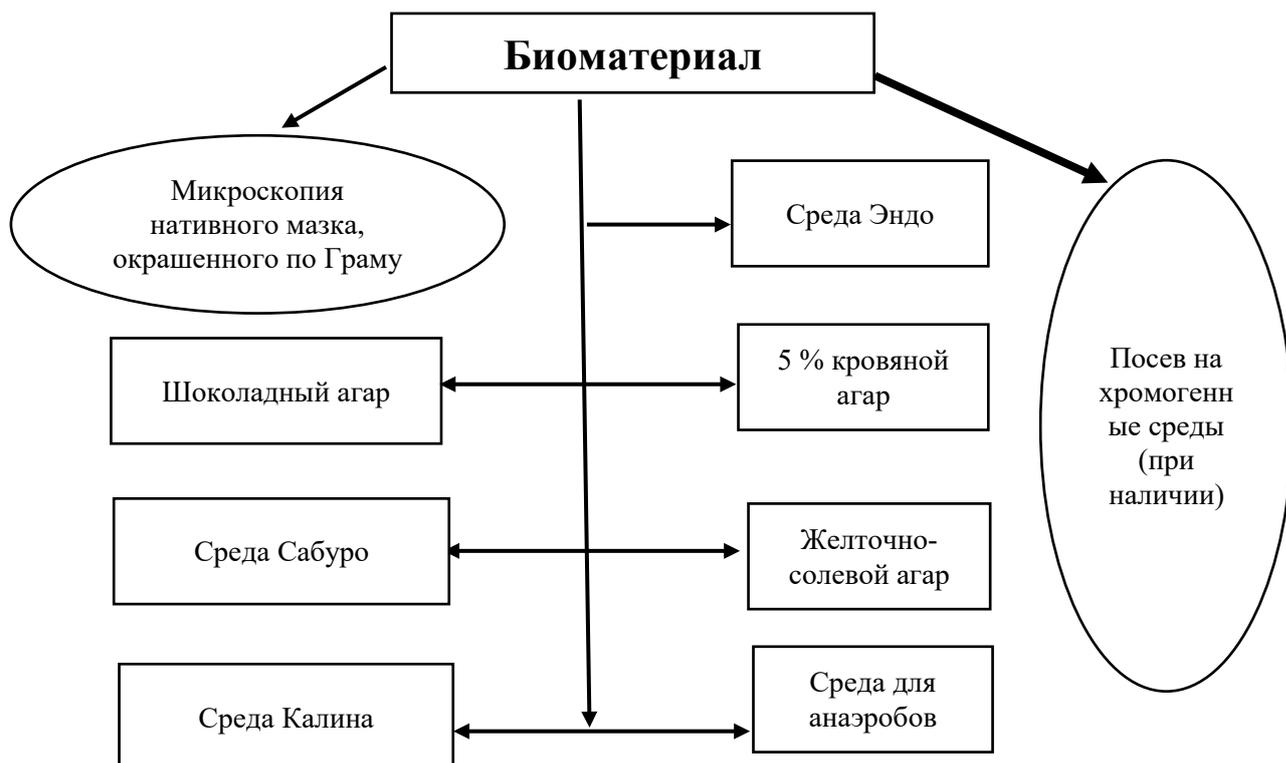


Рис. 1 Выбор питательных сред для посева биоматериала

2 день: подсчет выросших на КА колоний для определения степени обсеменения (табл. 2); приготовление, окраска по Граму и микроскопия мазка, изучение тинкториальных, морфологических, культуральных свойств, пересев на скошенный агар для выделения чистой культуры.

При наличии масс-спектрометра (малди тоф) возможна идентификация выделенных культур с дальнейшим посевом для накопления чистой культуры или сразу постановка определения чувствительности к антимикробным препаратам по действующей версии стандарта EUCAST.

Таблица 1. Число колоний бактерий в различных секторах чашки Петри в зависимости от степени обсеменения

Число колоний в различных секторах чашки Петри		Число колоний в различных секторах чашки Петри			
		A	I	II	III
Менее 1 тыс.	$<10^3$	1-6	Роста нет	Роста нет	Роста нет
1 тыс.	$1*10^3$	8 - 20	Роста нет	Роста нет	Роста нет
5 тыс.	$5*10^3$	20 - 30	Роста нет	Роста нет	Роста нет
10 тыс.	$1*10^4$	30 - 60	Роста нет	Роста нет	Роста нет
50 тыс.	$5*10^4$	70 - 80	Роста нет	Роста нет	Роста нет
100 тыс.	$1*10^5$	100 - 150	50 - 10	Роста нет	Роста нет
500 тыс.	$5*10^5$	Очень большое	20 - 30	Роста нет	Роста нет
1 млн.	$1*10^6$	Очень большое	40 - 60	Роста нет	Роста нет
5 млн.	$5*10^6$	Очень большое	100 - 140	10-20	Роста нет

10 млн.	$1 \cdot 10^7$	Очень большое	Очень большое	30-40	Роста нет
50 млн.	$5 \cdot 10^7$	Очень большое	Очень большое	60-80	Единичные
100 млн.	$1 \cdot 10^8$	Очень большое	Очень большое	80-140	От единичных до 25

3 день: приготовление, окраска по Граму и микроскопия мазка чистой культуры со скошенного агара. Изучение тинкториальных, морфологических свойств.

- при отсутствии автоматического, полуавтоматического микробиологического анализатора производится посев на среды для определения биохимических свойств, при необходимости постановка серологических реакций (реакция агглютинации на стекле) и постановка антибиотикограммы по действующей версии стандарта EUCAST;
- При наличии масс-спектрометра, автоматического микробиологического анализатора после получения чистой культуры идентификация и определение чувствительности по действующей версии стандарта EUCAST проводится в соответствии с техническим оснащением лаборатории. **Возможна выдача окончательного результата в этот же день.**

4 день: При отсутствии автоматического, полуавтоматического микробиологического анализатора производится учет биохимических свойств и антибиотикограммы, поставленных в предыдущий день. Идентификация выделенной культуры проводится на основании совокупности тинкториальных, морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств. Выдача окончательного результата с антибиотикограммой.

Таблица 2. Признаки, учитываемые при идентификации микроорганизмов (критерии вида):

Признаки	Характеристика признаков
Морфологические	Размеры, форма: взаимное расположение Тинкториальные свойства: окраска по Граму или другими дифференциально-диагностическими методами
Культуральные	Рост на плотных (вид колоний) и в жидких средах
Биохимические	Выявление ферментов: – протеаз (разлагающих белки); – карбогидраз (разлагающих углеводы); – липаз (разлагающих липиды); – оксидоредуктаз (оксидазы, каталазы, дегидраз); – ферментов-токсинов (гемолизинов,

	плазмокоагулазы, лецитиназы, гиалуронидазы, ДНК-азы); – экзотоксинов (дифтерийного и др.); – профиля летучих жирных кислот (для анаэробов)
Генетические	Содержание Г+Ц (%) в ДНК Последовательность нуклеотидов в ДНК и РНК
Серологические	Изучение антигенной структуры микроба и определение его серовара в РА на стекле с моновалентными сыворотками или в реакции латекс-агглютинации
Биологические	Вирулентность для животных Токсигенность Чувствительность к бактериофагам (определение фаговара) Чувствительность к антибиотикам
Экологические	Естественное место обитания

Примечание: В случае отсутствия роста через 24 - 72 часа выдают отрицательный ответ в зависимости от цели исследования.

При необходимости в случае выделения этиологически значимых микроорганизмов проводится определение чувствительности к бактериофагам.

1.2.3. Постаналитический этап (интерпретация и выдача результатов, совместное обсуждение результатов микробиологического исследования с клиническими микробиологами, клиницистами, госпитальными эпидемиологами, клиническими фармакологами), хранение при необходимости (замораживание, субкультивирование), уничтожение культур и обеззараживание поверхностей и лабораторной посуды в соответствии с правилами биологической безопасности.

Глава 2. Исследование жидкостей организма из стерильных в норме полостей

2.1. Исследование ликвора

Спинно-мозговую жидкость отбирают у больного при люмбальной пункции или пункции боковых желудочков мозга в объеме 2,0— 5,0 мл на этапе поступления в стационар до начала антибиотикотерапии с соблюдением правил асептики. Ликвор после пункции распределяют для исследования следующим образом:

- 1,0 мл направляют в клиническую лабораторию для проведения общего ликворологического и цитологического исследования;

- 1,0 мл направляют для первичного бактериологического посева (если не сделан в отделении при пункции), бактериоскопии и серологических исследований;
- 0,5 мл засевают в чашку с «шоколадным» агаром непосредственно. Далее чашку хранят в условиях термостата при 37 °С до доставки в лабораторию. Применение данной методики позволяет получить культуру возбудителя бактериального менингита на 18— 24 часа раньше, чем по стандартной схеме посева материала в лаборатории и тем самым ускорить проведение исследования и выдачу ответа;
- 0,5 мл ликвора засевают в среду обогащения (в 5,0 мл 0,1 %-го полужидкого питательного агара) непосредственно и далее хранят при 37 °С в условиях термостата до доставки в лабораторию.
- при наличии масс-спектрометра в лаборатории возможна идентификация осадка ликвора с предварительным центрифугированием (инструкция, СОП).

При использовании коммерческих сред свежевзятый ликвор вносится во флакон со средой в асептических условиях.

1) Бактериоскопия

Спинномозговую жидкость центрифугируют 15 - 20 минут при 2500 – 3000 об/мин и из осадка делают мазки. Если присланная жидкость мутная, мазки готовят без центрифугирования.

- Мазок нативного ликвора: на предметное стекло наносят каплю ликвора из осажденного после центрифугирования слоя и высушивают при комнатной температуре или в условиях термостата при 37 °С. Далее на препарат наносят краситель (водно-спиртовой раствор метиленовой сини) и после 2-минутной экспозиции проводят тщательное, но осторожное промывание водопроводной водой. Препарат подсушивают и микроскопируют под иммерсией при большом увеличении, просматривая не менее 20 полей зрения или до обнаружения морфологически четких микробных клеток.

- Культуральный мазок по Граму в модификации Калины: на обезжиренное стекло наносят каплю стерильного физиологического раствора. В нем суспензируют культуру и туда же петлей вносят каплю спиртового раствора бриллиантовой зелени. После подсыхания препарат фиксируют над пламенем. Затем на препарат наливают основной краситель. Время экспозиции 1,5—2,0 мин. После этого краску сливают и стекло в наклонном положении промывают водой. Далее препарат в наклонном положении отмывают спиртом до отхождения облачков краски и немедленно промывают водой. Затем производят докрасивание препарата водным раствором фуксина в течение 2 мин, после этого окончательно промывают водой и просушивают. Культуральный мазок просматривают под иммерсией при большом увеличении: грамотрицательные бактерии выглядят ярко-розовыми, грамположительные - сине-черными. Желательно

для контроля на каждом стекле делать мазок культур стафилококков или кишечной палочки.

- Для обнаружения микобактерий туберкулеза мазки готовят из фибринозной пленки или осадка после центрифугирования. Препарат из фибринозной пленки следует готовить тонким, осторожно растягивая ее слегка подогретой бактериологической петлей или растирая между двумя предметными стеклами. Мазки красят по Цилю-Нильсену.

Результаты микроскопии окрашенного мазка спинномозговой жидкости в ряде случаев позволяют установить наличие туберкулезных бацилл, менигококков или условно-патогенных бактерий, вызвавших гнойный менингит. В соответствии с этими результатами вносят коррективы в ход бактериологического исследования. Результаты микроскопического исследования сообщаются лечащему врачу как предварительные данные. **Окончательный ответ при бактериоскопическом исследовании выдается только при обнаружении *Mycobacterium spp.***

2) Бактериологический посев

Так как гнойные менингиты имеют различную этиологию, то при исследовании спинномозговой жидкости с неопределенным возбудителем необходимо производить посев ликвора на несколько питательных сред с целью выделения более широкого спектра возбудителей.

При отборе и посеве исследуемого материала следует соблюдать следующие требования: исключить случайную контаминацию материала посторонней микрофлорой и не допустить гибели возбудителя с момента взятия материала для анализа и до начала работы с ним в лаборатории. Первое условие обеспечивают правильным забором материала, точным доступом к очагу инфекции, соблюдением асептики; второе - доставкой образцов или посевов в лабораторию незамедлительно в теплом виде или временное сохранение до доставки в условиях термостата при 37 °С в течение не более чем 12 ч. Первичный бактериологический посев СМЖ на чашку с «шоколадным» агаром выполняют непосредственно «у постели больного» в стационаре после проведения пункции. Чашки с питательной средой, так же как и все необходимые для забора патологического материала принадлежности (пустые стерильные пробирки, пробирки с 0,1 %-м полужидким сывороточным агаром) в достаточном количестве хранят в профильном отделении стационара или их немедленно (при необходимости) доставляют из бактериологической лаборатории. Допустимым условием хранения емкостей с питательными средами является температура бытового холодильника (4 °С). Срок хранения - не более 7 дней. Перед пункцией емкости с питательными средами достают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре не менее 10 мин. После проведения пункции непосредственно из пункционной иглы выполняют посев СМЖ на чашку с «шоколадным» агаром. Чашку осторожно открывают и на поверхность среды закапывают несколько капель ликвора (3— 4 капли). Далее чашку

закрывают, ставят на ровную поверхность и с помощью нескольких круговых движений чашки по поверхности стола капли ликвора распределяют по поверхности агара. После того как СМЖ впитается (обычно 2—3 мин), необходимо зафиксировать дно и крышку чашки (например пластырем) для того, чтобы не возникло ее случайного открытия. Посев СМЖ в пробирку с 0,1 %-м полужидким сывороточным агаром проводят сразу после пункции. Для этого непосредственно из пункционной иглы 5—6 капель СМЖ вносят в пробирку с 0,1 %-м полужидким сывороточным агаром. Следует указать на то, что если непосредственно у постели больного сделан посев СМЖ по вышеизложенному способу, то этап посева нативной СМЖ в лаборатории следует исключить, при этом доставленную в лабораторию стерильную СМЖ исследуют только бактериоскопическими и серологическими методами. Емкости с посевами до доставки в лабораторию хранят в условиях термостата при 37 °С или немедленно доставляют в бактериологическую лабораторию. В бактериологической лаборатории посевы инкубируют при 37 °С в течение 24—48 ч в атмосфере, содержащей 5—10 % CO₂ (эксикатор со свечой, CO₂-инкубатор).

При наличии роста на плотных питательных средах проводят визуальную оценку выросших колоний, готовят мазок по Граму, определяют оксидазу, каталазу и в зависимости от полученного результата проводят дальнейшую идентификацию возбудителя и определение чувствительности к антибиотикам.

При наличии признаков роста в 0,1 %-м полужидком сывороточном агаре проводят высев на чашки с «шоколадным» агаром. Культивацию посевов и дальнейший ход исследований проводят так же, как описано выше.

3) Оценка результатов

СМЖ в норме стерильна, поэтому диагностически значимо обнаружение любого микроорганизма. Необходимо учитывать возможность случайной контаминации, которую можно заподозрить при отрицательных результатах микроскопического исследования СМЖ и отсутствии роста на плотных питательных средах в сочетании с ростом на жидких питательных средах. При подозрении на контаминацию исследование следует повторить. Диагностически значимо считается повторное выделение того же вида микроорганизмов.

2.2. Исследование перитонеальной, синовиальной, плевральной, суставной, перикардальной жидкостей

Для микробиологического исследования используют жидкости, взятые при пункции и аспирации. Попавшие в шприц пузырьки воздуха удаляют и помещают жидкость в анаэробную транспортную систему или отправляют её в шприце, предварительно сняв (или загнув) иглу или надевают на канюлю защитный стерильный колпачок. Минимальный объём жидкости для выделения бактерий 1-5 мл, для выделения грибов или микобактерий не

менее 10 мл. Избыток жидкости или гной транспортировать в стерильных контейнерах с завинчивающейся крышкой.

