

---

# Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии

---

J. Vandepitte  
*Отделение микробиологии  
Академическая больница Св.Рафаэля  
Левен, Бельгия*

K. Engbaek  
*Отделение клинической микробиологии  
Университет Копенгагена  
Больница Херлева  
Херлев, Дания*

P. Piot  
*Отделение микробиологии  
Институт тропической медицины принца Леопольда  
Антверпен, Бельгия*

C.C. Heuck  
*Всемирная организация здравоохранения  
Женева, Швейцария*

Выпущено издательством "Медицина" по поручению  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
которому ВОЗ вверила выпуск данного издания на русском языке



Всемирная организация здравоохранения  
Женева  
1994

---

# Basic laboratory procedures in clinical bacteriology

---

J. Vandepitte  
*Department of Microbiology  
St Rafael Academic Hospital  
Leuven, Belgium*

K. Engbaek  
*Department of Clinical Microbiology  
University of Copenhagen  
Herlev Hospital  
Herlev, Denmark*

P. Piot  
*Department of Microbiology  
Prince Leopold Institute of Tropical Medicine  
Antwerp, Belgium*

&  
C.C. Heuck  
*World Health Organization  
Geneva, Switzerland*



World Health Organization  
Geneva  
1991

Библиотечный каталог публикаций ВОЗ

Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии / J. Vandepitte и соавт.

1. Бактериологические методы 2. Диагностика, лаборатория — методики I. Vandepitte, J.

ISBN 92 4 154425 2

(NLM Классификация: QY 100)

ISBN 5-225-03252-4

ISBN 92 4 154425 2

© World Health Organization 1991

© Всемирная организация здравоохранения, 1994

На публикации Всемирной организации здравоохранения распространяются положения протокола № 2 Всемирной конвенции об охране авторских прав. Заявления о разрешении на перепечатку или перевод публикаций ВОЗ частично или *in toto* следует направлять в отдел публикаций Всемирной организации здравоохранения, Женева, Швейцария. Всемирная организация здравоохранения охотно удовлетворяет такие просьбы.

Обозначения, используемые в настоящем издании, и приводимые в нем материалы ни в коем случае не выражают мнения Секретариата Всемирной организации здравоохранения о юридическом статусе какой-либо страны, территории, города или района, их правительствах или их государственных границах.

Упоминание некоторых компаний или продукции отдельных изготовителей не означает, что Всемирная организация здравоохранения отдает им предпочтение по сравнению с другими, не упомянутыми в тексте, или рекомендует их к использованию. Как правило, патентованные наименования выделяются начальными прописными буквами.

4107020000-90  
O ————— Без объявл.  
039(01)-94

## Содержание

Предисловие	ix
Введение	1
Обеспечение качества работы при микробиологических исследованиях	2
Введение	2
Определения	2
Внутренний контроль качества	7
Внешняя оценка качества	17
<hr/>	
<b>ЧАСТЬ I. Бактериологические исследования</b>	<b>21</b>
<hr/>	
<b>Кровь</b>	<b>23</b>
Введение	23
Причины бактериемии	23
Взятие проб крови	23
Среда для культивирования крови	25
Методика культивирования крови	25
<b>Спинномозговая жидкость</b>	<b>28</b>
Введение	28
Взятие и транспортировка проб	28
Макроскопическое исследование	29
Микроскопическое исследование	29
Предварительная идентификация	32
Определение чувствительности к антибиотикам	33
<b>Моча</b>	<b>34</b>
Введение	34
Взятие материала для исследования	34
Культивирование и интерпретация результатов	36
Оценка результатов количественного определения микроорганизмов в моче	39
Идентификация	40
Определение чувствительности к антибиотикам	40
<b>Кал</b>	<b>41</b>
Введение	41
Взятие проб кала	41
Взятие материала с помощью ректальных тампонов	41
Исследование проб кала	41
Приготовление фекальной суспензии	42
Посев на плотные питательные среды	42
<b>Инфекции нижних дыхательных путей</b>	<b>43</b>
Введение	43
Наиболее распространенные инфекции	43
Взятие проб мокроты	45

**ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
В КЛИНИЧЕСКОЙ БАКТЕРИОЛОГИИ**

Методика исследования мокроты в лаборатории (для выявления инфекций нетуберкулезной этиологии)	45
Культивирование микобактерий туберкулеза	49
Общие замечания относительно мер безопасности	51
<b>Инфекции верхних дыхательных путей</b>	<b>52</b>
Введение	52
Нормальная микрофлора глотки	52
Этиологические агенты фарингитов	53
Взятие материала и его доставка	54
Прямое микроскопическое исследование	55
Культивирование и идентификация	55
Определение чувствительности к антибиотикам	57
<b>Заболевания, передаваемые половым путем</b>	<b>58</b>
Введение	58
Уретриты у мужчин	59
Материал для исследования, полученный из половых путей женщин	62
Материал из генитальных язв	65
<b>Гнойные экссудаты, раны и абсцессы</b>	<b>69</b>
Введение	69
Наиболее распространенные клинические состояния и наиболее часто встречающиеся этиологические агенты	69
Взятие и транспортировка материала	72
Макроскопическое исследование	74
Микроскопическое исследование	75
Культивирование	76
Идентификация	77
Определение чувствительности к антибиотикам	81
<b>Анаэробная бактериология</b>	<b>82</b>
Введение	82
Описание микроорганизмов по их отношению к кислороду	82
Бактериология	83
<b>Определение чувствительности к антимикробным средствам</b>	<b>88</b>
Введение	88
Основные принципы определения антимикробной чувствительности	88
Клиническое определение терминов "устойчивость", "чувствительность": система трех категорий	90
Показания к рутинному проведению теста на определение чувствительности	91
Выбор препаратов для рутинного исследования чувствительности в клинической лаборатории	93
Усовершенствованный метод Керби—Бауэра	95
Методика прямого и непрямого определения чувствительности	104
Технические факторы, оказывающие влияние на размер зоны задержки роста при использовании дискодиффузионного метода	104
Контроль качества	106

---

<b>ЧАСТЬ II. Основные питательные среды и реагенты для выделения и идентификации этиологических агентов заболеваний</b>	<b>109</b>
<b>Введение</b>	<b>111</b>
Установление приоритетов для патогенов, питательных сред и диагностических реагентов	112
Кровь	113
Спинальная жидкость	114
Моча	115
Кал	116
Нижние дыхательные пути	117
Верхние дыхательные пути	118
Исследование материала, полученного из мочеполовых путей, с целью обнаружения возбудителей, передаваемых половым путем	119
Гной и экссудаты	120
Перечень рекомендуемых питательных сред и диагностических реагентов для лабораторий среднего звена	120
<b>Рекомендуемая литература</b>	<b>124</b>
<b>Предметный указатель</b>	<b>125</b>

---

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Инфекционные болезни часто являются причиной смерти населения в развивающихся странах, поэтому их диагностика и лечение представляют собой серьезную проблему здравоохранения в этих странах. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) на протяжении многих лет активно содействует усовершенствованию и внедрению стандартизированной техники лабораторных исследований инфекционных заболеваний. Первая попытка стандартизации наиболее чувствительных лабораторных тестов была предпринята в 1960 г.<sup>1</sup> Впоследствии с 1976 г. Совет экспертов ВОЗ по биологической стандартизации разработал требования для определения чувствительности к антибиотикам с помощью дисков<sup>2</sup>.

Одновременно предпринимались усилия для внедрения в практику лабораторной работы методов контроля качества. В 1984 г. ВОЗ ввела "Международную схему оценки качества микробиологических исследований", в соответствии с требованиями которой в настоящее время работают 112 лабораторий в различных странах мира. Эти лаборатории играют ведущую роль во внедрении национальной схемы оценки качества работы на всех уровнях общественного здравоохранения.

В настоящей публикации объединены и модифицированы с учетом современных знаний различные рекомендации, разработанные ВОЗ в ходе многолетней работы по отбору образцов для исследований, идентификации микроорганизмов и определению их чувствительности к антибиотикам. Включенная в настоящую публикацию информация призвана привести к гармонизации микробиологических исследований, повышению чувствительности используемых тестов, а также улучшению качества работы как центральных лабораторий, так и лабораторий среднего звена. В центре внимания данной публикации общие методики исследований, а не конкретные методы микроскопии и окрашивания препаратов, которые нашли детальное отражение в другой публикации ВОЗ<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> *The public health aspects of antibiotics in feedstuffs. Report on a Working Group, Bremen, 1-3 October 1973.* Неопубликованный документ Европейского регионального бюро ВОЗ, EURO 3604(2).

<sup>2</sup> WHO Technical Report Series, No. 610, 1977 (*Twenty-eighth report of the WHO Expert Committee on Biological Standardization*), Annex 5.

<sup>3</sup> *Manual of basic techniques for a health laboratory.* Geneva, World Health Organization, 1980.

## Введение

По оценкам Восьмой Общей Программы ВОЗ, инфекционные болезни продолжают оставаться серьезной проблемой здравоохранения, борьба с ними в развивающихся странах поглощает большую часть бюджета, выделенного на здравоохранение. Острые диарейные заболевания являются причиной более чем 30 % смертных случаев среди детей до 5 лет жизни, как минимум 4 млн человек ежегодно умирают от этих заболеваний. Острые респираторные инфекции (первичная пневмония) являются другой очень важной причиной смерти, ежегодно от них в мире погибает 2,2 млн человек. Анализ этиологических факторов легочных заболеваний свидетельствует о том, что в развивающихся странах бактериальные агенты, такие как *Haemophilus influenzae* и *Streptococcus pneumoniae*, являются более частыми патологическими агентами по сравнению с вирусами при пневмониях у детей. Появившиеся не так давно  $\beta$ -лактомазопродуцирующие *H. influenzae* и *S. pneumoniae*, характеризующиеся высокой устойчивостью к пенициллину, циркулируют в разных частях света, и в связи с этим важность эпидемиологического надзора за ними постоянно возрастает.

В настоящее время повсеместно наблюдается рост числа заболеваний, передающихся половым путем. Опасность эпидемического или даже пандемического распространения этих заболеваний, вызываемых вирусными или бактериальными агентами, может быть обусловлена как неадекватным эпидемиологическим надзором, так и дефицитом адекватных мер профилактики. Для профилактики основных бактериальных инфекций и контроля за ними необходимо совершенствование инструментов эпидемиологического надзора и мониторинга, а также упрощение и повышение надежности диагностических процедур.

Принимая во внимание сложившуюся ситуацию, лабораторная служба здравоохранения должна базироваться на сети лабораторий, выполняющих микробиологические исследования для центров здравоохранения, клиницистов и эпидемиологов. Сложность диагностических исследований будет возрастать от периферических лабораторий к лабораториям среднего звена, а наиболее сложные исследования будут выполнять центральные лаборатории. Только этот путь даст возможность достаточно быстро объединить всю необходимую информацию для совершенствования эпидемиологического надзора и позволит на ранней стадии выявить эпидемии или вспышки необычных инфекционных заболеваний, а также разработать адекватные и эффективные специфические меры воздействия.

---

# Обеспечение качества работы при микробиологических исследованиях

## Введение

Программы обеспечения качества работы являются эффективным способом поддержания на должном уровне стандартов лабораторной диагностики во всем мире и усовершенствования этих стандартов по мере необходимости. Качество лабораторного теста в целом рассматривается как синоним достоверности (аккуратности) и возможности его воспроизведения (методика воспроизведения). Вместе с тем в микробиологии качество складывается с учетом следующих факторов: высококачественной техники, длительности проведения исследования, его стоимости, а также целесообразности или уместности в конкретном случае. Лабораторные исследования, как правило, дорогостоящи, и с развитием научно-технического прогресса их стоимость будет иметь тенденцию к возрастанию. Соответственно это приведет к увеличению расходов бюджета здравоохранения на лабораторные исследования.

## Определения

Для того чтобы отвечать высоким стандартам качества, диагностический тест должен быть клинически обоснованным, иными словами, он должен помочь профилактике или лечению болезни. Другие требования к качеству диагностических тестов следующие:

- *Достоверность*: Верен ли результат?
- *Воспроизводимость*: Будет ли результат точно таким же, если исследование выполнить еще раз?
- *Скорость*: Достаточно ли быстро будет получен результат для того, чтобы врач мог им воспользоваться при назначении лечения?
- *Соотношение между затратами и выгодой*: Являются ли затраты на проведение теста разумными в связи с той пользой, которую получает пациент или общество?

## Причины, оказывающие влияние на достоверность и воспроизводимость результатов лабораторного анализа

Причинами ошибок могут быть нижеследующие обстоятельства.

- *Персонал*. Техническое выполнение лабораторной работы непосредственно зависит от предшествующего обучения, специализации, личного опыта и условий работы, оговоренных при приеме на работу.
- *Факторы окружающей среды*. Непригодное для лабораторной работы помещение, неудовлетворительное освещение или вентиляция, повышенная температура, повышенный уровень шума, а также небезопасные условия труда могут повлиять на результат исследования.
- *Образцы*. Методы и время отбора проб для исследования зачастую остаются вне контроля лаборатории, однако быстрое начало исследования образца в лаборатории даст возможность достижения наиболее достоверного результата. Иные факторы, относящиеся к настоящему разделу, такие, как транспортировка, идентификация, хранение, подготовка образца к исследованию, могут быть соответствующим образом организованы и проконтролированы. Лаборатория в этом

плане выполняет роль инструктора. Печатные инструкции следует регулярно пересматривать, они должны быть доступны для врачей и медицинских сестер.

- *Лабораторные материалы.* Качество реагентов, химикатов, лабораторной посуды, тест-штампов, искусственных питательных сред и лабораторных животных — все это влияет на достоверность результатов исследования.
- *Методы исследования.* Некоторые методы являются более надежными, чем другие.
- *Оборудование.* Недостаток необходимого оборудования, использование непроверенного (нестандартизованного) оборудования или неадекватное обслуживание оборудования могут привести к получению необъективных результатов.
- *Исследование и учет результатов.* Поспешный учет результатов или просмотр недостаточного числа полей зрения при микроскопии материала может привести к ошибке.
- *Сообщение о результатах исследования.* Ошибки в написании диагноза или неполный ответ могут вызвать проблемы.

## Качество объяснения результатов

В микробиологии особенно важна правильная трактовка полученных результатов. На каждой стадии исследования следует проводить объяснение полученных результатов с тем, чтобы выбрать оптимальные тесты для дальнейших исследований, обеспечивающих в свою очередь получение быстрого и достоверного ответа.

## Обеспечение качества работы в микробиологической лаборатории

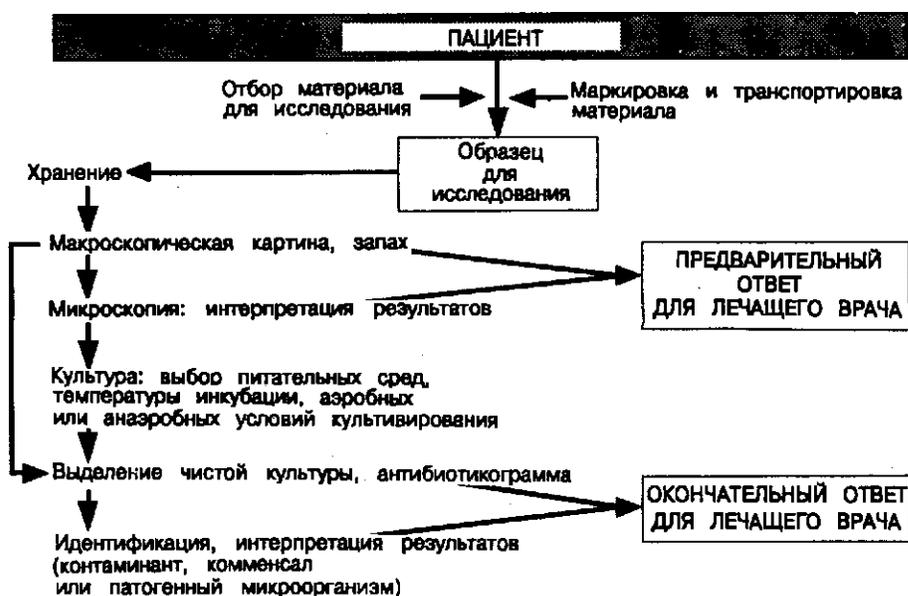
Высокое качество работы лаборатории обеспечивается гарантированно высоким качеством результатов исследования. Чтобы добиться этого, контроль качества должен быть:

- *Всесторонний.* Высокое качество следует обеспечивать на каждом этапе работы, начиная с отбора образцов для исследования и завершая пересылкой ответа врачу (рис. 1).
- *Рациональный.* Основное внимание следует уделять наиболее сложным (спорным) этапам исследования.
- *Регулярный.* Следует обеспечить непрерывный мониторинг с использованием лабораторных исследований.
- *Частый.* Это позволит выявлять и исправлять ошибки, если они появились.

**ВЫСОКОЕ КАЧЕСТВО ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ОЗНАЧАЕТ  
ВЫСОКОЕ КАЧЕСТВО МЕДИЦИНСКОГО ОБСЛУЖИВАНИЯ**

Высокое качество работы позволяет объяснить, что стоимость использованных лабораторных тестов объективно обоснована, дает ответ, действительно ли новые тесты эффективны или бесполезны, ведет к совершенствованию лабораторной службы клинического или общественного здравоохранения, а также помогает получать сопоставимые результаты исследований, выполненных в разных лабораториях.

Рис. 1. Этапы лабораторного исследования материала, полученного от инфекционного больного



### Пути обеспечения качества работы

Существуют два пути обеспечения качества.

- Внутренний — это так называемый КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА. Это означает, что в каждой лаборатории имеется программа (схема) оценки качества с помощью собственных тестов.

Внутренний контроль в идеале включает:

- постоянный мониторинг качества лабораторных тестов;
- всеобъемлющий контроль всех этапов, начиная от сбора образцов материала для анализа до выдачи ответа (если это возможно).

Лаборатории несут этическую ответственность перед пациентом за скрупулезность выполненного исследования и его объективность.

**ВНУТРЕННИЙ КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА АБСОЛЮТНО НЕОБХОДИМ  
ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ**

- Внешний — это так называемая ОЦЕНКА КАЧЕСТВА. Это значит, что выполнение лабораторной работы контролируется другим учреждением. В некоторых странах контролирующие учреждения назначаются правительством и должны иметь на эту деятельность соответствующую лицензию.

Внешний контроль включает:

- периодический мониторинг качества работы;
- выборочный контроль адекватности полученных результатов при иден-

тификации заведомо известных проверяющей стороне микроорганизмов, а также периодический контроль методов изоляции патогенных агентов.

## Критерии качества при микробиологических исследованиях

### Клиническая обоснованность

Весьма важным критерием качества лабораторной работы является постановка только тех тестов, учет результатов которых позволит осуществлять рациональную профилактику или лечение инфекционного заболевания. Целесообразность использования лишь клинически обоснованных тестов может быть достигнута только при тесных доброжелательных взаимоотношениях между клиникой и лабораторией.

Ниже приведены примеры для иллюстрации клинической целесообразности (нецелесообразности) постановки некоторых тестов.