Взятие материала тампоном не предохраняет анаэробы от воздействия кислорода воздуха, не позволяет приготовить качественный препарат для микроскопии, не гарантирует выделение культуры при незначительном количестве микробов в образце.

Не рекомендуется использовать антикоагулянты (цитрат, этилендиаминтетрауксусную кислоту), подавляющие рост некоторых видов бактерий. При необходимости лучше использовать гепарин.

При достаточном количестве жидкости можно производить посев из шприца во флаконы со средой для гемокультур в соотношении 1:5 - 1:10 (5-10 мл). Однако при этом становится невозможной прямая бактериоскопия материала, а сроки идентификации удлиняются на сутки в сравнении с изолятами, выделенными при первичном посеве на плотные среды.

При наличии в лаборатории масс-спектрометра (малди тоф) возможна идентификация осадка после центрифугирования исследуемой жидкости в соответствии с инструкциями, СОПами.

1) Бактериоскопия

Исследуемую жидкость центрифугируют 5 минут при 3500 об/мин и из осадка делают мазки. Если присланная жидкость мутная, мазки готовят без центрифугирования.

- Мазок нативного материала: на предметное стекло наносят каплю нативного материала из осажденного после центрифугирования слоя и высушивают при комнатной температуре или в условиях термостата при 37 °С. Далее на препарат наносят краситель (водно-спиртовой раствор метиленовой сини) и после 2-минутной экспозиции проводят тщательное, но осторожное промывание водопроводной водой. Препарат подсушивают и микроскопируют под иммерсией при большом увеличении, просматривая не менее 20 полей зрения или до обнаружения морфологически четких микробных клеток.

- Культуральный мазок по Граму в модификации Калины: на обезжиренное стекло наносят каплю стерильного физиологического раствора. В нем суспензируют культуру и туда же петлей вносят каплю спиртового раствора бриллиантовой зелени. После подсыхания препарат фиксируют над пламенем. Затем на препарат наливают основной краситель. Время экспозиции 1,5—2,0 мин. После этого краску сливают и стекло в наклонном положении промывают водой. Далее препарат в наклонном положении отмывают спиртом до отхождения облачков краски и немедленно промывают водой. Затем производят докрасивание препарата водным раствором фуксина в течение 2 мин, после этого окончательно промывают водой и просушивают. Культуральный мазок просматривают под иммерсией при большом увеличении: грамотрицательные бактерии выглядят ярко-розовыми, грамположительные - сине-черными. Желательно

для контроля на каждом стекле делать мазок культур стафилококков или кишечной палочки.

- Для обнаружения микобактерий туберкулеза мазки готовят из осадка после центрифугирования. Мазки красят по Цилю-Нильсену.

В соответствии с этими результатами микроскопического исследования вносят коррективы в ход бактериологического исследования. Результаты микроскопического исследования сообщаются лечащему врачу как предварительные данные.

2) Бактериологический посев

Материал засевают на чашки с 5% кровяным агаром секторальным методом, желточно-солевой агар, среду Эндо и "среду для контроля стерильности". Термостатирование проводится при 37°C в течение 24 ч.

На второй день при появлении роста в бульоне изучают характер роста и проводят бактериоскопическое исследование с окраской по Граму. В зависимости от морфологии микроорганизмов делаются высевы на элективные питательные среды для выделения чистых культур с последующей идентификацией и определением чувствительности к антибиотикам согласно действующей версии EUCAST. При наличии малди тоф масс-спектрометрии проводится идентификация выделенных микроорганизмов с дальнейшей постановкой чувствительности к антимикробным препаратам.

При наличии роста на 5% кровяном агаре изучают тинкториальные свойства выросших колоний; морфологию бактериоскопическим методом с окраской по Граму. Проводят качественную и количественную оценку бактериального роста. Производят отсев отдельных колоний на элективные среды с целью их идентификации и определения чувствительности к антибиотикам согласно действующей версии EUCAST. При отсутствии роста в первые сутки посева оставляют в термостате, ежедневно просматривают их. При обнаружении роста производят соответствующие отсева. Окончательный ответ об отсутствии роста выдают через трое суток.

3) Оценка результатов

При выявлении специфических возбудителей интерпретация результатов не вызывает трудностей. В других случаях, когда процесс вызывается условно-патогенными бактериями, необходимо применение количественных критериев оценки. Преобладающий в мазке нативного материала, окрашенного по Граму, вид микроба, массивность роста однотипных колоний, повторность выделения культур дают возможность сделать заключение о возможном возбудителе процесса.

2.3. Исследование микрофлоры глаз

Поражение глаз инфекционной природы представляет собой достаточно сложный комплекс и в клиническом, и в микробиологическом отношении. Несмотря на ограниченные размеры глаза, структура его сложна,

и каждая ткань может быть поражена микроорганизмами, в том числе присущими только заболеванию данной структуры.

В этиологии экзогенного эндофтальмита возбудителем являются *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus spp.*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *H. influenza* и другие представители семейства *Enterobacteriaceae*, *Propionibacterium spp.*, *C. albicans*. При эндогенном эндофтальмите выделяют стафилококки, стрептококки, представители семейства *Enterobacteriaceae*, кроме того, другие микроорганизмы, возбудителей тяжелых процессов различной локализации, в частности *N. meningitidis*, *C. albicans*, *N. asteroides* и др. Резидентной микрофлорой глаз является *Corynebacterium xerosis* и *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. Условно-патогенная микрофлора может быть представлена грамположительными кокками (*Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis*) и грамотрицательными палочками семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Klebsiella*) и *Pseudomonas aeruginosa*. Патогенная микрофлора может включать *Streptococcus pyogenes* и *pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* и другие. В посевах клинического материала могут быть выделены микроорганизмы, обуславливающие только конъюнктивиты. К ним относятся: *Haemophilus aegypticus* (*Koch-Weeks Bacillus*), *Moraxella lacunata* (*Diplobacillus moraxaxenfeld*), *Branhamella catarrhalis*.

Сбор биоматериала производит врач-окулист согласно приложения 1.

1) Бактериоскопия

Присланные в лабораторию мазки фиксируют на пламени и окрашивают по методу Грама или метиленовым синим. Микроскопия окрашенных мазков позволяет предположить наличие тех или иных видов бактерий, вызвавших заболевание глаз.

Для обнаружения *Mycobacterium spp.* окраску проводят по методу Циль-Нильсона.

Бактериоскопию нативного материала проводят при подозрении на кандидоз методом "раздавленной капли".

Результаты бактериоскопии могут быть сообщены врачу в виде предварительного ответа. Дальнейший ход микробиологического исследования в ряде случаев определяется видом предполагаемых возбудителей.

2) Бактериологический посев

Первичные посевы на жидких питательных средах, присланные в лабораторию, помещают в термостат при 37°C.

Материал, взятый тампоном, с обильным гнойным отделяемым засевают на чашки с 5% кровяным агаром секторальным методом, желточно-солевой агар, среду Эндо и "среду для контроля стерильности". Термостатирование проводится при 37°C в течение 24 ч.

На второй день при появлении роста в бульоне изучают характер роста и проводят бактериоскопическое исследование с окраской по Граму. В зависимости от морфологии микроорганизмов делаются высевы на элективные питательные среды для выделения чистых культур с последующей идентификацией и определением чувствительности к антибиотикам согласно действующей версии EUCAST.

При наличии роста на 5% кровяном агаре изучают тинкториальные свойства выросших колоний; морфологию бактериоскопическим методом с окраской по Граму. Проводят качественную и количественную оценку бактериального роста. Производят отсев отдельных колоний на элективные среды с целью их идентификации и определения чувствительности к антибиотикам согласно действующей версии EUCAST. При отсутствии роста в первые сутки посева оставляют в термостате, ежедневно просматривают их. При обнаружении роста производят соответствующие отсева. Окончательный ответ об отсутствии роста выдают через трое суток.

3) Оценка результатов

При интерпретации результатов микробиологического исследования глаз необходимо учитывать контингент обследованных больных, анамнез, клинические проявления болезни.

Необходимо учитывать, что гонококки являются одной из частых причин острых гнойных конъюнктивитов у взрослых и особенно у детей. Кератоконъюнктивитам, вызванным нормальной микрофлорой конъюнктивы, носоглотки, ротовой полости часто предшествует вирусная инфекция верхних дыхательных путей, аллергические риниты, травмы, оперативные вмешательства, а также использование промывных растворов, инфицированных госпитальными штаммами.

2.4. Исследование микрофлоры верхних дыхательных путей (нос, глотка) и уха

Микробный пейзаж верхних дыхательных путей весьма разнообразен и включает микроорганизмы, выделяемые как в монокультуре, так и в различных ассоциациях: для глотки и носа резидентной микрофлорой являются альфа- и гамма-стрептококки, микроорганизмы рода *Neisseria*, *Micrococcus spp.*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Lactobacillus spp.* Условно-патогенная флора представлена *Staphylococcus aureus*, представителями порядка *Enterobacteriales*, гемофильными палочками, бактероидами, неферментирующими микроорганизмами, такими как *A.baumannii*, *P.earuginosa*.

Патогенная микрофлора включает бета-гемолитический стрептококк (*Streptococcus pyogenes*), пневмококки (*Streptococcus pneumoniae*) и возбудители капельных инфекционных заболеваний: коклюша, дифтерии, менингита и др. При подозрении на указанные заболевания проводится микробиологический анализ согласно действующим инструкциям.

При воспалительных процессах уха могут быть обнаружены *S.aureus* и

S.epidermidis, *S. pyogenes* и *S.pneumoniae*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* и *Corynebacterium*. Также возможно выделение грамотрицательной кишечной микрофлоры – *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*.

Микрофлора носовых ходов. В исследуемом материале наиболее часто обнаруживают дифтероиды, коагулазаотрицательные стафилококки, α -гемолитические стрептококки, нейссерии, а также можно выделить *S.aureus*, *E. coli*, β -гемолитические стрептококки, протей и др.

Сбор биоматериала из полости носа производится согласно приложения 1.

Аспират из придаточных пазух: исследуют при бактериальных синуситах помимо исследования микрофлоры носовой полости. Материал отсылают в лабораторию в анаэробной транспортной среде или непосредственно в шприце.

Не рекомендуется исследовать промывную жидкость из носоглотки, так как образцы контаминируются нормальной микрофлорой верхних дыхательных путей, что не позволяет правильно трактовать результаты анализа.

При хронических синуситах возможен прицельный забор материала для микробиологического исследования с использованием эндоскопов.

Микрофлора зева: Микробиоценоз еще более разнообразный. Здесь смешивается микрофлора ЖКТ и воздухоносных путей, то из зева выделяет комменсалы и патогены, относящиеся к обеим системам. У здоровых лиц отмечают значительные вариации в составе микробных ценозов. Представителями резидентной микрофлоры считают микоплазмы, дифтероиды, коагулазаотрицательные стафилококки, α -гемолитические и негемолитические стрептококки, микроорганизмы рода *Neisseria*, энтерококки, бактероиды, превотеллы, боррелии, трепонемы, актиномицеты, *Moraxella catarrhalis*, *S. pneumonia*, *H. influenza*, нокардии и кишечные бактерии. Исследуют прежде всего для выявления α -гемолитических стрептококков группы А, *H. influenzae* (при эпиглотитах). При наличии специфического анамнеза проводят исследование для исключения гонококковой этиологии фарингита. Не следует брать материал при воспалённом надгортаннике, так как может возникнуть обструкция дыхательных путей!

Внимание: При взятии пробы со слизистой зева (глотки) нельзя касаться щёк, языка, дёсен, а также собирать слюну.

Забор материала при инфекциях верхних дыхательных путей (зев, ухо) производится согласно приложения 1.

1) Бактериоскопия

• **Бактериоскопия нативного окрашенного материала:** Во всех случаях исследования окрашивание мазков проводят по Граму. При подозрении на туберкулез - окрашивают методом Циль-Нильсена, на актиномикоз - по Романовскому-Гимзе.

При положительных находках может быть дан ориентировочный ответ. Дальнейший ход микробиологического исследования определяется видом предполагаемого возбудителя.

2) Бактериологическое исследование

Так как заболевания верхних дыхательных путей вызываются различными микроорганизмами, в первый день исследования необходимо производить посев на несколько питательных сред: 5% кровяной агар методом секторальных посевов, шоколадный агар, среда Эндо, среда Сабуро, желточно-солевой агар. Термостатирование проводят при 37°C 24 часа, 5% кровяной агар инкубируют в атмосфере CO₂ - в эксикаторе со свечой. Посев на среде Сабуро выдерживают при 22-25°C не менее 5 суток.

На второй день просматривают сделанные накануне посеvy.

При появлении роста на плотных питательных средах изучают выросшие колонии; проводят качественную и количественную оценку бактериального роста на кровяном агаре (см.табл.2), выделяют чистую культуру предполагаемого возбудителя.

Проводят дальнейшее изучение с целью идентификации различными методами, которые используют в лаборатории (ручные, автоматизированные системы, масс-спектрометрия малди тоф) и определения чувствительности к антибиотикам согласно действующей версии стандарта Eucast.

3) Оценка результатов

При выявлении специфических возбудителей интерпретация результатов не вызывает трудностей. В других случаях, когда процесс вызывается условно-патогенными бактериями, необходимо применение количественных критериев оценки. Преобладающий в мазке нативного материала, окрашенного по Граму, вид микроба, массивность роста однотипных колоний, повторность выделения культур дают возможность сделать заключение о возможном возбудителе процесса.

Необходимо иметь в виду, что в процессе лечения антибактериальными средствами нередко происходит замена бактериальной флоры на грибковую.

2.5. Исследование микрофлоры нижних дыхательных путей

В этиологии воспалительных процессов нижних дыхательных путей имеют значение следующие виды бактерий: *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *M. tuberculosis*. При исследовании отделяемого нижних дыхательных путей могут быть также выявлены *S.epidermidis*, *S.viridans*, *Micrococcus spp.*, *E. faecalis*, *Neisseria spp.*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *Candida spp.*.

Основные возбудители острых бактериальных трахеитов и бронхитов - *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* типа α, β - гемолитические стрептококки. В последнее время это также микроорганизмы порядка *Enterobacterales*.

Мокрота: Исследуют свободно откашливаемую мокроту, утреннюю

порцию, натошак. Пациент предварительно должен почистить зубы, дёсны, язык, слизистую оболочку щёк зубной щёткой и прополоскать рот кипяченой водой. Если мокрота отделяется плохо, накануне пациенту дают отхаркивающие средства или проводят ингаляцию физ. раствором. Мокроту собирают в стерильный широкогорлый контейнер.

Сроки доставки мокроты в лабораторию не должны превышать 1,5-2 часа от момента её получения (допускается хранение в холодильнике, но не более 6 часов), т.к. задержка ведёт к аутолизу *S. pneumoniae*, а за счёт размножения бактерий-контаминантов меняется истинное соотношение микрофлоры бронхиального секрета.

Обнаружение при микроскопии под малым увеличением микроскопа в препарате мокроты большого количества эпителиальных клеток, особенно при отсутствии гранулоцитов, свидетельствует о том, материал был взят неправильно (с примесью слюны). Качество собранной мокроты можно оценить по данным микроскопии мазков, окрашенных по Граму, под малым увеличением (объектив x10) согласно одной из приведенных ниже шкал. При использовании шкалы Barlett просматривают 20 – 30 полей зрения, давая каждому оценку и суммируя баллы (табл. 3), затем рассчитывают средний балл. Если полученный результат ≤ 0 , вероятность воспаления мала или мокрота, вероятно, контаминирована в ротовой полости. Дальнейшее исследование такого материала нецелесообразно, материал необходимо взять повторно.

Таблица 3. Схема Barlett оценки правильности взятия мокроты

Тип клеток	Количество клеток в поле зрения при микроскопии с объективом x10	Балл
Нейтрофилы	<10	0
	10-25	+1
	>25	+2
Присутствие слизи	-	+1
Эпителиальные клетки	10-25	-1
	>25	-2

При оценке мокроты по Murray Washington принадлежность образца к определенной группе устанавливается по таблице 4. При этом бактериологическому исследованию подлежат только образцы, отнесенные к 4 – 5-ой группе.

Таблица 4. Схема Murray Washington оценки правильности взятия мокроты

Группа	Количество клеток в поле зрения при микроскопии с объективом x10	
	Эпителиальные клетки	Лейкоциты
1	25	10
2	25	10-25
3	25	25

4	10-25	25
5	<10	25

1) Бактериоскопия

Для приготовления мазка из мокроты, распределенной тонким слоем по дну чашки, с помощью двух игл или пинцета выбирают и переносят на середину предметного стекла слизистые или гнойные комочки. Затем берут второе стекло и накладывают поверх первого. Комочки мокроты растирают между двумя стеклами до тех пор, пока не получится достаточно тонкий мазок. Препараты высушивают и фиксируют над пламенем. Один мазок окрашивают по Граму, второй микроскопируют неокрашенным для выявления друз актиномицетов или мицелия грибов. В зависимости от задач исследования готовят несколько мазков, которые окрашивают по Граму, Цилю-Нильсену или микроскопируют в нативном виде.

Первоначально препарат мокроты микроскопируют под малым увеличением микроскопа (объектив x10) для оценки правильности взятия материала и степени его загрязнения слюной, а затем проводят микроскопию мазка под большим увеличением (иммерсионный объектив x90 или x100) для обнаружения бактерий.

2) Бактериологическое исследование

Бактериологическое исследование мокроты проводят качественным или количественным методом.

При использовании качественного метода мокроту выливают в чашку Петри и с помощью игл и пинцета выбирают 2 – 3 гнойных комочка, которые трехкратно отмывают стерильным 0,9% раствором хлорида натрия для удаления сопутствующей флоры. Затем их переносят на питательную среду и тщательно равномерно растирают шпателем по ее поверхности.

В основе количественного метода исследования лежит высев на плотные питательные среды разведений, приготовленных из гомогената мокроты с использованием муколитика ацетилцистеина. Для этого в неметаллический сосуд вносят равные объемы мокроты и 0,5% раствора ацетилцистеина, тщательно перемешивают пипеткой с резиновой грушей в течение 1 – 2 мин.

Так как заболевания верхних дыхательных путей вызываются различными микроорганизмами, в первый день исследования необходимо производить посев на несколько питательных сред: 5% кровяной агар (дефибринированная кровь барана или лошади) методом секторальных посевов, шоколадный агар, среда Эндо, среда Сабуро, желточно-солевой агар. Термостатирование проводят при 37°C 24 часа, 5% кровяной агар инкубируют в атмосфере CO₂ - в эксикаторе со свечой. Посев на среде Сабуро выдерживают при 22-25°C не менее 5 суток.

На второй день просматривают сделанные накануне посевы.

При появлении роста на плотных питательных средах изучают выросшие колонии; проводят качественную и количественную оценку

бактериального роста на кровяном агаре (см.табл.2), выделяют чистую культуру предполагаемого возбудителя.

Проводят дальнейшее изучение с целью идентификации и определения чувствительности к антибиотикам согласно действующей версии стандарта Eucast.

3) Оценка результатов

При выявлении специфических возбудителей интерпретация результатов не вызывает трудностей. В других случаях, когда процесс вызывается условно-патогенными бактериями, необходимо применение количественных критериев оценки. Преобладающий в мазке нативного материала, окрашенного по Граму, вид микроба, массивность роста однотипных колоний, повторность выделения культур дают возможность сделать заключение о возможном возбудителе процесса.

Необходимо иметь в виду, что в процессе лечения антибактериальными средствами нередко происходит замена бактериальной флоры на грибковую.

Особенности хода исследования. Мокроту выливают в стерильную чашку Петри, запаянными стеклянными палочками отбирают 2 - 3 комочка, которые промывают в стерильном физиологическом растворе или мясопептонном бульоне (рН 7,2 - 7,4). Рекомендуются также гомогенизация мокроты перед посевом. В этом случае мокроту отбирают в стеклянную банку с бусами, в лаборатории мокроту смешивают в соотношении 1:2 с физиологическим раствором или мясопептонным бульоном и встряхивают до разбивания комочков. Из материала делают мазки на двух предметных стеклах для бактериоскопического исследования. Стерильным стеклянным шпателем производят посев двух-трех гнойных комочков или двух-трех капель гомогената, растирая материал по поверхности чашек Петри с питательной средой. В качестве питательных сред рекомендуется использовать 5% кровяной агар, 10% ЖСА и среду Макконки. Чашки помещают в термостат на 18 - 24 часа при 37 °С.

Через 24 часа чашки с посевами вынимают из термостата, изучают выросшие на питательных средах колонии, идентифицируют их и определяют антибиотикочувствительность. Ответ о результатах исследования может быть получен через 2 - 3 суток.

Посев первичного материала проводят на специальные питательные среды с высоким содержанием аминного азота и нативного белка животного происхождения.

Для материала, не содержащего нормофлору, используют кровяной, шоколадный, колумбийский агары, а также полужидкую тиогликолевую среду в качестве среды обогащения в которой посевной материал оставляют на сутки в стандартном режиме инкубации при + 35° +37°С 16-20 часов.

При выделении пневмококка из нестерильного материала предпочтение отдают питательным средам со специальными ингибирующими добавками (CNA-агар).

В плотной среде необходимо предусмотреть присутствие дефибрированной крови барана или лошади для оценки гемолитических свойств пневмококка. С учетом сложившейся лабораторной практики допускается использование человеческой крови (эритроцитарной массы). При этом следует помнить о возможности получения сомнительных результатов.

В первый квадрант вносят материал, проворачивая тампон и придавливая его к поверхности агара. Жидкий материал вносят стерильной пипеткой или наконечником дозатора в объеме 0,05 мл (1 капля).

Во второй и следующие квадранты материал засевают микробиологической петлей, захватывая площадку предыдущего квадранта лишь двумя штрихами. Между посевами на квадранты петлю стерилизуют прожиганием, либо меняют ее при использовании одноразовых петель. Не допускается касания краев чашки Петри. На каждом квадранте производят по 10 штрихов (рис. 2.).

Инкубацию посевного материала, по возможности, осуществляют в атмосфере с повышенным содержанием CO_2 . Наиболее распространенным методом создания таких условий является использование эксикатора, в который помещается зажженная свеча, при горении утилизирующая кислород. Когда свеча гаснет, концентрация CO_2 достигает 3% (не допускается использование свечи с красителями). Однако наиболее эффективным является применение CO_2 термостата или анаэроостата со специальными газогенераторными пакетами.

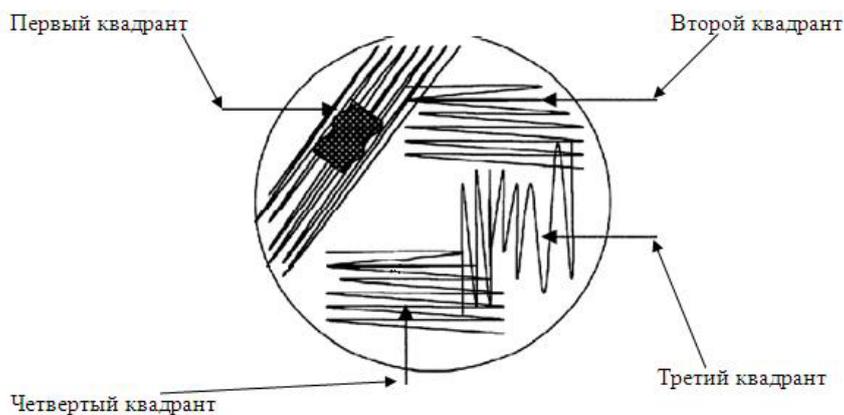


Рис. 2. Посев методом истощающих штрихов (квадрантов)

Через 16-20 часов инкубации в стандартном режиме *S. pneumoniae* формируют мелкие, округлые, блестящие, бесцветные с ровным краем и мягкой консистенции колонии с зоной α -гемолиза. В некоторых случаях (чаще при использовании человеческой крови или эритроцитарной массы) может наблюдаться зона гемолиза промежуточной формы (между α - и β -).

В зависимости от степени выраженности капсулы, отмечено несколько типов колоний.

Колонии с сильно развитой капсулой (преимущественно у *S. pneumoniae* серотипа 3 имеют несколько миллиметров в диаметре, напоминают каплю

масла на агаровой поверхности и бывают настолько слизистыми, что их идентификация не представляет существенных проблем. В полужидкой питательной среде такие изоляты, как правило, дают нежный хлопьевидный осадок (комочек ваты).

Колонии с менее выраженной капсулой обычно небольших размеров, их выделение сопряжено с определенными трудностями. При длительной инкубации (до 48ч) центральная часть колонии может опускаться, давая характерную «блюдецобразную форму» до полного уплощения и образования на поверхности агара "шляпки гвоздя", что объясняется действием пневмококковых аутолизиннов.

Авирулентные формы пневмококков на плотных средах формируют гладкие, компактные, точечные колонии. В полужидкой среде имеют придонно-пристеночный рост. Именно такие формы необходимо, прежде всего, идентифицировать не только от близких видов стрептококков, но и от других представителей бактериальной флоры (*Neisseria*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*).

Фенотипическую идентификацию *S.pneumoniae* проводят по таким признакам, как отсутствие каталазной и оксидазной активности, а так же по специфическим методам, основными из которых являются **чувствительность к оптохину** (зона задержки роста вокруг диска превышает 14 мм при концентрации препарата в диске 6 мкг и зоны задержки 15 мм при концентрации 5 мкг) и лизис бактериальной культуры в присутствии солей желчи (наличие зоны лизиса вокруг коммерческого диска с желчью в концентрации 3 мкг). Использование нативной, сухой или медицинской желчи не обеспечивает достоверных результатов, поскольку такая желчь не стандартизована по содержанию желчных кислот.

Дополнительным тестом может служить отсутствие роста бактериальной культуры пневмококка при + 45° С в стандартном режиме инкубации (тест проводят методом посева чистой культуры в полужидкую среду для контроля стерильности, разлитую в пробирку в объеме 9-10 мл). У прочих зеленящих стрептококков, составляющих нормофлору дыхательных путей (*S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. mutans* и др.) в этих условиях инкубации в питательной среде будет наблюдаться хороший бактериальный рост.

Основные дифференцирующие признаки *Streptococcus pneumoniae* от других представителей семейств *Streptococcaceae* и *Enterococcus*, схожих по тинкториальным и культуральным свойствам и дающих на агарах с содержанием крови барана и человека зоны α- или β- гемолиза представлены в таб. 5 и таб. 6.

Таблица 5. Дифференцирующие признаки штаммов *Streptococcus pneumoniae*, чувствительных к оптохину от других представителей семейства *Streptococcaceae*

Виды стрептококков	Тест с	Рост при
--------------------	--------	----------

	желчью	+ 45° С
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	-
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	-	-
<i>Streptococcus группы viridians</i>	(-)	(+)

Таблица 6. Дифференцирующие признаки штаммов *Streptococcus pneumoniae* со сниженной чувствительностью и устойчивых к оптохину от других представителей семейства *Streptococcaceae* и *Enterococcus*

Виды стрептококков	Тест с желчью	Рост при + 45° С	ПИРА -тест	Тест с гипсура том натрия
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	+	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	(-)	-	-	+
<i>Streptococcus spp. (группы viridians)</i>	(-)	(+)	(-)	(-)
<i>Enterococcus spp.</i>	-	+	+	(+)

+ – признак положительный

– – признак отрицательный

(+) – признак чаще положительный

(-) – признак чаще отрицательный

Клинически значимым при остром воспалительном процессе, считают выделение *S.pneumoniae* из мокроты в количестве $> 10^5$ КОЕ/мл; из БАЛ $> 10^4$ КОЕ/мл; из биоптата, полученного с помощью защищенных щеток $> 10^3$ КОЕ/мл (МУ 4.2.3115 -13). При исследовании стерильных жидкостей организма (кровь, плевральная жидкость, ликвор) для постановки этиологического диагноза пневмококковой инфекции основанием служит выделение *S.pneumoniae* в любом количестве.

Сбор биоматериала (трахеобронхиальные смывы, плевральная жидкость) производится согласно приложения 1.

Допускается посев плевральной жидкости (по 5 мл) в аэробные и анаэробные флаконы, используемые для исследования крови.

Диагностика других бактериальных пневмоний

Важным клинически значимым бактериальным возбудителем пневмоний является *H. influenzae*. Внебольничную пневмонию (ВП), как правило, вызывают так же микроорганизмы рода *Streptococcus*. По данным ряда исследований, *H. influenzae* чаще встречается у пациентов с сопутствующей ХОБЛ и активных курильщиков, частота инфицирования данным возбудителем выше у пациентов с нетяжелой ВП.

Представители порядка *Enterobacteriales* (*K. pneumoniae*, *E. coli* и др.), *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ранее выявлялись менее чем у 5% пациентов с

ВП и относились к категории редких возбудителей. Значимость данных микроорганизмов в настоящий момент возрастает у пациентов с тяжелой ВП, а инфицирование в несколько раз увеличивает вероятность неблагоприятного прогноза для пациента.

Как показывают эпидемиологические исследования, частота встречаемости энтеробактерий выше у пациентов с хроническими сопутствующими заболеваниями, у лиц, злоупотребляющих алкоголем, при аспирации, в случае недавней госпитализации и предшествующей АБТ. Дополнительными факторами риска инфицирования *P. aeruginosa*, *A. baumannii* являются хронические бронхолегочные заболевания (тяжелая ХОБЛ, бронхоэктазы), длительный прием системных стероидов, цитостатиков.

S. aureus редко встречается среди амбулаторных пациентов с ВП, в тоже время у лиц с тяжелым течением заболевания его удельный вес может возрасть до 10% и более. К инфицированию *S. aureus* предрасполагают многие факторы - пожилой возраст, проживание в домах престарелых, наркомания, злоупотребление алкоголем. Известно, что актуальность *S. aureus* как возбудителя ВП значительно возрастает во время эпидемий гриппа.

Каких-то специфических клинических, лабораторных или рентгенологических признаков, типичных для ВП, вызванной данными возбудителями и позволяющих отличить ее от пневмоний другой этиологии не существует. В отдельных случаях, преимущественно у лиц с иммуносупрессией или злоупотребляющих алкоголем *K.pneumoniae* может вызывать долевую пневмонию с локализацией поражения в верхней доле легкого, быстрым прогрессированием симптомов заболевания и высокой летальностью.

Для этиологической диагностики ВП, вызванной данными возбудителями, основное значение имеет культуральный метод исследования.

H. influenzae, как и пневмококк, относится к категории “прихотливых” микроорганизмов, требующих для культивирования наличия в питательных средах факторов X, V и 5-7% CO₂ в атмосфере инкубации.

Для выделения *H. influenzae* из клинического материала обычно используется шоколадный агар, 5% агар с дефибринованной лошадиной или бараньей кровью, селективный агар для выделения бактерий рода *Haemophilus*. Посев клинического материала с целью выявления представителей порядка *Enterobacterales*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* осуществляется на селективные среды для выделения грамотрицательных бактерий (агар Эндо, МакКонки и др.), *S. aureus* – на желточно-солевой агар, маннитол-солевой агар и др., а также кровяной агар, хромогенные питательные среды при наличии.