1. Если в процессе лабораторных исследований слюны или смывов со слизистой ротовой полости у госпитализированного больного обнаружено несколько колоний грамотрицательных палочек, дальнейшая их идентификация и изучение антибиотикорезистентности нецелесообразны, поскольку это не повлияет на эффективность лечения пациента.
2. Если выделен *Streptococcus pyogenes*, исследовать полный спектр его антибиотикорезистентности нецелесообразно, поскольку бензилпенициллин является в этом случае препаратом выбора и всегда активен *in vitro*.
3. Если у больного со спорадическим случаем диареи выделена *Escherichia coli*, проводить определение ее серотипа нецелесообразно, поскольку это не прольет свет на объяснение взаимосвязи между серотипом и патогенностью.
4. Если просмотр окрашенного по Граму мазка свидетельствует о "смешанной анаэробной флоре", рутинные приемы идентификации микроорганизмов в аэробных условиях нецелесообразны. Это приведет к материальным и трудовым затратам, но не повлияет на эффективность лечения пациента.
5. Если из проб, отобранных из дыхательных путей, изолированы дрожжевые грибы, следует провести их идентификацию на принадлежность к роду *Cryptococcus*. Дальнейшая же идентификация нецелесообразна, поскольку не влияет на лечение пациента.

В заключение следует указать, что высокое качество лабораторной работы позволяет получить объективные результаты, необходимые для профилактики и лечения инфекционных заболеваний. В то же время вовсе не обязательно проводить идентификацию всех видов микроорганизмов, выделенных при микробиологическом исследовании пробы (образца материала).

### Достоверность

Для тестов, дающих количественные результаты, достоверность определяется путем выявления степени различий между полученными данными и истинными их значениями. Некоторые примеры:

- определение антибиотиков в сыворотке;
- определение минимальных ингибирующих концентраций антибиотиков (МИК) *in vitro*;
- определение титра антител в сыворотке.

Для тестов, дающих качественные результаты, достоверность определяется объективностью полученного результата. Некоторые примеры:

- идентификация микроорганизмов;

- определение чувствительности к антибиотикам выделенных микроорганизмов диско-диффузионным методом.

Использование общепринятой стандартизованной терминологии является весьма важным элементом в микробиологии. При указании родовой и видовой принадлежности микроорганизмов следует пользоваться только международной номенклатурой. Например: *Staphylococcus aureus*, а не "pathogenic staphylococcus"; *Streptococcus pyogenes*, а не "haemolytic streptococcus".

Весьма важно пользоваться унифицированными, современными, чувствительными методами исследований. Так, например, применение дисков для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам следует использовать по общепринятой (международной) методике в модификации Керби — Бауэра.

### **Воспроизводимость**

Воспроизводимость или точность в микробиологии может быть снижена по двум причинам:

1. *Недостаточная гомогенизация.* В исследуемой пробе, полученной от пациента, может содержаться более чем один микроорганизм. Повторное культивирование может привести к изоляции других (нескольких) микроорганизмов.
2. *Недостаточная стабильность* (имеется в виду различная степень устойчивости различных микроорганизмов во внешней среде). Со временем одни микроорганизмы, находящиеся в исследуемом материале, размножаются, другие умирают. Поэтому повторное культивирование может привести к выделению других микроорганизмов. Для получения объективных результатов следует начинать исследование материала как можно раньше после его отбора.

### **Эффективность**

Эффективность микробиологического теста — это возможность с его помощью поставить точный диагноз, выделить этиологический агент (возбудитель) или определить патологическое состояние. Степень эффективности определяется двумя критериями.

#### **1. Чувствительность**

Чувствительность — это общее число положительных результатов, деленное на общее число инфицированных пациентов.

Чем выше чувствительность теста, тем меньше вероятность получения ложноотрицательных результатов.

Например, чувствительность агара Мак-Конки не гарантирует выделения *Salmonella typhi* из фекалий. Этот весьма важный этиологический агент кишечных заболеваний часто не обнаруживается из-за обильного роста непатогенных кишечных бактерий.

#### **2. Специфичность**

Специфичность — это общее число отрицательных результатов, деленное на общее число неинфицированных пациентов.

Чем выше специфичность теста, тем меньше вероятность получения ложноположительных результатов.

Например:

- Окраска проб мокроты по Цилю—Нильсену высокоспецифична для диагностики туберкулеза, поскольку дает незначительное число ложноположительных результатов.

- Окраска проб мочи по Цилю—Нильсену менее специфична, поскольку дает много ложноположительных результатов (в связи с атипичностью микобактерий).
- Проба (реакция агглютинации) Видаля имеет низкую специфичность при диагностике брюшного тифа, поскольку кольцо агглютинации появляется после инфекций, вызванных сальмонеллами разных серотипов, что приводит к ложноположительным результатам.

Чувствительность и специфичность тестов взаимосвязаны. При изменении лимитирующих критериев чувствительность может быть увеличена за счет снижения специфичности, и наоборот.

## Внутренний контроль качества

### Требования

Программа внутреннего контроля качества должна быть:

- практически выполнимой;
- реалистичной;
- экономически обоснованной.

Программа внутреннего контроля качества вовсе не должна предусматривать ежедневной оценки каждой лабораторной методики, реагента или питательной среды. Она должна предусматривать контроль качества методик, реагентов, питательных сред в соответствии с реальной практической работой лаборатории и основываться на степени важности качества каждого компонента для качества работы в целом.

### Процедура

Внутренний контроль качества начинается с рациональной организации работы лаборатории.

### Положение по организации лабораторной работы

В каждой лаборатории должно быть Положение о ее работе, регламентирующее такие вопросы, как:

- санитарное содержание рабочих помещений;
- личная гигиена персонала;
- выделение отдельных помещений для приема пищи и курения;
- техника безопасности;
- порядок обращения с инфицированным материалом и его утилизации;
- специфическая защита персонала путем иммунизации (если необходимо);
- обслуживание лабораторного оборудования;
- прием проб на исследование;
- регистрация принятых проб;
- утилизация несоответствующих стандартов проб;
- порядок исследования пробы;
- запись результата исследования;
- отметка о сообщении результата исследования.

Положение о лаборатории должно соблюдаться; его следует регулярно пересматривать и актуализировать.

### Обслуживание лабораторного оборудования

Качество лабораторного оборудования особенно важно. Удовлетворительное

выполнение лабораторных исследований совершенно невозможно на устаревшем оборудовании или с использованием оборудования, техническому обслуживанию которого уделяют недостаточное внимание.

В табл. 1 представлен график обслуживания наиболее важного для лабораторных исследований оборудования. Запись температурного режима работы оборудования можно вести в таблице, аналогичной той, которая представлена на рис. 2.

**Таблица 1. Контроль за качеством работы оборудования**

Оборудование	Рутинное обслуживание	Мониторинг	Техническое обслуживание и инспекция
Анаэростат	Каждую неделю протирают изнутри. Реактивируют каталитический агент каждый раз после работы (160 °С, 2 ч) Меняют каталитический агент каждые 3 мес	Контроль работы осуществляют постоянно с помощью бумажного индикатора с метиленовым синим	Еженедельно проверяют состояние прокладок в крышке
Автоклав	Содержат в чистоте, воду меняют ежемесячно	Перед началом работы проверяют уровень воды в "смотровом окошке" Записывают время и температуру или давление при каждом цикле работы Записывают показания результатов термического контроля (бумажный термоиндикатор) 1 раз в месяц	Каждые 6 мес
Центрифуга	Внутренние поверхности протирают растворами антисептиков еженедельно, а также в случае повреждений пробирок в процессе центрифугирования или выплескивания их содержимого		Замена контактов генератора ежегодно
Сухожаровой стерилизатор	Ежемесячно протирают внутренние поверхности	Записывают время и температуру при каждом цикле работы	Каждые 6 мес
Термостат	Ежемесячно протирают стенки и полки	Записывают температуру в начале каждого рабочего дня (норма 35±2 °С)	Каждые 6 мес
Микроскоп	Оптические части протирают тканью или специальной бумагой после завершения рабочего дня Механические части протирают и еженедельно смазывают Для предохранения от пыли, когда не используют в работе, сверху закрывают чехлом	Проверяют и регулируют конденсор еженедельно	Ежегодно
Холодильник	Моют и дефростируют каждые два месяца, а также после аварийного отключения электроэнергии	Записывают температуру в первый день рабочей недели (норма 2—8 °С)	Каждые 6 мес
Водяная баня	Моют внутренние стенки и меняют воду ежемесячно	Контролируют уровень воды ежедневно Записывают температуру в первый день рабочей недели (норма 54—57°С)	Каждые 6 мес

## Питательные среды

Питательные среды могут быть приготовлены непосредственно в лаборатории из основных ингредиентов или путем растворения в воде выпускаемых промышленно сухих сред, а также приобретены в готовой форме. Выпускаемые промышленным способом сухие питательные среды более предпочтительны, поскольку они экономичны, удобны для транспортировки и хранения. Кроме того, их качество, как правило, выше, чем качество сред, приготовленных в лаборатории. Для получения наилучших результатов следует обратить особое внимание на требования, перечисленные ниже.



### **Выбор питательной среды**

Эффективность работы лаборатории определяется наличием хотя бы обязательного минимального ассортимента реагентов и питательных основ, позволяющих изготавливать различные питательные среды. Так, например, агар хорошего качества может быть использован для многих целей: для приготовления кровяного агара, шоколадного агара, а также для некоторых селективных питательных сред.

Обычно для выделения патогенных энтеробактерий из фекалий необходима лишь одна высокоселективная питательная среда (агар сальмонелла/шигелла или дезоксихолатцитратный агар) и одна слабоселективная питательная среда (агар Мак-Конки).

А для выделения *Campylobacter jejuni* нужно использовать специальные питательные среды.

### **Заказ и хранение сухих питательных сред**

1. Количество питательных сред следует заказывать с таким расчетом, чтобы они были использованы в течение 6 мес, в крайнем случае в течение 1 года.
2. Излишнее количество питательных сред следует упаковать в контейнеры и использовать в течение 1—2 мес.
3. Контейнеры должны быть закрыты плотной крышкой, на них необходимо наклеить соответствующие ярлыки-этикетки. Питательные среды активно адсорбируют воду из атмосферного воздуха. В условиях влажного климата верх контейнеров с сухими питательными средами заклеивают парафином (пространство между крышкой и контейнером заполняют расплавленным воском и дают ему застыть).
4. На этикетке каждого контейнера следует указать дату.
5. Следует хранить контейнеры в темном, прохладном, хорошо вентилируемом помещении.
6. Следует постоянно проверять запасы питательных сред и в первую очередь использовать наиболее старые партии.
7. При вскрытии контейнера на ярлыке следует указать эту дату.
8. Среды, которые изменили цвет (например, потемнели) или потеряли сыпучесть, не подлежат использованию.
9. Необходимо иметь письменный перечень всех питательных сред, находящихся в лаборатории.

### **Приготовление питательных сред**

1. Необходимо точно следовать инструкции предприятия-изготовителя.
2. Следует готовить такое количество питательной среды, которое будет использовано до окончания максимального срока хранения (см. ниже).

### **Хранение приготовленных питательных сред**

1. Защищать от воздействия прямых солнечных лучей.
2. Хранить вдали от отопительных приборов. Питательные среды, содержащие кровь, другие органические добавки или антибиотики, следует хранить в холодильнике.
3. Максимальный срок хранения приготовленных питательных сред, которые хранят в холодном, темном помещении, зависит от типа лабораторной посуды, в которую они разлиты:
  - пробирки с ватно-марлевыми пробками — 3 нед;
  - пробирки с неплотно прилегающими крышками — 2 нед;
  - бутылки с завинчивающимися крышками — 3 мес;
  - чашки Петри в заклеенных пластиковых пакетах — 4 нед.

### Контроль качества приготовленных питательных сред

1. *Измерение рН.* Если питательная среда готовилась из промышленно выпускаемых сухих питательных сред в строгом соответствии с инструкцией, измерять рН нет необходимости. Если питательная среда готовилась из основных питательных ингредиентов, до определения рН ее необходимо охладить. Реакцию рН измеряют с помощью потенциометра. Если рН изготовленной партии питательной среды отличается более чем на 0,2 единицы от требуемого значения, проводят коррекцию путем добавления кислоты или щелочи или готовят новую партию.
2. *Тест на стерильность.* Контроль на стерильность проводят в отношении тех питательных сред, в которые после автоклавирования добавляли кровь или другие компоненты. Берут 3—5 % каждой партии питательной среды и инкубируют в термостате при температуре 35 °С на 2 дня. Оставшуюся часть партии помещают в холодильник. Если на каждой чашке Петри после инкубации будет обнаружено более двух колоний, исследованная партия подлежит уничтожению.
3. *Контроль качества питательных сред.* В каждой лаборатории следует иметь набор штаммов микроорганизмов, которые используют для определения качества питательных сред. Предлагаемый перечень штаммов микроорганизмов представлен в табл. 2. Штаммы могут быть выделены при обычной микробиологической работе либо получены через коммерческие или государственные источники. Рекомендации по применению и использованию штаммов приведены в разделе "Поддержание запасов и использование культур".

В табл. 3 указаны основные тесты для контроля наиболее распространенных питательных сред.

Условия постановки тестов контроля качества новых серий питательных сред:

- Следует готовить суспензию выбранного для контроля микроорганизма с таким расчетом, чтобы его оптическая плотность соответствовала стандартному раствору сульфата бария в модификации Керби—Бауэра (0,5 ед. Мак-Фарланда). В качестве инокулята используют одну бактериологическую петлю приготовленной суспензии.

Таблица 2. Предлагаемый набор основных микроорганизмов для контроля качества питательных сред<sup>а</sup>

<b>Грамположительные кокки</b>	<b>Энтеробактерии</b>
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212 или 33186)	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<b>Грамотрицательные неферментирующие микроорганизмы</b>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Branhamella catarrhalis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Haemophilus influenzae</i> тип В	<b>Другие грамотрицательные палочки</b>
$\beta$ -лактомазоотрицательные	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> biovar/woffii
$\beta$ -лактомазоположительные	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Vibrio cholerae</i> (мон-01)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<b>Грибы</b>
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Candida albicans</i>
<b>Анаэробы</b>	
<i>Bacteroides fragilis</i>	
<i>Clostridium perfringens</i>	

<sup>а</sup> Следует подбирать штаммы, наиболее соответствующие направлению деятельности лаборатории.

Таблица 3. Тесты для контроля наиболее распространенных питательных сред

Питательная среда	Инкубация	Микроорганизм, используемый для контроля	Ожидаемый результат
Желчно-эскулиновый агар	24 ч		Рост и потемнение Отсутствие роста
Кровяной агар	24 ч, CO <sub>2</sub> (сосуд со свечой)	<i>S. pyogenes</i> <i>S. pneumoniae</i>	Рост и β-гемолиз Рост и α-гемолиз
Шоколадный агар Декарбоксилаза (сверху залито стерильным маслом) — лизин	24 ч, CO <sub>2</sub>	<i>H. influenzae</i>	Рост
— орнитин	48 ч	<i>S. typhimurium</i> <i>S. flexneri</i>	Положительный Отрицательный
— аргинин (дегидролаза)	48 ч	<i>S. typhimurium</i> <i>K. pneumoniae</i>	Положительный Отрицательный
Желатиназа (экспресс-тест)	24 ч	<i>S. typhimurium</i> <i>P. mirabilis</i> <i>E. coli</i> <i>S. marcescens</i>	Положительный Отрицательный
Агар Клиглера с железом (см. трехсахарный агар с железом)			
Агар Мак-Конки с кристаллическим фиолетовым	24 ч	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i> <i>E. faecalis</i>	Красные колонии Бесцветные колонии (нет ползучего роста) Отсутствие роста
Малонатовый бульон	24 ч	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Отрицательный (зеленый) Положительный (голубой)
Маинитоповый солевой агар	24 ч	<i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>E. coli</i>	Желтые колонии Розовые колонии Нет роста
Метилловый красный/среда Фогеса — Проскауэра	48 ч	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Положительный/отрицательный Отрицательный/положительный
Агар Мюллера—Хинтона	24 ч	<i>E. coli</i> ATCC 25922 <i>S. aureus</i> ATCC 25923 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Приемлемые размеры зоны лизиса (см. табл. 13)
Нитратный бульон	24 ч	<i>E. coli</i> <i>A. calcoaceticus</i>	Положительный Отрицательный
Окисление/ферментация (OF), декстроза (без масла)	24 ч	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. calcoaceticus</i> biovar <i>lwoffii</i>	Окисление на поверхности Нет изменений
Пептонная вода (индол)	24 ч	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Положительный Отрицательный
Фенилаланин дезаминаза	24 ч	<i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i>	Положительный Отрицательный
Агар сальмонелла/шигелла или дезоксихолатцитратный агар	24 ч	<i>E. coli</i> <i>S. typhimurium</i> <i>Y. enterocolitica</i> <i>S. flexneri</i>	Нет роста Неокрашенные колонии Неокрашенные колонии Неокрашенные колонии
Селенитовый бульон	24 ч	<i>S. typhimurium</i> <i>E. coli</i>	Рост после подраствивания Нет роста после подраствивания
Цитрат Симмонса (инкубирование с незавинченной крышкой)	48 ч	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	Нет роста Рост, голубые колонии
Тиосульфат-цитрат-желчно-солевой агар (TCBS)	24 ч	<i>Vibrio</i> spp (неагглютинирующая)	Желтые колонии
Тетратионовый бульон (см. селенитовый бульон)		<i>E. coli</i>	Нет роста
Агар Тайера—Мартена	24 ч, CO <sub>2</sub>	<i>N. meningitidis</i> <i>N. gonorrhoeae</i> <i>Staphylococcus</i> spp <i>E. coli</i> <i>C. albicans</i>	Рост Рост Нет роста Нет роста Нет роста
Тиогликолевый бульон	24 ч	<i>B. fragilis</i>	Рост
Трехсахарный агар с железом (размер столбика должен быть не менее 2,5 см; инкубировать с незавинченной крышкой)	24 ч	<i>E. freundii</i> <i>S. typhimurium</i> <i>S. flexneri</i>	A/A газ <sup>a</sup> + H <sub>2</sub> S A/A газ <sup>a</sup> + H <sub>2</sub> S K/A <sup>a</sup>
Среда с мочевиной	24 ч	<i>A. calcoaceticus</i> <i>E. coli</i> <i>P. mirabilis</i>	Нет изменений Нет изменений Положительный
Среда Фогеса—Проскауэра (см. Метилловый красный/среда Фогеса—Проскауэра)			

<sup>a</sup> A/A — закисление; K/A — защелачивание.

- Продолжительность и температура инкубации обычные. Учет результатов следует проводить общепринятым способом.
- Следует вести подробные записи о результатах контроля.

### Окраска и реагенты

Рекомендуемые для постановки тестов реактивы приведены в табл. 4. Тестирование следует проводить:

- каждый раз, когда готовится новая партия рабочих растворов;
- еженедельно (это не относится лишь к красителям, используемым для окраски по Цилю—Нильсену, срок годности которых при хранении в прохладном месте достигает нескольких месяцев).

Красители и реагенты не подлежат использованию, если:

- срок годности истек;
- появились видимые признаки порчи (помутнение, появление хлопьев, осадок, изменение цвета).

### Диагностические антигены и антисыворотки

Для того чтобы получить наиболее объективные результаты при использовании антигенов и антисывороток, необходимо соблюдать перечисленные ниже условия.