Клиническим материалом для исследования может являться мокрота, венозная кровь, инвазивные респираторные образцы и плевральная жидкость. При исследовании мокроты, как и для выявления пневмококков,

важное значение имеет оценка качества собранного образца. Исследование плевральной жидкости выполняется при наличии плеврального выпота и условий безопасного проведения плевральной пункции, инвазивных респираторных образцов – только по отдельным показаниям.

Следует отметить, что нетипируемые штаммы *H. influenzae* и *S. aureus* входят в состав нормальной микрофлоры верхних дыхательных путей (ВДП), причем частота бессимптомного носительства может быть достаточно высокой. С возрастом, при наличии хронических сопутствующих заболеваний, а также недавней системной АБТ возрастает частота колонизации полости рта и ВДП энтеробактериями. Этот факт необходимо учитывать при клинической интерпретации результатов бактериологического исследования респираторных образцов, особенно мокроты.

Информативность культурального исследования респираторных образцов и крови в значительной степени зависит от соблюдения общепринятых правил их сбора, хранения и транспортировки. Идентификация основана на определении питательных потребностей возбудителей и результатах биохимических тестов. Для идентификации всех указанных микроорганизмов разработаны коммерческие биохимические панели и наборы реагентов, могут использоваться автоматизированные микробиологические анализаторы, которые уменьшают трудоемкость культурального исследования.

При подозрении на ВП, вызванную *S. aureus*, важное значение приобретает не только выделение и идентификация возбудителя, но и определение его чувствительности к оксациллину и цефокситину, предпочтительнее в цефокситину (ВОЗ, EUCAST). Среди фенотипических методов детекции метициллинорезистентности используются тестирование диско-диффузионным методом с диском, содержащим 30 мкг цефокситина или 1 мг оксациллина или скрининг на агаре Мюллера-Хинтон с добавлением 4% NaCl и оксациллина в концентрации 6 мг/л. Для подтверждения инфицирования метициллинорезистентным *S. aureus* разработаны коммерческие тест-системы, основанные на выявлении в клиническом материале гена *mecA* методом ПЦР.

Диагностика пневмонии, вызванной *Mycoplasma pneumoniae*

Возбудителем респираторного микоплазмоза является *Mycoplasma pneumoniae* - представитель класса *Mollicutes*, объединяющего бесстеночные, способные к автономному существованию бактерии, по уровню структурной организации занимающие промежуточное положение между бактериями и вирусами.

Респираторный микоплазмоз - распространенное антропогенное заболевание. Особенностью респираторного микоплазмоза является периодичность эпидемий с интервалами, по данным разных источников, варьирующими от 3 до 7 лет. Распространению инфекции способствует частота и длительность контактов среди лиц, пребывающих в закрытых и

полузакрытых коллективах (военнослужащие, школы-интернаты), особенно при их формировании.

В 3—10% случаев микоплазменной инфекции рентгенологически диагностируется пневмония. При пневмонии, вызванной *M. pneumoniae*, другие бактериальные или вирусные возбудители, как правило, не обнаруживаются, однако в редких случаях также выделяется *S. pneumoniae*. В 1—5 % случаев заболеваний респираторным микоплазмозом требуется госпитализация.

Микоплазменная пневмония сопровождается частым мучительным и продолжительным кашлем со скудной вязкой мокротой, которая плохо эвакуируется, отмечаются боли в грудной клетке, может развиваться обструкция бронхов, Интоксикация нерезко выражена. Физикальные изменения в лёгких отсутствуют или слабо выражены. Рентгенологическая картина весьма вариабельна. В большинстве случаев выявляются поражения интерстиция, у части больных пневмония протекает по типу очаговой или сегментарной, иногда воспалительные изменения носят смешанный характер. Явления лёгочной недостаточности нехарактерны для микоплазменной пневмонии. Микоплазменная пневмония обычно имеет благоприятное течение, в редких случаях течение очень тяжёлое.

Диагностика микоплазменной пневмонии только на основании клинических или рентгенологических данных невозможна, поскольку не имеет патогномических черт. Основная роль в подтверждении микоплазменной этиологии пневмонии отводится лабораторной этиологической диагностике. Для этиологической диагностики микоплазменной пневмонии применяют:

- обнаружение ДНК *M. pneumoniae* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), основным методом для прямого выявления ДНК *M. pneumoniae* является на настоящий момент стандартная полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией методом электрофоретического разделения ДНК, однако наибольшей специфичностью и чувствительностью обладает ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ);
- выявление антигена микоплазм в реакции прямой иммунофлуоресценции (РИФ);
- серологические исследования по обнаружению специфических антител класса IgM и IgG к *M. pneumoniae* в сыворотках крови методом иммуноферментного анализа (ИФА).
- Идентификация на масс-спектрометре малди тоф.

M. pneumoniae относится к трудно культивируемым микроорганизмам; процесс выделения занимает 3—5 недель, поэтому культуральный метод не может быть рекомендован для использования диагностическими лабораториями.

С целью быстрой этиологической диагностики пневмонии рекомендуется использовать ПЦР, масс-спектрометрию малди тоф при исследовании биологического материала, полученного из нижних дыхательных путей (мокрота при глубоком откашливании, аспираты из

трахеи, мокрота, полученная в результате индукции посредством ингаляции гипертонического раствора натрия хлорида, жидкость бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), получаемая с помощью фибробронхоскопии).

При получении положительного результата при исследовании биологического материала, полученного из нижних дыхательных путей, этиология пневмонии считается установленной. При невозможности получения биологического материала из нижних дыхательных путей для ПЦР, масс-спектрометрии допустимо использовать мазки из верхних дыхательных путей (объединенный мазок из носоглотки и задней стенки глотки), и при получении положительного результата следует считать этиологию пневмонии предположительно установленной. Однако получение отрицательного результата ПЦР при исследовании мазков из верхних дыхательных путей не может свидетельствовать об отсутствии микоплазменной инфекции. В этом случае рекомендуется серологическая диагностика с учетом совокупности результатов по обнаружению специфических антител классов IgM и IgG в парных сыворотках, исследуемых одновременно.

С целью ретроспективной диагностики, когда больной уже находится в стадии реконвалесценции, необходимо использовать серологические исследования.

Первичный иммунный ответ характеризуется синтезом IgM-антител через 1—3 недели с момента заражения, обнаружение которых свидетельствует об острой фазе инфекции. Иммуноглобулины классов G появляются к концу 3—4 недели. Диагноз микоплазменной респираторной инфекции подтверждает 4-кратная сероконверсия специфических антител в парных сыворотках крови.

Непосредственное обнаружение антигенов *M. pneumoniae* в различных биосубстратах (мазки из носоглотки, лаважная жидкость, биоптаты), полученных от больных с респираторной патологией, до настоящего времени в отдельных диагностических лабораториях проводят с использованием РИФ. Этот метод в сочетании с выявлением специфических антител к микоплазме в ИФА дает возможность подтвердить заболевание, вызванное *Mycoplasma pneumoniae*. Следует учитывать, что гуморальные антитела сохраняются несколько лет.

Для достоверной и окончательной этиологической диагностики микоплазменной пневмонии с учетом возможности персистенции данного возбудителя в организме человека без выраженных клинических проявлений рекомендуется дополнительное подтверждение установленного диагноза каким-либо из перечисленных выше методов.

2.6. Исследование микрофлоры ран, пунктатов, экссудатов различных органов

При развитии воспалительных процессов могут быть обнаружены *S. aureus*, *S. pyogenes*, различные представители энтеробактерий – *Klebsiella spp.*, *E. coli*, *Proteus spp.* и др.), *P. aeruginosa*, *A. baumannii*. а также *S.*

viridans, *S. epidermidis*, *Neisseria spp.* и другие микроорганизмы, которые относятся к представителям резидентной микрофлоры.

К основным возбудителям раневой инфекции, входящим в состав первичного микробного загрязнения, относили микроорганизмы, каждый из которых может самостоятельно вызывать инфекционный процесс, о чем свидетельствовали значительная частота обнаружения и высокая концентрация их в тканях раны (до 10^6 КОЕ/г и выше), выраженная вирулентность и устойчивость к антимикробным препаратам. Таким требованиям удовлетворяли следующие микроорганизмы: *P. aeruginosa*, *Bacteroides spp.*, *Acinetobacter spp.*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Fusobacterium spp.*, *E. coli*, *A. hydrophila*, *Clostridium spp.*, *Peptococcus spp.*, *S. pyogenes*, *A. faecalis*, *Peptostreptococcus spp.*, *P. stuartii*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae*.

Вторая группа (второстепенные возбудители) была представлена микроорганизмами, которые в большинстве случаев не могли самостоятельно вызывать раневую инфекцию (низкие концентрации и частота обнаружения в патологическом материале), однако, присоединяясь к основным возбудителям гнойно-септических осложнений, они обладали способностью утяжелять течение раневого процесса. К таковым относились, например, микроорганизмы рода *Bacillus*, которые вырабатывают разрушающий антибиотики пенициллинового ряда фермент (пенициллиназу) и тем самым защищают чувствительные к пенициллинам ассоцианты от действия соответствующих β -лактамов препаратов. К второстепенным возбудителям "первичной", т. е. явившейся следствием микробного загрязнения раны, раневой инфекции отнесены также *Bacillus spp.*, *S. viridans*, *Corynebacterium spp.*, *S. saprophyticus*, *Veillonella spp.*, *Candida spp.*

Забор материала для исследования см. Приложение 1

1) Бактериоскопия

- Из кусочков тканей, гноя и т.д. готовят мазки-отпечатки и окрашивают по Граму. При микроскопии отмечают степень обсемененности бактериями, морфологию и тинкториальные свойства микроорганизмов.

- **Бактериоскопия нативного окрашенного материала:** Во всех случаях исследования окрашивание мазков проводят по Граму. При подозрении на туберкулез - окрашивают методом Циль-Нильсена, на актиномикоз - по Романовскому-Гимзе.

При положительных находках может быть дан ориентировочный ответ. Дальнейший ход микробиологического исследования определяется видом предполагаемого возбудителя.

2) Бактериологическое исследование

Так как возбудителями воспалительных процессов могут быть различные микроорганизмы, в первый день исследования необходимо производить посев на несколько питательных сред: 5% кровяной агар

методом секторальных посевов, шоколадный агар, среда Эндо, среда Сабуро, желточно-солевой агар. Термостатирование проводят при 37°C 24 часа. Посев на среде Сабуро выдерживают при 22-25°C не менее 5 суток.

На второй день просматривают сделанные накануне посеvy.

При появлении роста на плотных питательных средах изучают выросшие колонии; проводят качественную и количественную оценку бактериального роста на кровяном агаре (см.табл.2), выделяют чистую культуру предполагаемого возбудителя.

Проводят дальнейшее изучение с целью идентификации и определения чувствительности к антибиотикам согласно действующей версии стандарта Eucast.

3) Оценка результатов

При выявлении специфических возбудителей интерпретация результатов не вызывает трудностей. В других случаях, когда процесс вызывается условно-патогенными бактериями, необходимо применение количественных критериев оценки. Преобладающий в мазке нативного материала, окрашенного по Граму, вид микроба, массивность роста однотипных колоний, повторность выделения культур дают возможность сделать заключение о возможном возбудителе процесса.

Необходимо иметь в виду, что в процессе лечения антибактериальными средствами нередко происходит замена бактериальной флоры на грибковую.

2.7. Исследование микрофлоры мочи

Исследуют утреннюю среднюю порцию (10-20мл) свободно выпущенной мочи (за ночь концентрация бактерий в мочевом пузыре возрастает).

Не следует принуждать пациента к приему жидкости для форсирования диуреза, так как происходит разбавление мочи и снижение числа бактерий.

Для сбора мочи используют стерильные ёмкости. Нельзя собирать мочу из мочеприемника или судна.

Доставка мочи в лабораторию должна осуществляться в максимально короткие сроки. Посев следует проводить не позднее 2 ч после взятия материала либо в течение 8 ч при условии ее хранения в холодильнике. (При 4°C число бактерий в моче обычно остается стабильным в пределах 24 ч).

Взятие мочи следует повторить, если нет условий для ее хранения в холодильнике, и с момента взятия образца прошло более 2 часов, в противном случае результаты анализа могут быть недостоверными.

Недопустимо микробиологическое исследование мочи, собранной в течение суток. Не рекомендуется исследовать мочу, полученную при наличии постоянного катетера.

1) Бактериоскопия

Бактериоскопия нативного материала не проводится.

2) Бактериологическое исследование

Целью бактериологического анализа мочи является: выделение и идентификация возбудителя ИМП и определение его концентрации в образце мочи (степени бактериурии). Если сопоставление полученных результатов с данными анамнеза и клинического обследования пациента позволяет констатировать этиологическую значимость выделенного микроорганизма в заболевании, далее определяют его чувствительность к антимикробным препаратам.

Для выделения бактерий из мочи применяют универсальные, селективные и дифференциально-диагностические среды. Универсальные питательные среды (кровяной агар, среда CLED, хромогенные питательные среды) поддерживают рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Кровяной агар пригоден для культивирования как неприхотливых, так и прихотливых бактерий, но при высокой концентрации многие быстро растущие микроорганизмы дают на нем газонный рост, ингибируют формирование колоний других микроорганизмов и маскируя их. На среде CLED ингибируется феномен роения протеев и одновременно по изменению цвета среды можно судить о способности изолятов ферментировать лактозу. Колумбийский CNA агар предназначен для селективной изоляции грамположительных микроорганизмов. Из числа селективных сред для грамотрицательных бактерий чаще всего применяют среды МакКонки и Эндо, позволяющие проводить первичную дифференциацию выросших культур по способности ферментировать лактозу). Хромогенные среды облегчают и ускоряют идентификацию изолятов бактерий на основании выявления у них специфической ферментативной активности, обеспечивающей их специфическое окрашивание.

Существует несколько вариантов посева мочи.

Посев секторами. Титр бактерий в моче определяют методом секторных посевов. Метод стандартизирован для исследования объема мочи, равного 0,005 мл.

- Дно чашки Петри делят на 4 равные сектора, обозначаемые буквами А, Б, В и Г;
- Стерильной микробиологической петлей, тарированной на объем 0,005 мл, выполнить посев мочи 30-40 штрихами в секторе А;
- Прожечь петлю и провести 4 штриховых посева из сектора А в сектор Б, а затем аналогичным путем из сектора Б в сектор В и из сектора В в сектор Г.

При обнаружении роста микроорганизмов учитывают морфологические типы и определяют их концентрацию в исследованной пробе. Определение титра бактерий в моче при ее посева 4-секторным методом проводят согласно таблице 7.

Таблица 7. Определение степени бактериурии 4-секторным методом

Количество колоний в секторах	Количество
-------------------------------	------------

А	Б	В	Г	бактерий в 1 мл мочи
1-6	-	-	-	менее 1000
8-20	-	-	-	3000
20-30	-	-	-	5000
30-60	-	-	-	10000
70-80	-	-	-	50000
100-150	5-10	-	-	100000
нельзя сосчитать	20-30	-	-	500000
"-"	40-60	-	-	1 млн.
"-"	100-140	10-20	-	5 млн.
"-"	нельзя сосчитать	30-40	-	10 млн.
"-"				100 млн.

Оценивают этиологическое значение выросших микроорганизмов по установленной степени бактериурии (таблица 7).

Второй метод посева рекомендован американским обществом микробиологов (ASM). Посевы мочи проводят полуколичественно с использованием калиброванной инокуляционной петли (1, 10 или 100мкл). Материал распределяют по поверхности питательной среды вертикальным, а затем горизонтальными штрихами, отстоящими друг от друга не небольшом расстоянии.

Для определения титра бактерий в моче при посеве несекторным методом в объеме 1, 10 и 100 мкл число колоний умножают на коэффициенты 10^3 , 10^3 , и 10. Соответственно (таблица 8).