- Строго следовать инструкции изготовителя.
- Хранить в рекомендуемых температурных условиях. Некоторые серологические реагенты нельзя подвергать замораживанию.
- Избегать повторного замораживания и оттаивания. Перед заморажива-

Таблица 4. Тесты для контроля наиболее распространенных реагентов

Реагент или краситель	Результаты анализа		Среда
	положительные	отрицательные	
Бацитрациновый диск	<i>S. pyogenes</i> (зона)	<i>E. faecalis</i>	Кровяной агар
Каталаза	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	TCA <sup>a</sup>
Коагулаза плазмы	<i>S. aureus</i>	<i>E. epidermidis</i>	TCA
$\beta$ -глюкуронидаза	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	TCA
Окраска по Граму	<i>Staphylococcus</i>	<i>E. coli</i>	Мазок смешанных культур
ONPG <sup>b</sup>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. typhimurium</i>	Трехсахарный агар с железом или агар Клигlera
Диски с оптохином	<i>S. pneumoniae</i> (зона)	<i>S. mitis</i>	Кровяной агар
Оксидаза	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	TCA
Теллуритовый диск	<i>E. faecalis</i> (нет зоны)	<i>S. agalactiae</i> (зона)	Кровяной агар
V-фактор (диски или бумажные полоски)	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. influenzae</i>	TCA
XV-фактор (диски или бумажные полоски)	<i>H. influenzae</i>		TCA
Окраска по Цилю—Нильсену	<i>M. tuberculosis</i>	Смешанная флора не-кислотоустойчивых микроорганизмов	Мазок мокроты <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Триптиказо-соевый агар.

<sup>b</sup> О-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозид.

<sup>b</sup> Готовят мазки из проб, полученных от пациентов с точно установленными диагнозами, вызванными грамположительными или грамотрицательными микроорганизмами. Фиксируют на пламени горелки, каждый препарат заворачивают в бумагу, хранят в холодильнике.

нием следует разделить антисыворотку на несколько равных частей, достаточных по объему для постановки нескольких тестов.

- Не пользоваться препаратом после истечения срока годности, определенного изготовителем.
- При тестировании агглютационной способности антисыворотки всегда использовать свежую культуру с известной реакцией.
- Всегда ставить контроль каждой партии. Можно использовать как полученную от пациента, так и промышленно изготовленную сыворотку.
- По возможности активность сыворотки следует выражать в международных единицах на 1 мл.
- При контроле парных сывороток, полученных от одного и того же пациента на разных стадиях болезни, вторую сыворотку следует контролировать с использованием реагентов из той же партии, из которой брали реагенты первой сыворотки.
- Для серологической диагностики сифилиса следует использовать либо принятую в стране, либо международно принятую методику контроля.
- Каждая партия серологических тестов должна включать:
  - отрицательную сыворотку (контроль специфичности);
  - наибольшее разведение сыворотки, обладающее положительной реакцией (контроль чувствительности);
  - наименьшее разведение сыворотки (титрационный контроль), из которого рассчитывается результат разведения, т.е. учет истинного титра сыворотки.
- Следует всегда фиксировать все контроли сывороток.

### Тесты для изучения чувствительности к антибиотикам

Для изучения чувствительности к антибиотикам используют рутинную методику в модификации Керби—Бауэра (см. с. 95). Для того чтобы избежать ошибок, следует придерживаться перечисленных ниже правил.

- Использовать диски адекватного диаметра (6,35 мм).
- Выдерживать определенную активность дисков (см. табл. 13, с. 96).
- Хранить основные партии дисков в замороженном состоянии ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).
- Рабочие партии дисков можно хранить не более одного месяца в холодильнике ( $2-8^{\circ}\text{C}$ ).
- Для контроля качества следует применять только агар Мюллера—Хинтона.
- Для некоторых антибиотиков совершенно необходимым условием является использование питательных сред с реакцией pH 7,2—7,4.
- Посевная доза микроорганизмов должна быть стандартизована по стандарту мутности.
- Измерение зон следует осуществлять с большой точностью.
- Результаты следует интерпретировать путем сравнения размера полученной зоны задержки роста с показателем специальной таблицы. Диаметры зон задержки роста для каждого микроорганизма приведены в табл. 14.
- Лишь использование чистой быстро растущей культуры микроорганизма дает возможность получить достоверный результат.
- Для контроля следует использовать три стандартные культуры микроорганизмов<sup>1</sup>:
  - *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923; NCTC 6571);
  - *Escherichia coli* (ATCC 25922; NCTC 10418);
  - *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853; NCTC 10622).
- Необходимо использовать для контроля все три стандартные культуры:
  - если начинают использовать новую партию дисков;
  - если начинают использовать новую партию питательной среды;

<sup>1</sup> Штаммы можно получить, обратившись по следующим адресам: American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA или National Collection of Type Cultures (NCTC), Public Health Laboratory Service, London NW9, England.

- один раз в неделю параллельно с выполнением обычных антибиотикограмм.
- Для записи результатов и оценки чувствительности к антибиотикам следует использовать форму, которая приведена на рис. 11.

## Поддержание запасов и использование культур

### Выбор штаммов и источники их получения

Выбор штаммов должен осуществляться с таким расчетом, чтобы при использовании их минимального числа можно было бы определить широкий спектр морфологических, метаболических и серологических свойств. Предлагаемый перечень культур представлен в табл. 2. Штаммы для этих целей могут быть получены из следующих источников:

- соответствующим образом документированные изоляты из клинического материала;
- государственные коллекции микроорганизмов;
- коммерческие производители;
- структуры, осуществляющие внешний надзор за качеством работы лабораторий;
- справочные лаборатории.

### Сохранение

#### Длительное сохранение

Методы длительного сохранения культур позволяют хранить их без субкультивирования в течение месяцев и даже лет. Наилучшими методами являются лиофилизация (сухое замораживание) или хранение при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$  и ниже в электрическом морозильнике или жидком азоте. Альтернативные методы описаны ниже.

1. Глицерин при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .
  - Вырастите чистую культуру микроорганизма на соответствующей питательной среде.
  - После завершения времени культивирования выросшие колонии снимите бактериологической петлей.
  - Суспендируйте небольшое количество культуры в стерильном натуральном глицерине.
  - Разлейте суспензию по 1—2 мл в пробирки или флаконы с пробками.
  - Храните при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .
  - Избегайте повторного замораживания и оттаивания.
  - По истечении 12—18 мес извлеките культуру из консерванта и перенесите на питательную среду.
2. Минеральное масло при комнатной температуре<sup>1</sup>.
  - Готовят пробирки со “скошенным” агаром. Для микроорганизмов, обладающих высокими питательными потребностями, в агар добавляют свежую кровь.
  - Стерилизуют минеральное масло (жидкое вазелиновое масло) в сухожаровом шкафу при  $t +170^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч.
  - Выращивают чистую культуру на скошенном агаре.
  - После того как на поверхности агара появятся колонии, в пробирку

<sup>1</sup> Morton, H.E. & Pulaski, E.J. The preservation of bacterial cultures. *Journal of bacteriology*, 38: 163—183 (1938).

- добавляют минеральное масло, чтобы его уровень был выше на 1 см самой высокой точки скошенной части агара.
- При необходимости берут культуру с поверхности агара из-под слоя масла.
  - Хранят культуры при комнатной температуре.
  - Пересев культур осуществляют через 6—12 мес.
3. Материалы, полученные с помощью посева уколом. (Хранение при комнатной температуре. Используют только в отношении культур, не обладающих повышенными требованиями к питательным средам, — стафилококков и энтеробактерий.)
- Подготовьте пробирки со “столбиками” агара, не содержащего углерода. Рекомендуется использовать триптиказосоевый агар.
  - Засейте микроорганизм внутрь агара уколом.
  - Инкубируйте в течение суток при температуре 35 °С.
  - Закройте пробирки плотными ватно-марлевыми или корковыми пробками.
  - Пробки обработайте расплавленным парафином для герметизации пробирок.
  - Храните при комнатной температуре.
  - Пересев культур осуществляют через 1 год.
4. Материалы, полученные с помощью посева уколом в цистинтриптиказный агар (для *Neisseria* и стафилококков).
- Подготовьте пробирки с цистинтриптиказным агаром.
  - Засейте микроорганизм внутрь среды уколом.
  - Инкубируйте посевы в течение суток при температуре 35 °С.
  - Закройте пробирки ватно-марлевыми или корковыми пробками.
  - Погрузите пробки в расплавленный раствор парафина для того, чтобы изолировать культуру в пробирке от внешних воздействий.
  - Пробирки с *Neisseria* храните при температуре 35 °С и пересевайте каждые 2 мес. Пробирки со стафилококками храните при комнатной температуре, пересевать каждый месяц.
5. Среда из рубленого мяса для анаэробов.
- Произвести посев культуры в пробирку со средой.
  - Инкубировать посевы при температуре 35 °С в течение суток.
  - Пробирки закрыть ватно-марлевыми или корковыми пробками.
  - Хранить посевы при комнатной температуре.
  - Пересев осуществлять каждые 2 мес.

### Сохранение в течение непродолжительного времени

Рабочие культуры для повседневной рутинной работы могут быть сохранены следующим образом:

1. *Быстрорастущие микроорганизмы*
  - Микробы засеять в пробирку со скошенным триптиказо-соевым агаром и укупорить ватно-марлевой пробкой.
  - Инкубировать в течение суток при температуре 35 °С.
  - Хранить в холодильнике.
  - Пересевать каждые 2 нед.
2. *Стрептококки*
  - Микробы засеять в пробирку со скошенным кровяным агаром и укупорить ватно-марлевой пробкой.
  - Инкубировать в течение суток при температуре 35 °С.
  - Хранить в холодильнике.
  - Пересевать каждые 2 нед.

### 3. Менингококки и *Haemophilus*

- Микробы засеять на скошенный шоколадный агар в пробирку или чашку.
- Инкубировать в течение суток при температуре 35 °С.
- Хранить при комнатной температуре.
- Пересевать дважды в неделю.

### 4. Гонококки

- Микробы засеять на шоколадный агар.
- Инкубировать и хранить при температуре 35 °С.
- Пересевать каждые два дня.
- Осуществляют замену используемого для контроля качества штамма на вновь выделенную от больного человека культуру гонококка.

## Использование справочных лабораторий

В региональную или центральную справочную лабораторию следует направлять образцы исследуемого материала перечисленных ниже категорий.

- Образцы для выполнения редко требующихся или узкоспецифических тестов (например, вирусологические исследования, серодиагностика паразитарных заболеваний).
- Дубликат исследуемого в лаборатории образца для проверки правильности собственных результатов.
- Образцы, для которых в дальнейшем потребуется подтверждение групповой или видовой принадлежности или типирование особо важных для общественного здравоохранения патогенных микроорганизмов, например сальмонелл, шигелл, холерных вибрионов, бруцелл, менингококков и пневмококков.

В справочных лабораториях можно получить референс-культуры для осуществления внутреннего контроля качества и для педагогических целей, а также стандартизованных сывороток для сравнения их качеств с теми, которые используются в лабораториях на местах.

Если по каким-либо причинам программа внешней оценки качества не осуществляется, лабораториям на местах следует запрашивать в справочной лаборатории "закодированные" образцы и микроорганизмы с тем, чтобы иметь возможность реально оценить собственный профессиональный уровень в области выделения и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний.

## Внешняя оценка качества

В настоящем разделе освещается схема внешней оценки качества (в ряде случаев известная как "схема определения профессионального уровня").

### Цели

Цели программы оценки качества:

- Обеспечить уверенность лечащих врачей и граждан в том, что качество лабораторной диагностики является гарантированно высоким.
- Оценить и сравнить надежность лабораторных методов на национальном уровне.
- Выявить наиболее распространенные ошибки.

- Оказывать содействие в использовании унифицированных методик.
- Оказывать содействие в использовании стандартизованных реагентов.
- Применять меры административного воздействия (вплоть до изъятия лицензии на лабораторную деятельность) в отношении лабораторий, пользующихся нестандартными методами и реагентами.
- Способствовать внедрению программ внутреннего контроля качества.

## Организация

Программа оценки качества включает контроль за лабораториями на местах, который обеспечивается с помощью пересылки в них "кодированных" проб. Эти пробы должны быть приняты лабораторией и подвергнуты микробиологическому исследованию точно таким образом, как это делается при ежедневной рутинной работе.

Контроль должен осуществляться в соответствии со следующими рекомендациями:

- В идеале контрольные процедуры следует проводить 12 раз в год, в любом случае не реже 4 раз в год.
- Для контроля следует отсылать на исследование минимум 3 пробы.
- Инструкции, а также формы учета результатов должны прилагаться к каждой направляемой на контроль пробе.
- Форма учета результатов должна заполняться в двух экземплярах с указанием срока, к которому следует завершить исследование.

## Культуры

На контрольное исследование следует направлять пробы культур не только для их идентификации, но и для определения чувствительности к определенному перечню антибиотиков. Это могут быть пробы, содержащие чистые культуры, а также смешанные пробы, состоящие из двух или более культур.

В культурах должны быть представлены по крайней мере первые три из следующих пяти категорий.

1. Бактериальные образцы (микроорганизмы), которые представляют наибольшее значение для общественного здравоохранения, но не часто встречаются в повседневной практике, например *Corynebacterium diphtheriae*, *Salmonella paratyphi A*.  
ВНИМАНИЕ. Бруцеллы и *Salmonella typhi* не могут быть использованы в качестве контрольных образцов, поскольку они могут послужить причиной тяжелых инфекционных заболеваний (эпидемиологических осложнений).
2. Нестандартные биотипы, идентификация которых часто затруднительна, например  $H_2S$ -положительные кишечные палочки, лактозоотрицательные кишечные палочки, уреазоотрицательные протей.
3. Новые обнаруженные или оппортунистические патогены, например *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas ceracia*.
4. Смесь из шигелл, цитробактеров, кишечных палочек и клебсиелл может быть использована для определения профессионального мастерства выделения патогенных микроорганизмов среди значительного количества комменсалов.
5. Смесь из непатогенных микроорганизмов может быть использована для определения способности лаборатории распознать отсутствие патогенных микроорганизмов в исследуемом образце.

### Сыворотки

Составной частью программы внешней оценки качества должно являться серологическое тестирование для выявления следующих инфекций:

- сифилис
- токсоплазмоз
- краснуха
- бруцеллез
- гепатиты
- стрептококковые инфекции
- брюшной тиф (реакция Видала там, где она используется в повседневной практике)
- ВИЧ-инфекция.

### Учет результатов и обратная связь

Как только от участвующих в программе лабораторий получены все результаты, справочная лаборатория отправляет в их адрес правильные ответы. Затем в течение месяца в каждую лабораторию отправляют результаты окончательных итогов с анализом полученных результатов. Каждая лаборатория получает оценку своей деятельности. Каждая лаборатория должна иметь свой собственный цифровой код, известный только ей одной. Таким образом, она может отличить результаты выполненного ею контрольного задания от результатов других лабораторий, в то время как другие лаборатории остаются для нее анонимными.

---

## **Часть I**

# **Бактериологические исследования**

## Введение

Кровь исследуют для определения и идентификации бактериальных или других культивируемых микроорганизмов (дрожжи, нитевидные грибы). Наличие таких микроорганизмов в крови свидетельствует о бактериемии или фунгемии, что всегда является патологией. В норме у здорового человека кровь стерильна. Вместе с тем имеется несколько исключений: транзиторная бактериемия довольно часто на короткое время возникает после экстракции зуба или других зубных манипуляций, а также хирургических вмешательств на слизистых оболочках, контаминированных микроорганизмами, бронхоскопии или катетеризации уретры. Этот тип транзиторной бактериемии обусловлен в основном комменсалами и всегда купируется спонтанно в результате фагоцитоза бактерий в печени и селезенке.

Септицемия — клинический термин, используемый для описания бактериемии, вызванной тяжелой инфекцией, клинические симптомы которой могут включать сильный озноб, лихорадку, недомогание, токсикоз и гипотензию; высшая форма проявления бактериемии — шок. Шок может быть обусловлен эндотоксином, продуцируемым грамотрицательными палочками.

## Причины бактериемии

1. Достаточно большое число локальных инфекций (локальных инфекционных процессов) часто сопровождается транзиторной бактериемией: менингиты, пневмонии, пиелонефриты, остеомиелиты, артриты, перитониты, холециститы, энтероколиты, травмы или постоперационные инфекции, открытые поражения кожи, язвы и др.
2. Бактериемия является характерной особенностью некоторых инфекционных заболеваний, таких, как брюшной тиф, бруцеллез, лептоспироз.
3. Бактериемия (фунгемия) может быть результатом поступления микроорганизмов при проведении внутривенных трансфузий с использованием контаминированных растворов, катетеров, игл.
4. Транзиторная бактериемия может быть результатом различных хирургических манипуляций, но всегда купируется спонтанно при условии, что оперируемый больной не страдает иммунодефицитом.
5. Длительная бактериемия является характерной чертой эндоваскулярных инфекций, таких, как эндокардит, инфицированная аневризма, тромбофлебит.
6. Бактериемия и фунгемия могут развиваться при использовании лекарственных препаратов, применяемых внутривенно. Они наиболее часто обусловлены "оппортунистическими" микроорганизмами и могут иметь серьезные последствия.

## Взятие проб крови

### Выбор времени взятия проб крови

По возможности взятие проб крови следует производить до назначения антибиотиков. Лучше всего брать пробы крови, когда у пациента наблюдается озноб или пик температурной реакции. Рекомендуется брать две или лучше три пробы крови с интервалом примерно в 1 ч (или меньше, если лечение нельзя откладывать). Более трех проб назначают исключительно редко. Преимущества повторного взятия проб крови:

- снижение риска упустить транзиторную бактериемию;
- возможность подтверждения этиологической роли выделенной из крови "сапрофитной микрофлоры" (например, *Staphylococcus epidermidis*), если эта микрофлора обнаруживается во множестве проб венозной крови.

После взятия проб крови и выделения микрофлоры следует провести эмпирический подбор антибиотиков для терапии. При необходимости после определения чувствительности культуры к различным антибиотикам можно выбрать наиболее эффективный препарат.

### Количество крови

Поскольку количество бактерий в 1,0 мл крови всегда незначительно, очень важно взять достаточное количество крови: у взрослых — 10,0 мл крови из вены; у детей — 2,0—5,0 мл; у новорожденных и детей неонатального периода чаще можно получить не более 1,0—2,0 мл крови.

### Дезинфекция кожи

Участок кожи над веной, откуда будут брать кровь, должен быть тщательно обработан с помощью бактерицидного препарата: настойки йода, 10 % поливидон-йодата, 70 % спирта или 0,5 % хлоргексидина в 70 % спирте. Дезинфектант должен испариться с поверхности кожи до взятия пробы крови. Если использовалась йодная настойка, ее следует стереть 70 % спиртом для того, чтобы избежать раздражения кожи.

Даже после тщательной обработки кожных покровов некоторые бактерии остаются в глубоких слоях кожи и могут проникнуть в кровь, например *S. epidermidis*, *Propionibacterium asnes* и даже споры клостридий. Псевдобактериемия (ложноположительные находки микробов в крови) может быть обусловлена использованием контаминированных антисептических растворов, шприцев или игл. Повторное выделение из крови "нетрадиционного, нехарактерного" микроорганизма (например, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter agglomerans*, *Serratia* spp) в том же госпитале может вызвать подозрение о внутрибольничной инфекции и стать поводом для проведения расследования. Другим источником контаминации является контакт иглы с нестерильной ампулой (флаконом), если тот же самый шприц использовался вначале для химических анализов крови или им проводили манипуляции для определения скорости оседания эритроцитов.

### Антикоагулянт

В качестве антикоагулянта рекомендуется использовать полианитол-сульфонат калия (ПСК), поскольку он также обладает антибактериальным действием. Если после забора кровь незамедлительно добавить в достаточное количество бульона (50 мл) и тщательно перемешать для предупреждения образования сгустков, обрабатывать кровь антикоагулянтом нет необходимости. Этот метод "бутилирования культуры крови" рекомендуется для использования во всех госпиталях и медицинских центрах. Если метод бутилирования невозможен, кровь транспортируют в лабораторию в пробирке с добавлением стерильного антикоагулянта (цитрат, гепарин, ПСК). Как только такая кровь доставлена в лабораторию, она должна быть немедленно пересеяна во флаконы для культивирования в строго асептических условиях. Если в кровь не добавлялись антикоагулянты, сгустки крови в лаборатории можно в асептических условиях перенести в бульон, а сыворотку использовать для серологических исследований (например, реакция Видалья).