Таблица 8. Определение степени бактериурии несекторным методом

Объем высевной мочи	Число выросших колоний	Титр бактерий в моче, КОЕ/мл
1 мкл	1	10^3
	10	10^4
	100	10^5
10 мкл	1	10^2
	10	10^3
	100	10^4
100мкл	1	10^1
	10	10^2
	100	10 ³

При установлении диагностически значимой степени бактериурии проводят идентификацию выделенных из мочи микроорганизмов по культуральным, биохимическим и тинкториальным свойствам, которые определяют ручными методами, коммерческими тест-системами, автоматическими микробиологическими анализаторами или масс-

спектрометрическим анализом.

Дальнейшую идентификацию проводят только для вероятных уропатогенов. С этой целью пользуются стандартными методами, внедренными в повседневную практику работы лабораторий, включающие: изучение культуральных, биохимических, тинкториальных и агглютинационных свойств в формате ручных методов, коммерческих панелей для визуального учета или для автоматических анализаторов. С этой целью можно применять масс-спектрометрический анализ белковых профилей выделенных культур при наличии соответствующей аппаратуры (MALDI-TOF, SELDI-TOF).

3) Оценка результатов

При интерпретации результатов бактериологического исследования мочи следует учитывать следующие критерии:

- наличие у пациента клинических проявлений ИМП;
- соблюдение стандартных процедур взятия, транспортировки и исследования (инокулированный объем, техника посева) проб мочи;
- результаты отдельных лабораторных исследований – количество выделенных бактерий (моно- или смешанная культура), их уропатогенность, их титр в моче.

ИМП могут протекать в форме моно- и смешанных инфекций, при которых из мочи выделяют 1 или 2 вида патогенных бактерий, соответственно.

Если в посевах обнаруживают 3 и большее количество морфологически различающихся колоний бактерий, то это рассматривают как признак случайной контаминации исследуемой пробы: в таких случаях у пациента повторно берут пробу мочи для бактериологического анализа с максимально возможным соблюдением правил проведения всех его этапов, предотвращающих попадание в нее посторонней микрофлоры.

Патогенный потенциал выделенных культур бактерий оценивают в соответствии со следующей классификацией:

Первичные возбудители ИМП (группа I): *E. coli* и *S. saprophyticus*, лептоспиры, сальмонеллы и микобактерии. Эти бактерии способны самостоятельно вызывать поражения органов мочевой системы. *E. coli* изолируют в большинстве случаев ИМП. Частота изоляции *S. saprophyticus* значительно ниже (<10 %), однако эта бактерия является основным возбудителем острого неосложненного сезонного цистита у женщин. Лептоспиры, сальмонеллы и микобактерии изолируют спорадически.

Вторичные возбудители ИМП (группа II): *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *Citrobacter spp.*, *Morganella spp.*, *Serratia spp.*, *C. urealyticum*, *Haemophilus spp.* и *S. pneumoniae*. Проявляют патогенные свойства преимущественно на фоне других инфекций, ослаблении иммунитета, после инвазивных диагностических и лечебных процедур. Частота изоляции в таких случаях первых 4 упомянутых бактерий варьирует от 1 до 10%, *P. vulgaris*, *S. aureus*,

Citrobacter spp., *Morganella spp.*, *Serratia spp.* не превышает 1%, *S. urealyticum*, *Haemophilus spp.* и *S. pneumoniae* — менее 0,1% (последние 2 группы бактерий поражают преимущественно детей).

Сомнительные возбудители ИМП (группа III): коагулазо-негативные стафилококки (за исключением *S. saprophyticus*), *S. agalactiae*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Вызывают клинически значимые ИМП очень редко.

Помимо патогенных бактерий из мочи нередко выделяют *G. vaginalis*, α -стрептококки, лактобациллы, бифидобактерии и дифтероидные палочки, являющиеся компонентами нормальной микрофлоры уретры и половых органов — их изоляция из мочи не имеет диагностического значения.

Диагностически значимым титром патогенных бактерий в моче считают (таблица 9):

А. При исследовании 1 мкл проб, полученных при свободном мочеиспускании от пациентов с симптомами ИМП:

- для первичных патогенов (группа I) при изоляции их в моно- или смешанной культуре с еще одной бактерией — $\geq 10^3$ КОЕ/мл;
- для вторичных патогенов (группа II) при изоляции их от мужчин и женщин в монокультуре — 10^3 и 10^4 КОЕ/мл, соответственно;
- для вторичных патогенов (группа II) при изоляции их в смешанной культуре с еще одной бактерией и сомнительных патогенов (группа III) — $\geq 10^5$ КОЕ/мл.

В. При исследовании 10 мкл проб, полученных при свободном мочеиспускании от пациентов с симптомами ИМП:

- для первичных патогенов (группа I) при изоляции монокультуры — $\geq 10^2$ КОЕ/мл.

С. При исследовании 100 мкл проб, полученных надлобковой пункцией (независимо от того, выражены или отсутствуют у пациентов симптомы ИМП):

- для всех групп бактерий выделенных в моно- или смешанной (не более 2 видов) культуре — $\geq 10^1$ КОЕ/мл.

Г. При исследовании 10 мкл проб, полученных цистоскопией или катетеризацией (независимо от того, выражены или отсутствуют у пациентов симптомы ИМП):

- для всех групп бактерий, выделенных в моно- или смешанной (не более 2 видов) культуре — $\geq 10^2$ КОЕ/мл.

Д. При исследовании 1 мкл проб, полученных через постоянный катетер:

- для всех групп бактерий, выделенных в моно- или смешанной (не более 2 видов) культуре от пациентов с симптомами ИМП — $\geq 10^4$ КОЕ/мл;
- для всех групп бактерий, выделенных в моно- или смешанной (не более 2 видов) культуре от пациентов без клинических проявлений ИМП — $\geq 10^5$ КОЕ/мл.

Таблица 9. Интерпретация результатов бактериологического анализа мочи

Способ взятия мочи	Наличие симптомов ИМТ*	Тестируемый V, мкл	Обнаружение патогенных бактерий		Диагностически значимый титр (КОЕ/мл)
			группа	кол-во видов	
Сбор средней порции при свободном мочеиспускании	+	1	I	1-2	10^3
			II	1	10^3 (мужчины)
			II	1	10^4 (женщины)
			II	2	10^5
			III	1	10^5
-	1	I-III	1	10^5	
+	10	I	1	10^2	
Надлобковая пункция	±	100	I-III	1-2	10^1
Цистоскопия, катетеризация	±	10	I-III	1-2	10^2
Постоянный катетер	+	1	I-III	1-3	10^4
	—	1	I-III	1	10^5

Отделяемое уретры

Сбор биоматериала производит врач-уролог согласно приложения 1. Материал собирают не ранее, чем через 2-3 часа после мочеиспускания.

Исследование материала

Методы, применяемые для исследования взятого материала, зависят от предполагаемого возбудителя заболевания и могут включать бактериоскопию, посеvy на питательные среды, иммунологические и молекулярные лабораторные тесты., предназначенные для обнаружения микроорганизмов, их антигенов или нуклеиновых кислот:

- Бактериоскопия мазков, окрашенных метиленовым синим и по Граму; для обнаружения *N.gonorrhoeae*, *Gardnerella vaginalis*, *Trichomonas vaginalis* и грибов *Candida spp.*;
- Посев отделяемого уретры и секрета половых желез для выявления *N.gonorrhoeae* и условно-патогенных бактерий, трихомонад и грибов;
- Цитологического исследования соскобов из уретры, окрашенных по Романовскому – Гимзе, для выявления внутриэпителиальных включений хламидий.

Оценка результатов

Обнаружение уреоплазм, *Candida spp.* и условно-патогенных бактерий

не всегда свидетельствует об их этиологической роли, т.к. данные микроорганизмы часто входят в состав нормальной микрофлоры уретры.

Для оценки этиологической роли уреоплазм предложены следующие критерии:

- - обнаружение возбудителя в титре выше 10^4 КОЕ/мл в секрете предстательной железы или более 10^3 КОЕ/мл в моче;
- - обнаружение в посевах уреоплазм при отсутствии других патогенных микроорганизмов и нарастании титра антител при исследовании парных сывороток.

Уретриты, вызванные условно-патогенными бактериями, встречаются крайне редко. Диагностика этих заболеваний основана на сведениях о титре бактерий в исследуемом материале, постоянстве видового состава микрофлоры и ее мономорфизме, наличии и выраженности фагоцитарной реакции и отсутствии других инфекционных агентов.

Секрет простаты

Сбор биоматериала производит врач-уролог согласно приложения 1. Материал собирают не ранее, чем через 2-3 часа после мочеиспускания.

Исследование материала

Из полученного материала готовят мазки, которые исследуют под световым микроскопом в нативном мазке и после окраски. При обнаружении в пробах бактерий проводят посев материала на соответствующие питательные среды с последующей идентификацией выделенных изолятов.

Оценка результатов

Первая проба мочи характеризует состояние микрофлоры уретры, вторая – мочевого пузыря, третья – простаты.

На наличие у пациента хронического бактериального простатита указывают:

- 1) обнаружение лейкоцитов в моче после массажа простаты в количестве более 10 в 1 мл и в соке простаты более 10 в поле зрения;
- 2) увеличение количества бактерий в 3-ей пробе мочи более чем в 10 раз по сравнению со 2-й пробой;
- 3) Обнаружение в 3-й пробе микроорганизмов, отсутствовавших в 1-й и 2-й пробах.

Наиболее вероятная причина хронических бактериальных простатитов – грамотрицательные уропатогенные микроорганизмы (*E.coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*), менее вероятная – грамположительные бактерии (*E.faecalis*, *Staphylococcus spp.*).

Правила сбора спермы

Сбор биоматериала производит врач-уролог согласно приложения 1. Материал собирают не ранее, чем через 2-3 часа после мочеиспускания.

2.8. Исследование крови

При исследовании крови могут быть обнаружены стафилококки,

стрептококки, гемофильные палочки и возбудители инфекционных заболеваний, сопровождающиеся бактериемией. Помимо этих микроорганизмов, в крови могут находиться представители условно-патогенной микрофлоры: *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *A.baumannii*, *Klebsiella spp*, *E.coli*, *Proteus spp*. и другие. Роль этих микроорганизмов в развитии сепсиса должна решаться в каждом случае индивидуально путем сравнения с микрофлорой первичного очага, повторностью выделения одинаковых видов, родов микроорганизмов.

Исходя из современных методических возможностей установление этиологии бактериемий, обусловленных анаэробной бесспоровой микрофлорой, как и в других образцах отделяемого различных органов человеческого организма, в настоящее время ограничено из-за отсутствия унифицированных методик, пригодных к использованию в условиях практических лабораторий. В данном разделе изложена методика исследования на аэробную бесспоровую микрофлору.

Забор крови

- в случае оснащения лаборатории автоматизированными системами бактериологического исследования крови забор крови проводят согласно Приложению 1;
- в случае отсутствия в отделении флаконов для гемокультур забор крови производят следующим образом:

Кожу над пунктируемой веней обрабатывают 70% спиртом, затем 5% настойкой йода, затем снова спиртом. При наличии у больного постоянного подключичного катетера или капельницы в вене можно воспользоваться ими для получения крови. Некоторому количеству крови дают свободно стечь в пробирку (эту кровь можно использовать для биохимических анализов), затем набирают кровь в шприц для посева. Для полноценного бактериологического анализа нужно получить 12-20 мл крови, которую тут же засевают на набор питательных сред. Для получения "толстой капли" одну каплю крови из шприца или системы помещают на предметное стекло и подсушивают ее на воздухе, фиксируют метиловым спиртом или смесью Никифорова (спирт - эфир аа) и затем окрашивают спиртово-водным раствором метиленового синего (96% этилового спирта - 10 мл, метиленового синего - 1 г, дистиллированной воды - 100 мл) или по Романовскому-Гимза. Рекомендуется производить посев крови у постели больного, на несколько питательных сред, чтобы обеспечить возможность роста максимально большому числу возможных возбудителей. Минимально следует использовать две среды: "двойную среду" и "среду для контроля стерильности". В настоящий момент использование данного метода должно быть сведено к минимуму вследствие низкой чувствительности и специфичности.

Исследование сосудистого катетера.

Исследуют при подозрении на инфекцию катетерного происхождения.

В асептических условиях отрезают его дистальный (внутрисосудистый) конец около 5 см длиной. Помещают в стерильный контейнер (пробирку). Доставляют в лабораторию немедленно. Важно не допускать высыхания образца.

Необходимость в селективных и диагностических питательных средах во многом зависит от роста и данных микроскопии. Для эффективности первичной питательной среды является количество биоматериала, взятого для посева. Рекомендуемый объем питательной среды к объему крови и используемый для посева составляет 5:1 -10:1 (на 1мл крови 5-10 мл питательной среды).

Представляется рациональной следующая схема, рекомендуемая ASM и некоторыми другими авторами:

- у детей первого года жизни – 0,5 мл крови для посева;
- у детей от 1 до 6 лет – 0,5 мл на каждый год жизни;
- у детей весом 10-30 кг – 5-10 мл;
- у детей большего веса и взрослых – 15-20 мл.

1) Бактериоскопия

Бактериоскопию крови широко применяют для диагностики инфекционных заболеваний, сопровождающихся бактериемией. Кровь для бактериоскопического исследования при правильном типе лихорадки берут за 2 ч до ее предполагаемого наступления, при неправильном типе - в вечернее время.

Для бактериоскопического исследования готовят мазок и препарат толстой капли.

2) Бактериологическое исследование

В лаборатории флаконы с посевом выдерживают в термостате в течение 10 суток, ежедневно встряхивая. При использовании автоматизированной системы по рекомендациям производителя 5-7 дней. Первый высев со среды, в которую произведен посев крови ручным методом, производят через двое суток. Пересев осуществляется на кровяной агар петлей, после чего чашку помещают в термостат при 37 °С и выдерживают в течение 24 часов. При культивировании на автоматизированных системах прибор подает сигнал о положительном флаконе, который далее используется в работе для идентификации возбудителя и определения чувствительности к антимикробным препаратам.

3) Оценка результатов

При наличии роста микроорганизмов выделяемую культуру тщательно изучают, производят бактериоскопию мазка, окрашенного по Граму, определение морфологических, культуральных, биохимических свойств, чувствительности к антибиотикам.

При отсутствии роста после первого посева флаконы с посевом крови вновь помещают в термостат и повторные высевы производят через каждые

48 часов. Последний высев производят на 10-е сутки, после чего выдают окончательный ответ: роста аэробных микроорганизмов не обнаружено. С комбинированной среды (сахарный бульон со скошенным сахарным агаром) высева не делают, а наличие роста определяют по появлению колоний на скошенном агаре.

При наличии в лаборатории автоматизированной системы для культивирования крови при положительном сигнале прибора флакон изымается. Образец идентифицируют как описано ранее, либо при наличии в лаборатории масс-спектрометра малди тоф при соответствующей инструкции, СОП имеется возможность определить возбудителя из осадка положительного образца. Отрицательный окончательный ответ при культивировании на автоматизированной системы выдается на 5-7 сутки в зависимости от рекомендаций производителя системы.

2.9. Исследование кала на патогенную и условно-патогенную микрофлору

Материал для исследования отбирается согласно Приложения 1.

1) Бактериоскопия

Бактериоскопическое исследование нативного материала не проводится.

2) Бактериологическое исследование

Посев биоматериала производится на среды обогащения и на плотные дифференциально-диагностические среды (Эндо, Левина, Плоскирева, висмут-сульфит агар), инкубируются при температуре $37(\pm 0,5)$ °С в течение 18 – 24 ч, ВСА – 48 часов.

Изучение посевов на плотных дифференциально-диагностических средах:

- просматриваются невооруженным глазом;
- отмечаются прозрачные лактозонегативные колонии, на среде Эндо – розовые колонии, на ВСА – черные колонии с металлическим блеском;
- не менее трех колоний, подозрительных на принадлежность к патогенной и/или условно-патогенной флоре, пересеваются в пробирку с одной из полиуглеводных сред (среды Олькеницкого, Клиглера), посевы инкубируются при температуре $37(\pm 0,5)$ °С в течение 18 – 24 ч.