## Среда для культивирования крови

### Выбор жидкой питательной основы

Жидкая питательная основа должна обеспечить наилучшие условия роста всех видов клинически значимых бактерий. Наилучшей основой оказался триптиказо-соевый бульон (ТСБ).

### Количество питательной основы

В идеале кровь смешивают с бульоном в соотношении 1:10 (5,0 мл крови и 50,0 мл питательного бульона); это делается для того, чтобы разбавить присутствующие в крови антибиотики и уменьшить бактерицидный эффект человеческой сыворотки.

### Флаконы для культивирования крови

Для приготовления флаконов для культуры крови их заполняют средой и затем наполовину отворачивают крышки. Сверху крышки покрывают квадратиками алюминиевой фольги или коричневой бумаги. Флаконы помещают в автоклав на 20 мин при температуре 120 °С. Немедленно после автоклавирования, пока еще среда остается горячей, осторожно плотно закрывают флаконы крышками, не снимая с них фольгу или коричневую бумагу (в противном случае крышки окажутся нестерильными). Как только среда остынет, во флаконе образуется неглубокий вакуум, который будет способствовать проницаемости мембран (крышек) для образцов крови.

Верхнюю часть крышки следует осторожно продезинфицировать до инокуляции флакона.

До рассылки флаконов и перед использованием их внимательно проверяют на прозрачность. Если питательная среда окажется мутной, она не подлежит использованию.

Если предполагается обнаружить только аэробные бактерии (*Pseudomonas*, *Neisseria*) или дрожжи, флаконы следует разгерметизировать, как только они будут получены из лаборатории. Для этого крышки меняют на стерильные ватно-марлевые пробки или протыкают предварительно простерилизованную мембрану снабженной ватно-марлевой заглушкой иглой. Иглу вынимают из пробки, как только давление во флаконе достигнет величины атмосферного давления. Флаконы со средой с кровью для культивирования, выпускаемые промышленным способом, также часто содержат углекислый газ, который обладает стимулирующим рост микроорганизмов действием.

В странах, где широко распространены бруцеллы, рекомендуется использовать так называемые двухфазные флаконы, которые заполнены бульоном (жидкая фаза) и скошенным агаром (твердая фаза). Наличие двуокиси углерода необходимо для выделения большинства штаммов *V. abortus*.

## Методика культивирования крови

### Время инкубирования

Флаконы для культивирования крови следует инкубировать при температуре 35—37 °С и дважды в день (хотя бы в течение первых трех дней) проверять на наличие микробного роста. О стерильности свидетельствует

красный слой крови на дне флакона, покрытый бледно-желтым бульоном. О наличии микробного роста свидетельствует:

- хлопьевидный осадок на поверхности слоя крови;
- помутнение либо всей среды, либо ее поверхностной части;
- гемолиз;
- коагуляция бульона;
- пленка на поверхности;
- газообразование;
- белые крупинки на поверхности или внутри кровяного слоя.

Как только визуально будет обнаружен микробный рост, флаконы следует асептически открыть; стерильной бактериологической петлей или пастеровской пипеткой взять небольшое количество бульона, приготовить окрашенный по Граму мазок и исследовать его на наличие микроорганизмов.

Субкультивирование осуществляют путем посева полной бактериологической петли проросшего бульона на соответствующую питательную среду.

- Грамотрицательные палочки: агар Мак-Конки, агар Клингера с железом, полужидкий агар для определения подвижности, продукция индола и уреазной активности, цитрат.
- Стафилококки: кровяной агар, солевой агар с маннитом.
- Стрептококки: кровяной агар с оптохином, бацитроцин и диски с теллуридом, агар с овечьей кровью для определения CAMP, желчно-эскулиновый агар.

Для рутинных исследований нет необходимости проводить инкубацию крови более 7 дней. В некоторых случаях инкубация может быть продолжена еще в течение 7 дней; это целесообразно, если имеется подозрение на наличие бруцелл или других весьма требовательных к питательным средам микроорганизмов, в случаях эндокардитов или если пациент получает антибиотики.

### "Слепое" культивирование и окончание культивирования

Рост некоторых микроорганизмов не сопровождается помутнением или другими видимыми изменениями бульона. Другие микроорганизмы, такие, как пневмококки, имеют тенденцию к аутолизу и быстро погибают. Для обнаружения таких микробов некоторые лаборатории проводят субкультивирование на шоколадном агаре путем инкубации посевов в течение 18—24 ч. "Слепое" субкультивирование может быть осуществлено по окончании 7-дневной инкубации путем переноса нескольких капель хорошо перемешанной кровяной среды (используя стерильную пастеровскую пипетку) в пробирку с тиогликолевым бульоном, который в свою очередь инкубируют и наблюдают в течение 3 дней.

### Антибиотикограмма

В тех случаях, когда в исследуемом материале предполагается наличие стафилококков или грамотрицательных палочек, драгоценное время для выбора эффективного антибиотика может быть сокращено путем постановки прямого нестандартного теста для определения антибиотикограммы. Для этих целей стерильный тампон помещают в пробирку с проросшим (помутневшим) бульоном, после чего этот смоченный в бульоне тампон используют для посева на среду Мюллера—Хинтона, как это предписано стандартной методикой (см. с. 95). Предварительный учет результатов может быть осуществлен через 6—8 ч инкубации посевов. В 95 % случаев результаты, полученные при использовании описанной методики, совпадают

с результатами стандартного метода определения чувствительности культур к антибиотикам.

## Контаминанты

Загрязнения крови посторонней микрофлорой можно избежать, тщательно обрабатывая кожу пациента и скрупулезно соблюдая правила асептики при выполнении всех лабораторных процедур. Тем не менее даже в идеальных условиях 3—5 % проб крови оказываются загрязненными посторонней микрофлорой, с кожи в кровь попадают *S.epidermidis*, *P.acnes*, *Clostridium* spp., *diphtheroides*, из внешней среды — *Acinetobacter*, *Bacillus* spp. Однако такие микроорганизмы иногда могут быть этиологическими факторами заболевания, даже таких, как эндокардиты. Для дифференциации истинной патогенетической роли микроорганизмов необходимо учитывать следующие факторы.

- Рост одного и того же микроорганизма в двух флаконах при посеве пробы крови от одного пациента.
- Обнаружение одного и того же микроорганизма в посевах двух и более проб крови.
- Быстрый рост микроорганизма (в течение 48 ч).
- Проявление одинаковых биологических свойств и профилей чувствительности к антибиотикам у разных изолятов, полученных из одной пробы крови.

Клиницистам следует сообщать обо всех выделенных из крови культурах, в том числе о возможных контаминантах. Однако для последних антибиотикограмма не требуется, а в отчете о результатах исследования необходимо указать, например, *Propionibacterium acnes* (комменсал кожи), *Staphylococcus epidermidis* (возможно, посторонняя микрофлора). Установление тесных взаимоотношений между лечащими врачами и персоналом лаборатории принесет пользу всем.

## Наиболее значимые в возникновении бактериемии и фунгиемии микроорганизмы и грибы

Грамотрицательные	Грамположительные
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Klebsiella</i> spp.	<i>S.epidermidis</i>
<i>Enterobacter</i> spp.	$\alpha$ -гемолитический стафилококк
<i>Proteus</i> spp.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Salmonella typhi</i>	<i>E.faecalis</i> (группа D)
<i>Salmonella</i> spp., отличные от <i>S. typhi</i>	<i>S.pyogenes</i> (группа A)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>S.agalactiae</i> (группа B)
<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Bacteroides fragilis</i> (анаэроб)	<i>Peptococcus</i> spp. (анаэробы)
<i>Brucella</i> spp.	<i>Peptostreptococcus</i> spp. (анаэробы)
<i>Pseudomonas pseudomallei</i> (в отдельных районах)	<i>Candida albicans</i> и другие дрожжеподобные грибы (например, <i>Cryptococcus neoformans</i> )

Выделение двух и более агентов может свидетельствовать как о полимикробной бактериемии, характерной для ослабленных пациентов, так и о контаминации пробы патогенной микрофлорой. “Анаэробная” бактериемия чаще обусловлена множественными патогенами; например, один или несколько анаэробов может быть ассоциирован с одним или несколькими аэробами при молниеносной бактериемии, связанной с тяжелой травмой или хирургическим вмешательством на толстом кишечнике.

# Спинномозговая жидкость

## Введение

Исследование спинномозговой жидкости (СМЖ) является одним из существенных этапов диагностики бактериальных или грибковых менингитов и должно рассматриваться в качестве приоритетного анализа, на который лабораторный персонал должен обращать повышенное внимание.

В норме СМЖ стерильна и прозрачна, в 1,0 мл содержится три или менее лейкоцитов, эритроциты отсутствуют. При менингеальных или церебральных воспалениях, таких, как менингиты или энцефалиты, химический и цитологический состав СМЖ подвергается изменениям.

В настоящем разделе обсуждаются лишь вопросы, касающиеся микробиологических исследований, хотя подсчет числа лейкоцитов в пробах СМЖ наравне с микробиологическими аспектами имеет первостепенное значение.

Наиболее важные этиологические агенты менингитов, с учетом возраста пациента, перечислены в табл. 5. Необходимо иметь в виду, что некоторые другие микроорганизмы также могут служить возбудителями этих заболеваний.