3) Оценка результатов

Окончательная идентификация выделенных культур проводится на основании изучения тинкториальных, морфологических, биохимических и антигенных свойств.

Обнаружение в фекалиях даже патогенных микроорганизмов не всегда свидетельствует о наличии заболевания и может быть обусловлено бактерионосительством. Поэтому оценка результатов должна проводиться с

учетом клинической картины. Для установления наличия острой кишечной инфекции, обусловленной условно-патогенными микроорганизмами, необходимо учитывать следующие критерии:

- отсутствие специфических признаков заболевания, обусловленного патогенными микроорганизмами;
- обнаружение условно-патогенного микроорганизма (УПМ) в фекалиях в титре выше 10^5 КОЕ/г;
- повторное обнаружение того же микроорганизма в возрастающей концентрации;
- исчезновение УПМ из фекалий или снижение его титра на фоне проводимого лечения;
- нарастание титра антител к данному УПМ более чем в 4 раза при одновременном присутствии его в фекалиях в концентрации выше 10^5 КОЕ/г.

2.10. Исследование желчи (дуоденального содержимого).

Исследование желчи проводят с целью диагностики брюшного тифа и брюшнотифозного хронического бактерионосительства, а также воспалительных заболеваний желчного пузыря и желчных протоков (холециститы, холангиты, желчнокаменная болезнь).

Взятие материала

Желчь получают с помощью зондирования или во время операции при пункции желчного пузыря.

При зондировании над пламенем спиртовки собирают в стерильные пробирки 3 порции желчи (по 10 – 12 мл) – для бактериологического исследования предпочтительна средняя порция.

В норме желчь стерильна, но при инфицировании желчи в 70%-80% случаев высевают *E. coli*, *Enterococcus spp.*, несколько реже *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp.*, а также *Salmonellas pp.* (при временном и хроническом бактерионосительстве). Из анаэробных микроорганизмов выделяют *C. perfringens*, в 10%-20% случаев желчно-каменной болезни – *Peptococcaceae spp.* В отдельных случаях встречается смешанная аэробная и анаэробная инфекция.

1) Бактериоскопия

Бактериоскопическое исследование нативного материала не проводится.

2) Бактериологическое исследование

По 0,1 мл каждой порции желчи засеивают на кровяной агар, 0,5 мл – на среду Эндо. Для выделения сальмонелл желчь засеивают в соотношении 1:9 в селенитовый бульон, а также инкубируют в термостате нативную желчь. Затем в течение 3 дней ежедневно производят высеивание как с селенитового

бульона, так и с нативной желчи на висмут-сульфитный агар и другие среды, предназначенные для культивирования сальмонелл.

Для выделения анаэробов желчь высевают в 1 пробирку со средой для контроля стерильности или в 2 пробирки со средой Китта-Тароцци. одну из засеянных пробирок со средой Китта – Тароцци прогревают на водяной бане для уничтожения неспорообразующих аэробных микроорганизмов. Наблюдение за посевами ведут в течение 5 дней.

На второй день учитывают результаты первичных посевов. В случае бактериального роста на кровяном агаре подсчитывают количество колоний каждого вида, пересчитывают на 1 мл исследуемого материала и после бактериоскопии окрашенных по Граму мазков проводят дальнейшую идентификацию культур и определяют чувствительность к антибиотикам согласно действующей версии EUCAST.

При подозрении на рост анаэробных культур посевы инкубируют в анаэроостате, заполненном инертным газом. В случае выделения анаэробов проводят их дальнейшее изучение.

3) Оценка результатов

Наиболее достоверным является исследование желчи, полученной во время операции. При дуоденальном зондировании возможна контаминация желчи микрофлорой ротовой полости и верхних отделов пищеварительного тракта. Так, стафилококки и стрептококки находят в дуоденальном содержимом значительно чаще, чем в желчном пузыре при оперативном вмешательстве. Поэтому следует с особой осторожностью подходить к определению этиологической роли указанных микроорганизмов при холециститах и холангитах.

Необходимо проводить количественное определение каждого вида бактерий в 1 мл желчи, т.к. по степени микробного обсеменения можно судить о локализации воспалительного процесса и более объективно оценивать его динамику при повторных исследованиях. При планируемом оперативном вмешательстве прогностически неблагоприятным считается обнаружение в желчи бактерий (энтеробактерий, псевдомонад, бактериоидов) в титре выше 10^3 КОЕ/мл. Выделение золотистого стафилококка в значительном количестве может свидетельствовать о наличии печеночного или диафрагмального абсцесса. Обнаружение в дуоденальном содержимом сапрофитных нейссерий и дрожжеподобных грибов свидетельствует о контаминации желчи микрофлорой ротовой полости.

2.11. Микробиологическое исследование грудного молока.

Взятие материала

Отбор проб грудного молока производится в поликлинике или стационаре в специально выделенном помещении. Перед сцеживанием молока женщина должна вымыть руки с мылом, тщательно обрабатывает соски и околососковую область молочных желез отдельными ватными

тампонами, смоченными 70⁰ спиртом (каждая железа обрабатывается отдельным тампоном). Молоко из правой и левой молочных желез собирается в отдельную посуду. Первые 5-10 мл сцеженного молока исследованию не подлежат. Последующие 3-5 мл сцеживаются в стерильные флаконы и доставляются в лабораторию не позднее 2-х часов в вертикальном положении.

1) Бактериоскопия

Бактериоскопическое исследование нативного материала не проводится.

2) Бактериологическое исследование

Исследуемые пробы молока в количестве 0,2 мл засевают на кровяной агар, селективные солевые среды (желточно-солевой или молочно-солевой агар) для выделения микроорганизмов рода *Staphylococcus*, на среду Эндо для выделения представителей порядка *Enterobacteriales* и неферментирующих микроорганизмов, а также хромогенные питательные среды при наличии. При подозрении на возможность обнаружения в молоке представителей других семейств микроорганизмов производится посев дополнительно на кровяной или шоколадный агар. Посевы инкубируются при температуре 37(±0,5) °С в течение 18 – 24 ч.

На следующие сутки производится подсчет колоний на чашке. Число выросших колоний умножается на 5 (при посеве 0,2 мл), т.к. массивность обсеменения выражается количеством колониеобразующих единиц (КОЕ) в 1,0 мл исследуемого молока. В случае наличия в 1,0 мл молока 250 КОЕ и более микробов обсемененность характеризуется как массивная, в случае менее 250 КОЕ - как немассивная. При неоднородном росте регистрируется каждая разновидность колоний отдельно на каждой дифференциально-диагностической среде.

3) Оценка результатов

Окончательная идентификация выделенных культур проводится на основании изучения тинкториальных, морфологических, биохимических и антигенных свойств.

Глава 3. Специфические диагностические тесты

3.1. Аэробные грамположительные кокки

Enterococcus spp. Для определения энтерококков чаще всего используют микроскопию и культуральное исследование. Для выделения энтерококков из материала, контаминированного грамотрицательными бактериями можно использовать селективные среды (желчно-эскулиновый агар с азидом натрия, селективный агар Пфайзера и др.), а для выделения

ванокомицинустойчивых штаммов энтерококков – селективные среды с ванкомицином.

Staphylococcus aureus. Для определения стафилококков чаще используют микроскопию и культуральное исследование. Для выделения стафилококков из обильно контаминированного исследуемого материала можно использовать селективные среды (солевой агар с маннитолом, агар с колистином и налидиксовой кислотой или фенилэтаноловый агар). В таблице 10 представлены дифференциальные свойства часто встречающихся стафилококков. Для выделения метициллинрезистентных стафилококков возможно использование агара с цефокситином/оксациллином или хромогенные питательные среды.

Стрептококки группы А. Эти микроорганизмы легко культивируются. Микроскопию считают полезной в диагностике кожных инфекций, но для диагностики фарингита ее не используют. Стрептококковый фарингит диагностируют прямым выявлением антигенов возбудителей (специальные тест-системы). Хотя эти тесты высоко специфичны (для *S. pyogenes*, но не для стрептококков группы А), их чувствительность не превышает 80%, поэтому отрицательный результат надо подтверждать культуральным исследованием. Серодиагностику проводят у больных нефритом или ревматизмом для подтверждения перенесенного стрептококкового фарингита или кожной инфекции. Наиболее распространены серологические тесты определения антител к О-стрептолизину и ДНКазе В, которые рекомендуются проводить одновременно; их чувствительность составляет 85%. Тест на анти-О-стрептолизина бывает отрицательным у больных нефритом после перенесенной стрептококковой пиодермии. Ложноположительные реакции на антитела к О-стрептолизину бывают у лиц с заболеваниями печени и при инфекциях, вызванных стрептококками групп С или G. Тест на анти-ДНКазу В специфичен для инфекций, вызванных стрептококками группы А, перекрестные реакции с антителами к другим стрептококкам отсутствуют. При первичной инфекции наивысшие титры антител к О-стрептолизину и ДНКазе В наблюдаются на 2-3 неделе; эти антитела можно выявить в течение 6 месяцев и более от начала заболевания. Диагностическое значение имеют титры антител, в два и более раз превышающие верхнюю границу нормы. Другие тесты (например, «Streptozyme») уступают вышеуказанным по чувствительности и воспроизводимости.

Стрептококки группы В. Эти микроорганизмы легко культивируются, но 10% штаммов не дают гемолиза и поэтому могут оставаться необнаруженными в смешанных популяциях. При невысокой концентрации стрептококков в материале можно использовать обогатительный бульон. Микроскопию не рекомендуется использовать для выявления генитального микробоносительства. С этой целью разработано множество тестов прямого обнаружения стрептококковых антигенов, но ввиду низкой чувствительности их применение на практике нельзя считать обоснованным. Разработан, по крайней мере, один амплификационный тест для быстрого выявления нуклеиновой кислоты данных стрептококков, который по чувствительности

не уступает культуральному исследованию. Популярны хромогенные питательные среды.

Streptococcus pneumoniae. Микроскопия и культуральное исследование обладают достаточной чувствительностью, но если исследование проводится с опозданием, может наблюдаться спонтанный лизис бактерий. Для обнаружения капсульного антигена пневмококков в ликворе и моче разработано множество тестов. Тесты на антиген в моче менее чувствительны, по сравнению с тестированием ликвора, но оба варианта исследования по уровню чувствительности не превосходят микроскопию препаратов, окрашенных по Граму. Определение титра типоспецифических антикапсульных антител можно проводить для оценки иммунного ответа после вакцинации, но не с диагностическими целями.

3.2. Аэробные грамположительные палочки.

Corynebacterium diphtheriae. Диагностика основана на клинических проявлениях заболевания. Микроскопическое исследование обычно не имеет диагностической ценности. Микроорганизм хорошо растет на неселективном агаре с бараньей кровью; для первичного выделения культур следует также использовать селективные среды (цистин-теллуритный кровяной агар или среду Тинсдаля). Есть прямой ПЦР-тест для обнаружения детерминант дифтерийного токсина в исследуемом материале; этот тест рекомендуется для подтверждения диагноза, но его не следует использовать отдельно от других методов исследования. Для определения уровня антител к токсину *C. diphtheriae* у лиц, иммунизированных дифтерийным анатоксином, разработаны тест-системы ИФА, но их нельзя использовать для диагностики заболевания. Защитным считают уровень антитоксина не менее 0,01 МЕ/мл. При меньших титрах антител может потребоваться введение с профилактической целью анатоксина.

Gardnerella vaginalis. Диагностическое значение имеет обнаружение в мазках из влагалища, окрашенных по Граму, тонких грамвариабельных коккобактерий. Ввиду скудного роста на питательных средах культуральным методом эти микроорганизмы могут не определяться. *Listeria spp.* Микроскопический метод недостаточно чувствителен при листериозном менингите (ввиду низкой концентрации возбудителя в ликворе) и неспецифичен в целом (листерии можно спутать с коринебактериями или стрептококками). Листерии хорошо растут на большинстве неселективных сред, но на агаре с бараньей кровью они могут не давать четкого гемолиза. Для выделения листерий из кала и пищевых продуктов разработаны специальные селективные агары. Разработаны тест-системы для обнаружения ДНК возбудителя в ликворе.

Кислотоустойчивые и относительно кислотоустойчивые грамположительные палочки Mycobacterium tuberculosis. Наиболее часто туберкулез диагностируют микроскопическим (ОКУМ) и культуральными методами. Для обнаружения микобактерий можно использовать ДНК - зонды и амплификационные молекулярные тесты.

Для обнаружения антигенов возбудителя на основе очищенных антигенов разработаны тест-системы - агглютинационная, иммуноферментная, радиоиммунная. Однако эти методы не используются широко и не могут заменить традиционные методы исследования. В дополнение к кожному тесту разработаны методы серодиагностики.

Nocardia spp. Диагностику нокардиоза осуществляют путем выявления возбудителя в клиническом материале микроскопическим и культуральным методами. Нитевидные формы нокардий плохо окрашиваются по Граму или методом ОКУМ (даже если используется слабый обесцвечивающий раствор). Несмотря на то, что эти бактерии растут на большинстве неселективных обогащенных сред, лучше всего их выделять на селективном агаре для легионелл и агаре Тейера-Мартина.

3.3. Аэробные грамотрицательные кокки.

Moraxella catarrhalis. Наиболее часто используемыми методами диагностики являются микроскопия и культуральный метод исследования. У больных с инфекциями респираторного тракта при микроскопии обычно наблюдается множество микроорганизмов, ассоциированных с клетками слизистой оболочки и полиморфноядерными лейкоцитами.

Nisseria gonorrhoeae. Главными методами диагностики гонококковой инфекции являются микроскопия и культуральное исследование. При клинически выраженной генитальной инфекции метод окраски по Граму имеет чувствительность 90-95% и специфичность 95-100% у мужчин, но у женщин чувствительность составляет лишь 50-70%, а при бессимптомной инфекции – значительно ниже. Микроорганизмы растут на шоколадном агаре, но для подавления роста сопутствующей микрофлоры чаще всего используют селективные среды. Для определения *N. gonorrhoeae* ранее использовали также методы ИФА, но этому исследованию мешают перекрестные реакции с сапрофитическими бактериями (например, другими нейссериями, моракселлами, бактероидами, пептострептококками и др.). В настоящее время культуральный и иммунологические методы, в основном, вытеснены молекулярными тестами, вначале молекулярными зондами-амплификационными методами. Амплификационные тесты имеют наивысшую чувствительность, но при исследовании необходимо соблюдать некоторые предосторожности: освобождать исследуемый материал от ингибиторов ПЦР (особенно мочу), предотвращать перекрестную контаминацию исследуемых проб.

Neisseria meningitidis. Наиболее часто используемыми методами диагностики являются микроскопия и культуральный метод исследования. Имеются тесты для определения менигококковых капсульных полисахаридных антигенов в ликворе, сыворотке крови и моче. С помощью таких тестов можно определять серогруппы А, В, С,У и W135 (антитела к менигококкам серогруппы И перекрестно реагируют с антигеном *E. coli* K1); при исследовании мочи отмечались ложноположительные результаты. Разработана ПЦР для обнаружения менигококковой ДНК в ликворе, но в

практике они пока не используются.

3.4. Аэробные грамотрицательные палочки.

Acinetobacter spp. Это грамотрицательные коккобактерии, которые иногда имеют вид грамположительных и располагаются, как правило, парами. На кровяном агаре обычно дают хороший рост. Большинство штаммов растет на агаре Макконки в аэробных, но не в анаэробных условиях (строго аэробный рост). Для идентификации *A. baumannii* рекомендовано использовать ПЦР метод с поиском видоспецифической карбапенемазы ОХА-51.

Bordetella pertussis. По сравнению с методами ПЦР, микроскопия и культуральное исследование имеют невысокую чувствительность. Возбудитель имеет вид мелких грамотрицательных коккобактерий. Лучше всего они видны при исследовании методом прямой иммунофлюоресценции. Для РИФ выпускаются моноклональные и поликлональные (для *B. pertussis* и *B. parapertussis*) конъюгаты с антителами к полисахаридам клеточной стенки, этот метод имеет низкую чувствительность (30-70%, по сравнению с культуральным исследованием) и специфичность. *B. pertussis* является прихотливым строгим аэробом, который не растет на кровяных агаровых средах или агаре Макконки (бактерии вида *B. parapertussis* растут на кровяном агаре, а часть штаммов-и на агаре Макконки). На среде Ригана-Лоу растут лучше, чем на агаре Бордэ-Жангу. Для появления роста требуется инкубирование в течение 3-4 дней, а при отрицательном результате-в течение недели и более. ПЦР является наиболее чувствительным методом обнаружения *B. pertussis*. Используют праймеры к различным генам возбудителя, включая участок промотора коклюшного токсина. Положительный результат исследования отмечают даже через 7 дней после окончания эффективного лечения. Серодиагностику проводит ИФА методом, достоверными индикаторами инфекции является накопление антител (IgG и IgA) к коклюшному токсину или филаментозному гемагглютининому возбудителя. Антитоксины специфичны для *B. pertussis*, а антитела к гемагглютининому перекрестно реагируют с *B. pertussis*, *B. parapertussis* и другими бактериями. Для диагностики коклюша у привитых серологическое исследование (выявление IgG к коклюшному токсину), является наиболее чувствительным методом, но для подтверждения диагноза необходимо также выявить сероконверсию.

Бактерии комплекса *Burkholderia cepacia*. Для выделения бактерий из контаминированных проб лучше использовать селективные среды. Наиболее чувствительной и селективной средой является селективный агар для *Burkholderia cepacia*. Методы ПЦР-анализа используются, в основном, не для обнаружения, а для идентификации этих бактерий. Серодиагностика не проводится.

Burkholderia pseudomallei. При окраске материала по Граму бактерии имеют вид мелких грамотрицательных биполярно окрашенных палочек. Клетки микроба по виду напоминают английскую булавку, что можно

использовать для предварительной идентификации. Возбудитель обнаруживают с помощью латекс-агглютинацию и ИФА – для индикации антигенов, выделяемых с мочой (ИФА является более чувствительным методом), а также РИФ и ПЦР. Чувствительность ИФА составляет 71%, но могут встречаться перекрестные реакции с *K. pneumoniae* и *E. coli*. Возбудитель растет на кровяном агаре и агаре Макконки, но лучше выделять на среде Ашдауна. Длительная инкубация (7 дней) в этом обогатительном бульоне с колистином повышает эффективность исследования. Для серодиагностики разработан некоммерческий вариант РНГА, но его недостатками являются перекрестные реакции с бактериями комплекса *Burkholderia* серасиа и выявление высоких титров антител у лиц, проживающих на эндемичных территориях. Для подтверждения диагноза недостаточно иметь результат исследования одной сыворотки, обязательно надо выявить сероконверсию.

Campylobacter spp. Бактерии представляют собой изогнутые палочки, как правило, располагающиеся попарно (в виде «крыльев чайки» или буквы S). В клиническом материале эти тонкие бактерии могут быть не видны. Большинство видов растет в микроаэрофильных условиях. Для выделения *S. jejuni* и *S. coli* из испражнений рекомендуется использовать селективные среды. На селективных средах подавляется рост *S. upsaliensis*, которые тоже часто могут быть причиной кишечных инфекций. *S. Fetus* чаще выделяют из крови. Для обнаружения в испражнениях антигенов кампилобактеров можно использовать коммерческие тест-системы, чувствительность и специфичность которых оценивается в 80-89% и 99%, соответственно. Присутствие в фекалиях ингибиторов ПЦР ограничивает ее использование. Серологические методы применяют при эпидемиологических исследованиях, но не с целью диагностики заболевания.

Carpocytophaga spp. (включая бактерии, обозначаемые ранее как DF-1 и DF-2). Имеют вид фузиформных, реже – веретенообразных, кокковидных бактерий. Их выращивают на обогащенных средах в присутствии CO₂; хороший рост отмечается через 2-4 дня после посева; они образуют адгезированные к агару колонии, которые могут быть светло-желтого цвета, с четким краем или «роящиеся». На агаре Макконки не растут, являются факультативными анаэробами.

Cardiobacterium spp. Представляют собой палочки, расположенные одиночно, попарно, короткими цепочками или в виде розеток. Являются факультативными анаэробами. Требовательны к условиям культивирования: необходимы специальные питательные среды и присутствие CO₂ в атмосфере; на агаре Макконки не растут.

Escherichia coli. Для определения энтерогеморрагических штаммов эшерихий можно использовать посев на селективные среды (например, агар Макконки с сорбитолом), а для выявления Шига-подобного токсина – ИФА. Можно использовать коммерческие тест-системы для выявления термолabileного и термостабильного токсинов энтеротоксигенных штаммов *E. coli* разработаны молекулярные тесты.

Haemophilus influenzae. Представляют собой плеоморфные палочки (кокковидные или короткие палочки); являются факультативными анаэробами; не растут на кровяном агаре или на агаре Макконки. Для диагностики генерализованной инфекции (менингита) определяют типоспецифический капсульный антиген возбудителя, но чувствительность этого метода не выше, чем у микроскопии препаратов, окрашенных по Граму. Серологические исследования проводятся для выявления иммунного ответа после вакцинации.

Pasteurella spp. Представляют собой кокки или коккобактерии, расположенные одиночно, парами или короткими цепочками; являются факультативными анаэробами; для их выращивания не требуется добавление в питательную среду гемина или атмосфера, обогащенная CO₂, но некоторые штаммы имеют потребность в V-факторе. Большинство выделяемых видов не растут на агаре Макконки.

Pseudomonas aeruginosa. Возбудитель легко культивируется на разнообразных питательных средах. Для прямого обнаружения этих микроорганизмов в материале из респираторного тракта, в частности, от больных муковисцидозом, разработаны амплификационные тесты – ПЦР. Разработан также метод (метод FISH), который, по сравнению с культуральным методом, занимает значительно меньше времени, но в то время имеет меньшую чувствительность. Серодиагностика не проводится.

Salmonella enterica серовара *Typhi*. Для эффективного выделения возбудителя из фекалий необходимо использовать селективные среды. Для серодиагностики заболевания используют реакцию Видаля – определение титров агглютининов к O- и H-антигенам *Salmonella enterica* серовара *Typhi*, но этому тесту недостает чувствительности и специфичности. Тесты с другими антигенами (например, антигеном Vi) применяют с эпидемиологическими целями.

Сальмонеллы других сероваров. Для эффективного выделения сальмонелл из фекалий необходимо использовать селективные среды.

Shigella spp. Для эффективного выделения шигелл из фекалий необходимо использовать селективные среды. Серологические методы разработаны для эпидемиологических целей и не используются для диагностики заболевания.

Stenotrophomonas spp. Чувствительными методами исследования являются микроскопия и культуральный метод. Разработанные методы ПЦР для обнаружения возбудителя не используют.

Yersinia enterocolitica. При диагностике диарейного заболевания для выделения *Y. enterocolitica* нет необходимости проводить обогащение материала (например, помещать его в фосфатно-солевой раствор при 40 С на срок до 21 дня), но это оправдано при исследовании материала от больных терминальным илеитом или постинфекционным артритом. Из селективных сред предпочтение отдают селективному агару для иерсинии, который лучше инкубировать не при 350 С, а при 25-300 С. Используется агар Макконки (иерсинии формируют на нем лактозоотрицательные колонии).

Разработаны методы ПЦР-анализа на плазмидные и хромосомные детерминанты вирулентности, но они широко не используются. Антитела к возбудителям серогрупп O:3, O:9, O5,276 и O:8 можно определять в агглютинационных тестах. Диагностически значимым считают выявление антител в титре 1:40 и выше или четырехкратное нарастание титра антител. Наблюдаются перекрестные реакции с бруцеллами. Эти тесты проводят в специальных лабораториях, коммерческие реактивы для них отсутствуют.

3.5. Анаэробные бактерии

Actinomyces spp. В аэробных условиях бактерии могут расти медленно, а некоторые штаммы трудно выделить в чистой культуре. Существенную помощь в диагностике актиномикоза оказывает микроскопическое исследование друз (макроколоний актиномицет), присутствующих в клиническом материале.

Микроорганизмы группы *Bacteroides fragilis*. В клиническом материале бактерии имеют вид плеоморфных палочек. Они быстро растут на многих средах для анаэробов, но при посевах контаминированного материала рекомендуется использовать селективные среды (например, агар с лизированной кровью, канамицином и ванкомицином или желчноэскулиновый агар для бактроидов).

Clostridium difficile. Микроскопическое исследование фекалии практически не имеет диагностического значения. Чувствительным методом обнаружения возбудителя является посев на селективные питательные среды (например, на желточно-фруктозный агар с циклосерином и цефокситином), но при этом трудно отличить заболевание от бессимптомной колонизации. Основным методом диагностики является определение антигенов возбудителя – его цитотоксина или энтеротоксинов. Для обнаружения этих антигенов (или одного из них) разработан ряд иммунологических тестов. Их чувствительность и специфичность варьируют, но лучше из тестов обычно имеют высокие уровни этих показателей (не менее 90%). Для определения *C. difficile* в материале и дифференциации токсигенных и нетоксигенных штаммов используют ПЦР, но этот тест используется нечасто. *Clostridium perfringens*. Микроскопическое исследование позволяет выявить характерную морфологию возбудителя (крупные короткие толстые прямоугольные клетки; споры обычно не видны). Хорошо растут двойную зону гемолиза. Иммунологические тесты для определения токсинов не разработаны, а ПЦР анализ проводится.

Fusobacterium spp. Некоторые виды (например, *F. nucleatum*) имеют характерную морфологию: тонкие палочки с заостренными концами (фузиформные). Для выращивания фузобактерий может потребоваться до 5 дней и более.

Mobiluncus spp. Обычные посевы материала из влагалища ввиду низкой информативности исследования, как правило, не проводят. Диагностическое значение имеет обнаружение искривленных палочек при микроскопии мазков из влагалища.

Peptostreptococcus spp. Для выделения более прихотливых может

потребуется увеличение сроков инкубирования. То же относится к новым видам анаэробных кокков, ранее относимых к данному роду.

Таблица 10. Дифференциальные свойства часто встречающихся стафилококков

Виды стафилококков	Плазмокоагулаза	Хлопьеобразующий фактор	Термостабильная ДНКаза	Щелочная фосфатаза	PYR-тест	Орнитин-декарбоксилаза	Уреаза	Бета- галактозидаза	Тест Фогеса-Проскауэра	Тест с новобиоцином	Тест с полимиксином В
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	-	-	V	-	+	S	R
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	+	-	V	+	-	+	S	R
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+	S	S
<i>S. hyicus</i>	V	-	+	+	-	-	V	-	-	S	R
<i>S. intermedius</i>	+	V	+	+	+	-	+	+	-	S	S
<i>S. lugdunensis</i>	-	(+)	-	-	+	+	V	-	+	S	V
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	S	R
<i>S. schleiferi</i>	-	+	+	+	-	-	-	(+)	+	S	R

Глава 4. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам

Основной целью оценки (определения) чувствительности микроорганизмов к антимикробным агентам (препаратам) является прогнозирование их эффективности при лечении инфекций у конкретных пациентов. Определение чувствительности также проводят при наблюдении за распространением резистентности среди микроорганизмов и в процессе изучения новых препаратов.

В настоящее время теоретически наиболее обоснованным представляется комплекс подходов к оценке чувствительности и интерпретации результатов, предлагаемый Европейским комитетом по определению чувствительности к антимикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST). Наряду с наиболее корректным термином «антимикробный агент (препарат)» EUCAST допускает использование традиционного термина «антибиотик». К антибиотикам EUCAST относит вещества природного, полусинтетического или синтетического происхождения (последние в строгом смысле относятся к химиотерапевтическим агентам), проявляющие избирательную активность в отношении бактерий, и потенциально применимые для лечения инфекционных болезней. Антисептики, дезинфектанты и консерванты к антибиотикам не относятся. Широко используемый в русскоязычной литературе термин «антибиотикочувствительность» следует

рассматривать как аналог термина «antimicrobial susceptibility» (антимикробная чувствительность), используемого в документах EUCAST.

Референтный метод последовательных микроразведений в повседневной практике микробиологических лабораторий применяется редко вследствие значительной трудоемкости. Однако именно относительно этого метода «калибруются» как наиболее распространенный в рутинной практике диско-диффузионный метод, так и различные коммерческие методы. Результаты оценки антибиотикочувствительности бактерий, полученные с помощью референтного метода, используют для обоснования микробиологических и клинических критериев чувствительности.

Идеология EUCAST основана на признании факта существования различий между микробиологической и клинической чувствительностью/устойчивостью микроорганизмов. С микробиологической точки зрения в пределах популяций отдельных видов бактерий EUCAST предлагает выделять следующие типы:

- «Дикий» тип (wild type - WT), к которому относятся микроорганизмы, лишенные мутационных или других приобретенных механизмов устойчивости к конкретному антибактериальному препарату. Инфекции, вызываемые микроорганизмами, относящимися к «дикому» типу, могут, как поддаваться терапии этим препаратом, так и не отвечать на нее.

- «Недикий» тип (non-wild type - NWT), к которому относятся микроорганизмы, обладающие мутационными или другими приобретенными механизмами устойчивости к конкретному антибактериальному препарату. Инфекции, вызываемые микроорганизмами, относящимися к «недикому» типу, могут, как поддаваться терапии этим препаратом, так и не отвечать на нее.

В качестве критерия для отнесения микроорганизма к одному из приведенных типов используют значения МПК антибактериальных препаратов, получившие названия «эпидемиологические точки отсечения» (epidemiological cut-off values, ECOFF). Значения точек отсечения для конкретных комбинаций микроорганизм-антибиотик определяют статистическими методами на основании анализа характера распределения МПК антибиотика в отношении репрезентативной выборки изолятов соответствующего микроорганизма [2]. Значения точек отсечения являются постоянными видовыми признаками микроорганизмов и не зависят от изменяющихся обстоятельств. Гистограммы и таблицы распределения МПК основных антибиотиков в отношении значительной части возбудителей инфекционных заболеваний человека доступны на веб-сайте EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, <http://mic.eucast.org/>). На веб-сайте EUCAST также доступны гистограммы и таблицы распределения диаметров зон подавления роста, полученных с использованием диско-диффузионного метода EUCAST.

Для определения клинической чувствительности/устойчивости EUCAST предлагает следующие категории:

- Микроорганизм оценивается как чувствительный к

антибактериальному препарату, если уровень активности последнего позволяет предположить высокую вероятность эффективности терапии.

- Микроорганизм оценивается как умеренно-резистентный, если уровень активности антибактериального препарата связан с неопределенным результатом лечения. Предполагается, что положительный результат может быть получен при локализации очага инфекции в тех органах и тканях, в которых возможно формирование высоких концентраций препарата, или при применении последнего в высоких дозах.

- Микроорганизм оценивается как резистентный (устойчивый) к антибактериальному препарату, если уровень активности последнего позволяет предположить высокий риск неэффективности терапии.

В качестве критериев для отнесения микроорганизма к одной из приведенных категорий используют пограничные значения МПК, а также пограничные значения диаметров зон подавления роста. Критерии клинической чувствительности/устойчивости (пограничные значения МПК

антибактериальных препаратов) могут изменяться в зависимости от появления новых данных о фармакокинетике и фармакодинамике антимикробных препаратов и рекомендаций по режиму их применения.

Для обоснования клинических критериев чувствительности/устойчивости EUCAST использует фармакокинетические/фармакодинамические закономерности зависимости между величиной МПК антибактериального препарата в отношении микроба-возбудителя, фармакокинетическими характеристиками препарата и эффективностью лечения. Данные, обосновывающие выбор клинических пограничных концентраций, для части антибиотиков приведены на веб-сайте EUCAST в разделе «Documents» - «Rationale Documents»

Заключение

Методические рекомендации «Унифицированные микробиологические исследования в клинической микробиологии» разработаны в целях стандартизации микробиологических исследований, особенного внимания требует стандартизация методов определения чувствительности к антимикробным препаратам. Предложенные методические рекомендации охватывают все этапы микробиологического исследования, начиная с выбора типа исследования и вида биоматериала, заканчивая интерпретацией результатов исследования. Представлены основные тесты идентификации этиологически значимых групп микроорганизмов, основные вопросы, связанные с преаналитическим, аналитическими этапами работы врача-клинического микробиолога. Рассмотрены вопросы, касающиеся правильного забора и выбора клинического материала для микробиологического исследования, определения используемых методических подходов в микробиологическом исследовании (выбор метода диагностики). Рассмотрены методы определения чувствительности к антибиотикам с интерпретацией результатов. Методическое пособие ориентировано на студентов медицинских ВУЗов, изучающих клиническую микробиологию, преподавателей, практических врачей-микробиологов.

Список литературы

1. Клинические рекомендации. Бактериологический анализ мочи. Козлов Р.С. и др. Федерация лабораторной медицины. Москва, 2014.
2. Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний: Методические указания. - Москва.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2014 - . 39 с.
3. Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии: Методические рекомендации. - Москва.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. - 2017. - 64 с.
4. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 18 мая 2021 г. N 464н "Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований" (с изменениями и дополнениями) с изменениями и дополнениями от:23 ноября 2021 г
5. Приказ Министерства здравоохранения Республики Казахстан № 1104 от 08.12.2022 Об утверждении дорожной карты «О мерах по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам в Республике Казахстан на 2023-2027 годы»
6. Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 11 декабря 2020 года № ҚР ДСМ-257/2020. Зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 14 декабря 2020 года № 21768 « Об утверждении Стандарта организации проведения лабораторной диагностики».
7. Practical guidance for clinical microbiology, «A Comprehensive Update on the Problem of Blood Culture Contamination and a Discussion of Methods for Addressing the Problem», Gary V. Doern, a Karen C. et al. October 2019.
8. Blood Cultures IV , COORDINATING EDITOR: Ellen Jo Baron Stanford University Medical Center, Stanford, CA 94305
9. Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам. (EUCAST). Таблицы пограничных значений для интерпретации значений МПК и диаметров зон подавления роста. Версия 13.0, 2023. <http://www.eucast.org>
10. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии 1. Бактериологические методы 2. Диагностика, лаборатория — методики. Всемирная организация здравоохранения, 1994
11. Национальный стандарт Р Ф Лаборатории Медицинские Требования к взятию, транспортированию, получению и обработке биологического материала ГОСТ Р 59787—2021/ISO/TS 20658:2017 на основе (ISO/TS 20658:2017, Medical laboratories —Requirements for collection, transport, receipt, and handling of samples, IDT)
12. Методы исследования в микробиологии : учеб.-метод. пособие / Ж. Г. Шабан и др. – Минск : БГМУ, 2010. – 124 с
13. Методические рекомендации «Диагностика и антимикробная терапия инфекций, вызванных полирезистентными микроорганизмами»

- Утверждены 11.10.2019 г Российской некоммерческая общественная организация «Ассоциация анестезиологов реаниматологов», Межрегиональная общественная организация «Альянс клинических химиотерапевтов и микробиологов», Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), общественная организация «Российский Сепсис Форум»
14. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории: Методические указания. — Москва.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. — 126 с.
 15. Практические рекомендации. Преаналитический этап микробиологических исследований. Москва – 2017. Алиева Е.В., Кафтырева Л.А.
 16. Материалы семинара ВОЗ в г Алматы Владимир В. Кантарелли, PHD Консультант ЕРБ ВОЗ
 17. Michael L. Wilson, Loretta Gaido, Laboratory Diagnosis of Urinary Tract Infections in Adult Patients // Clinical Infectious Diseases, Volume 38, Issue 8, 15 April 2004. – P. 1150–1158.
 18. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM)^a, Ellen Jo Baron, J. Michael Miller, Melvin P. Weinstein et al. //Clinical Infectious Diseases. – Vol. 57. – P. e22–e121

Правила сбора и транспортировки биоматериала для бактериологического исследования

Вид материала	Правила взятия	Транспортное устройство; минимальное количество материала	Срок и температурные условия транспортировки	Комментарии
Абсцесс: любой	Удалить наружный экссудат протиранием салфеткой или тампоном со стерильным ИХН или 70% этанолом			Ткани или биологические жидкости для исследования предпочтительнее, чем материал на тампоне. При необходимости использовать тампоны одним из них берут материал для посева, а другим- для окрашивания по Граму. Материал для посева консервируют погружением тампона в среду Стюарта или Амиеса
вскрытый	По возможности аспирировать содержимое или взять материал тампоном из глубины очага поражения, на границе со здоровыми тканями	Транспортное устройство с тампоном	Не более 2 ч при КТ	Лучше всего брать материал из глубины или со стенок абсцесса
закрытый	Аспирировать содержимое через иглу шприца и асептически перенести весь материал в анаэробное транспортное устройство	Анаэробное транспортное устройство; не менее 1 мл	Не более 2 ч при КТ	Следует избегать контаминации материала поверхностной микрофлорой (ее присутствие приводит к ошибочным результатам исследования)
Рана от укуса	См. абсцесс			В течение первых 12 ч после укуса животных при отсутствии признаков инфекции не следует делать посевы материала из раны (обычно возбудители не

				обнаруживаются)
Кровь	<p>Продезинфицировать флакон для культивирования, обработать резиновые пробки 70% пропанолом или раствором фенола и выдержать в течение 1 мин</p> <p>Пальпировать вену следует перед дезинфекцией места венепункции</p> <p>Обработка места венепункции:</p> <ul style="list-style-type: none"> -очистить кожу 70% этанолом. -протереть кожу тампоном, смоченным в йодном растворе, круговыми движениями в направлении от центра к периферии. -дать коже высохнуть. -не пальпировать вену на данном участке без стерильных перчаток. -произвести взятие крови. -после венепункции удалить с кожи остатки йода спиртом -пункцию проводят в таких же условиях, как при хирургическом разрезе 	<p>Флаконы для выделения гемокультур бактерий; у взрослых в 1 флакон берут не менее 20 мл крови (при большом объеме результативность посева возрастает); у детей в 1 флакон берут 1-20 мл крови, в зависимости от веса пациента</p>	<p>Не более 2 ч при КТ</p>	<p>Если кровь берут на высоте лихорадки, когда необходимо срочно начать прием или сменить антибиотик: в течение 10 минут отбирают 2 пробы из разных мест (до приема АБ). При неостром заболевании, когда не требуется срочно начинать прием или сменять АС: в течение 24 ч отбирают 2 или 3 пробы из разных мест с интервалами не менее 3 ч (до приема АС). При остром эндокардите: в течение 1-2 ч отбирают 3 пробы из разных мест (по возможности до приема АС). При подостром эндокардите: в течение 24 ч отбирают 3 пробы из разных мест с интервалами не менее 1 ч. Если гемокультура не выделена, берут еще 2-3 пробы.</p> <p>При лихорадке неизвестного происхождения: в течение 24-48 ч из разных мест отбирают 2-3 пробы подряд с интервалами не менее 1 ч. Если гемокультура не выделена, берут еще 2-3 пробы.</p> <p>При некоторых показаниях посев во флаконы для аэробов или грибов более результативен, чем посев во флаконы для анаэробов. Материал от детей берут немедленно; у них редко бывает длительная бактериемия,</p>

				<p>поэтому нет необходимости выдерживать длительные интервалы между отборами проб</p> <p>Микробактерии: рекомендуется использовать специальные устройства для культивирования (например, Isolator, Bactec 13 A, Bactec Myco/F lytic)</p>
Аспират костного мозга		<p>Флаконы для выделения гемокультур бактерий; материал засевают во флаконы или пробирки для лизиса центрифугирования; на чашки материал высевают сразу после его поступления в лабораторию</p>	<p>Не более 2 ч при КТ, если материал внесен во флакон или пробирку для культивирования</p>	<p>Небольшое количество нативного материала можно сразу посеять на питательные среды. Рутинные бактериологические посеvy редко бывают результативными</p>
Ожог	<p>Очистить и санировать ожоговую рану</p>	<p>Ткань помещают в стерильный контейнер с завинчивающейся крышкой; аспират или экссудат на тампоне транспортируют в стерильном контейнере или специальном транспортном устройстве</p>	<p>Не более 2 ч при КТ</p>	<p>Для количественного посева оптимальны биоптаты размером 3-4 мм. Материал готовят только для аэробного культивирования. Результат количественного исследования не всегда имеет диагностическую ценность</p> <p>Выделение культур с поверхности ожоговых ран может вести к неправильной трактовке результата</p>

Внутривенный катетер	<p>-очистить кожу вокруг катетера этанолом.</p> <p>-асептически извлечь катетер и отрезать 5 см с его дистального конца непосредственно в стерильную пробирку.</p> <p>-для предупреждения высыхания немедленно доставить материал в микробиологическую лабораторию</p>	Стерильная пробирка с завинчивающейся крышкой или контейнер	Не более 15 мин при КТ	Для полуколичественного посева (метод Макі) можно брать следующие внутривенные катетеры: центральный, СVP, Nickman, Broviac, периферический, артериальный, пупочный, питающий, Swan-Ganz
Уретральный катетер Фоли	Не подлежит культуральному исследованию, так как вырастают представители нормальной микрофлоры дистального отдела уретры			Не пригоден для культурального исследования
Флегмона (аспират из очага поражения)	<p>-для удаления поверхностной микрофлоры протереть место взятия материала тампоном или салфеткой со стерильным ИХН или 70% этанолом</p> <p>-аспирировать материал иглой шприца из зоны максимального воспаления (лучше из центра, а не у края очага); может потребоваться орошение ткани небольшим количеством стерильного ИХН.</p>	Стерильная пробирка (использовать для транспортировки шприц не рекомендуется)	Не более 15 мин при КТ	Из большинства проб возбудитель выделить не удастся

	-аспирировать ИХН в шприц и вылить из него материал непосредственно в пробирку с завинчивающейся крышкой			
Спинальная жидкость	-обработать место предполагаемой пункции йодосодержащим препаратом. -ввести иглу с мандреном в область L-3-L4, L4-L5 или L5-S1 -по достижении субарахноидального пространства извлечь мандрен и набрать по 1-2 мл жидкости в каждую из трех хорошо закупориваемых пробирок	Стерильная пробирка с завинчивающейся крышкой; для обнаружения обычных бактерий берут не менее 1 мл, кислотоустойчивых - не менее 5 мл	При исследовании на бактерии никогда не замораживать! Не более 15 мин при КТ	Этим пациентам показано также исследование крови на гемокультуру. Полученный ликвор немедленно доставляют в микробиологическую лабораторию. Для обнаружения анаэробных бактерий или паразитов возможно, потребуется направить на исследование аспират из абсцесса мозга или биопсийный материал
Изъязвленная язва	Материал, взятый тампоном, не пригоден для исследования. -очистить место взятия материала тампоном или салфеткой со стерильным ИХН. -при невозможности получения биоптата аспирировать материал из основания язвы	Стерильная пробирка с завинчивающейся крышкой (для выявления аэробов) или анаэробное транспортное устройство (для исследования тканей на присутствие анаэробов)	Не более 2 ч при КТ	Взятый тампоном материал диагностической ценности не представляет. Для исследования пригоден биопсийный материал или аспират, полученный с помощью иглы

Культуральное исследование материала от стоматологических больных:	-осторожно очистить край десны и близлежащего зуба от слюны, разрушенных тканей и бляшек. -используя периодонтальный крючок, осторожно взять материал из зоны	Анаэробное транспортное устройство	Не более 2 при КТ	Материал из периодонтальных очагов поражения исследуют только в специализированных лабораториях, где можно распознать и подсчитать количество возбудителей в материале
Гингивальный, периодонтальный, периапикальный материал, при остром некротическом язвенном гингивите (гингивите Венсана)	субгингивально поврежден и внести его в анаэробное транспортное устройство. -используя ту же технологию, приготовить из материала мазок на предметном стекле для получения окрашенного препарата			
Ухо: внутреннее	Тимпаноцентез проводят при осложненном, рецидивирующем или хроническом среднем отите -если барабанная перепонка не повреждена, очистить ушной канал мыльным раствором и после тимпаноцентеза аспирировать жидкость в шприц. -при нарушении целостности барабанной перепонки взять жидкость через ушное зеркало тампоном на	Стерильная пробирка, транспортная среда с тампоном или анаэробное транспортное устройство	Не более 2ч при КТ	Культивирование материала, полученного тампонами из зева или носоглотки, для диагностики не используется, так как не позволяет выявить возбудителей среднего отита

	гибком стержне			
наружное	-обычным увлажненным тампоном извлечь корки или детрит из наружного слухового прохода. -взять материал со стенок наружного слухового прохода, протерев их вращающимся транспортным тампоном	Транспортный тампон	Не более 2ч при КТ	Отбирая материал при наружном отите, необходимо энергично протирать ткани тампоном, иначе может остаться не выявленным возбудитель стрептококковой флегмоны
Конъюнктивы глаз	Взять материал с конъюнктивы каждого глаза отдельными тампонами при их вращении (тампоны предварительно увлажнить стерильными ИХН). -посев на среду можно сделать сразу после взятия материала. -сразу после взятия материала можно приготовить мазки на стеклах,	Для прямого посева используют кровяной или шоколадный агар 4 для посева в лаборатории материал пересылают на транспортном тампоне	Чашки: не более 15 мин при КТ Тампоны: не более 2 ч при КТ	При возможности получают пробы с конъюнктивы обоих глаз, даже если инфицирован только один (это позволяет судить о составе индигенной микрофлоры и сравнивать ее с микроорганизмами инфицированного глаза). Для уменьшения стоимости такого исследования можно ограничиться приготовлением мазка по Граму, который поможет интерпретировать результаты посева

КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ

для соответствия международным стандартам
в промышленности и медицине

Партнеры

CEM

ALLIANCE
BIO EXPERTISE

KFBIO

Luminex

MöllerMedical

KUGEL
medical

PentaBase

euromex

astec

NGeneBio

orto
alresa
About centrifugation

BRUKER

MEDITE
Cancer Diagnostics

IOAIR

CYTO TEST

SDPTOP

IANLONG

JEIO TECH

kogenebiotech

BERTHOLD

ASI
APPLIED SPECTRAL
IMAGING

cence

MIRA LAB
Micro equipment



mcrs.kz



micro solutions

новые горизонты исследований

+7 705 205 00 16 email:info@mcrs.kz

MALDI-TOF масс-спектрометрия для идентификации микроорганизмов
Микроскопические исследования в бактериологии и паразитологии
Гемокультуривирование и экспресс-диагностика
Пробоподготовка любого этапа, включая культивирование питательных сред
Antibiotic susceptibility testing (AST)
Автоматизация лабораторных процессов



#EUCAST #ISO 15189 #CLSI M100 #ISO 20776-1 #ASTM E2362
#ISO 17025 #JIS Z 2801 #ISO 11290-1 #CA-SFM #ISO 11731
#ГОСТ 31813-2012 #ГОСТ 10444.15-94 #ГОСТ 31947-2012



Распечатано в количестве 100 экземпляров
при поддержке TOO Micro Solutions - профессионального
интегратора лабораторных решений в 8 странах
Центральной Азии