## Взятие и транспортировка проб

В две пробирки врач, применяя люмбальную или межпозвонокую пункцию, стерильно отбирает 5—10 мл СМЖ. Ввиду опасности ятрогенного инфицирования пациента перед пункцией соответствующий участок кожи должен быть тщательно продезинфицирован. Одну часть СМЖ следует использовать для химического и цитологического исследования, другую — для микробиологического анализа. Отобранные образцы СМЖ сразу же следует доставлять в лабораторию, где к их исследованию приступают немедленно, поскольку форменные элементы подвергаются быстрой дезинтеграции. Любая задержка может привести к уменьшению числа содержащихся в СМЖ клеток, что в свою очередь не позволит получить точного представления о реальной клинической картине.

**Таблица 5. Этиологические агенты бактериальных или грибковых менингитов**

Неонатальный период (от рождения до 2 мес) *Escherichia coli*

Другие энтеробактерии: *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp.

*Streptococcus agalactiae* (группа В)

*Listeria monocytogenes*

### Другие возрастные группы

*Haemophilus influenzae* (капсула типа b)<sup>a</sup>

*Neisseria meningitidis*

*Streptococcus pneumoniae*

*Mycobacterium tuberculosis*

*Listeria monocytogenes*<sup>b</sup>

*Cryptococcus neoformans*<sup>b</sup>

Стафилококки<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Нетипично для возраста старше 5 лет.

<sup>b</sup> При иммунодефицитах у пациентов, в том числе при СПИДе.

<sup>b</sup> В связи с нейрохирургическими вмешательствами или послеоперационными дренажами.

## Макроскопическое исследование

Полученную пробу СМЖ следует оценить визуально и описать, используя следующие определения: чистая, слегка мутная, мутная, гнойная, желтая или ксантохромная (в результате гемолиза или желтухи), кровянистая, с паутинкой фибрина или пленкой.

## Микроскопическое исследование

### Приготовление препаратов

Если предстоит исследование очень мутной пробы СМЖ, к ее анализу приступают немедленно, без предварительного центрифугирования. Во всех других случаях пробы СМЖ подвергают центрифугированию в стерильных пробирках (предпочтительно в конических пробирках с завинчивающимися крышками емкостью 15,0 мл) в течение 5—10 мин. Надосадочную жидкость отбирают стерильными пастеровскими пипетками (пипетирование осуществляют с помощью резиновой груши) и переносят в другую пробирку для химических и (или) серологических исследований, осадок используют для микробиологических исследований.

### Прямое микроскопирование

Под микроскопом (объектив  $\times 400$ ) исследуют осадок, поместив каплю на предметное стекло и накрыв сверху покровным стеклом. С помощью этого метода выявляют:

- лейкоциты (полиморфизм нейтрофилов или лимфоцитов);
- эритроциты;
- бактерии;
- дрожжи.

Если имеется подозрение на наличие дрожжеподобных грибов *Cryptococcus neoformans*, на предметном стекле следует смешать осадок (в объеме, равном содержимому бактериологической петли) с индийскими чернилами, сверху положить покровное стекло и исследовать под микроскопом на предмет выявления типичных, ннкапсулированных, сферических, почкующихся дрожжевых форм.

В регионах, где регистрируется африканский трипаносомоз, необходимо также исследовать препарат с целью выявления подвижных, активных члеников трипаносом.

Возбудителем редко встречающегося и обычно приводящего к летальному исходу вида менингита являются свободноживущие амобы (*Naegleria fowleri*), которых обнаруживают в воде; они проникают через нос и висцеруются в центральную нервную систему. Амобы можно обнаружить при прямом микроскопировании раздавленной капли в виде слабо подвижных организмов, по размеру аналогичных нейтрофильным лейкоцитам.

### Окраска препаратов по Граму

Поскольку этиологические агенты бактериальных менингитов часто обнаруживаются в окрашенных по Граму мазках, такое исследование весьма важно. Высушенный на воздухе мазок осторожно фиксируют на пламени горелки и окрашивают по Граму. Микроскопическое исследование проводят

при увеличении  $\times 1000$  (обязательно с использованием иммерсионно-масляного объектива) в течение по крайней мере 10 мин или пока бактерия не будет обнаружена. В табл. 6 суммированы важные диагностические признаки менингитов.

### Окраска кислотоустойчивых микроорганизмов (по Цилю—Нильсену)

Несмотря на то что этот метод не относится к высокочувствительным, исследование на наличие кислотоустойчивых микробов путем приготовления из осадочной жидкости мазка по Цилю—Нильсену является весьма показательным в том случае, если лечащим врачом заподозрен менингит туберкулезной этиологии. Приготовленный препарат в течение по крайней мере 15 мин внимательно исследуют под микроскопом. Если результат отрицательный, микроскопию следует повторить на следующий день со свежим анализом СМЖ.

### Культивирование

Если при микроскопическом исследовании были обнаружены микроорганизмы, СМЖ высевает на соответствующую питательную среду (табл. 7). Если микроорганизмы не обнаружены или микроскопия по Граму не дала четких результатов, желательно сделать посев СМЖ на полный набор питательных сред, включая кровяной агар с полосой *Staphylococcus aureus* для стимуляции роста *H. influenzae*. Кровяной агар и шоколадный агар, разлитые в чашки Петри, инкубируют при  $35^{\circ}\text{C}$  в присутствии двуокси углерода. Все среды инкубируют в течение 3 дней, ежедневно просматривая посевы.

Таблица 6. Диагностические признаки менингитов, обнаруживаемые в СМЖ

Признак	Тип менингита			
	бактериальный	туберкулезный	грибковый	вирусный (асептический)
Преобладание лейкоцитов определенного вида	Сегментированные полиморфно-ядерные нейтрофилы	Моноциты (юные нейтрофилы)	Моноциты	Моноциты
Концентрация глюкозы	Очень низкая 5—20 мг/100 мл	Низкая 20—40 мг/ 100 мл	Низкая 20—40 мг/ 100 мл	Нормальная 65—70 мг/100 мл
Содержание белка	Повышенное	Повышенное	Повышенное	Умеренно повышенное в ранней стадии болезни
Результаты исследования окрашенного мазка	Обычно наличие бактерий (мазок по Граму)	Редко положительный (кислотоустойчивые)	Обычно положительный (индийские чернила)	Отрицательный

В тех случаях, когда предполагается туберкулезный менингит, засевают по капле осадка (центрифугата) СМЖ по крайней мере в три пробирки с завинчивающимися крышками со средой Левенштейна—Йенсена, которые инкубируют в течение 6 нед. В течение первых 2—3 дней пробирки следует инкубировать в горизонтальном положении с крышками, открученными на пол-оборота. Проверку на наличие роста осуществляют ежедневно. При подозрении на наличие микробного роста из пробирки берут материал, из которого делают мазок на предметном стекле, высушивают на воздухе, фиксируют на пламени горелки и окрашивают по Цилю—Нильсену (все эти процедуры желательно проводить в специ-

Таблица 7. Выбор питательных сред для посева СМЖ на основе результатов окраски по Граму<sup>a</sup>

Питательная среда	Грамотрица- тельные палоч- ки у детей в неонатальном возрасте	Грамотрица- тельные палоч- ки у лиц других возрастных групп	Грамположи- тельные кокки у детей в нео- натальном воз- расте	Грамположи- тельные кокки у лиц других возрастных групп	Грамотрица- тельные кокки	Грамположи- тельные палочки	Микрооргани- змы не обнару- жены
Кровяной агар <sup>б</sup>	+	+	+	+ с дисками с оптохином	+	+	+
Кровяной агар с полоской с золотистым стафилококком <sup>б</sup>	+	+					+
Шоколадный агар <sup>б</sup>		(+)			(+)		(+)
Агар Мак-Конки	+	(+)					
Триптиказо-соевый бульон	+	+	+	+	+	+	+

<sup>a</sup> Условные обозначения: + — используется обязательно; (+) — используется выборочно.

<sup>б</sup> Инкубируют в присутствии CO<sub>2</sub> (свечной газ).

ально оборудованном помещении с соблюдением соответствующих мер предосторожности). Наличие кислотоустойчивых палочек согласуется с диагнозом туберкулеза. Все выделенные культуры следует направлять в центральную лабораторию для подтверждения и постановки тестов на чувствительность к антибиотикам.

В том случае, если имеется предположение на наличие *Cryptococcus neoformans*, основанное на результатах микроскопии мазка с индийскими чернилами и клинических данных, центрифугат следует посеять в две пробирки с агаром Сабуро с декстрозой и инкубировать при 35 °С до 1 мес. *C. neoformans* также растут на чашках с кровавым агаром, которые следует инкубировать при 35 °С в течение 1 нед.

### Предварительная идентификация

Рост на агаре Мак-Конки является основанием для предположения принадлежности культур к энтеробактериям; для их идентификации следует использовать методы и питательные среды, рекомендуемые для патогенных кишечных бактерий.

Колонии грамположительных кокков с узкой зоной  $\beta$ -гемолиза могут принадлежать *S. agalactiae* (стрептококки группы В). Это следует подтвердить постановкой САМП теста.

Плоские колонии с втянутым центром и умеренной зоной гемолиза зеленого цвета ( $\alpha$ -гемолиз) скорее всего являются колониями *S. pneumoniae*. Для подтверждения кладут диск диаметром 6,0 мм с оптохином на кровавый агар, на который была посеяна чистая культура исследуемого штамма. После суточной инкубации у пневмококков вокруг диска проявится зона ингибирования размером более 14 мм. Если результаты посева на первичном кровавом агаре не позволяют сделать окончательных выводов, этот тест следует повторить с использованием субкультуры.

Колонии *H. influenzae* будут расти только на шоколадном агаре и как колонии-сателлиты вблизи "стафилококковой полосы" на кровавом агаре. Последующая идентификация может быть завершена постановкой реакции агглютинации на стекле с антисывороткой *H. influenzae* типа "в".

Грамотрицательные диплококки, вырастающие на кровавом или шоколадном агаре и дающие положительную реакцию на оксидазный тест, могут рассматриваться как менингококки. Подтверждение получают путем постановки реакции агглютинации на стекле с соответствующими антисыворотками *N. meningitidis* (А, В, С). Отрицательные результаты реакции агглютинации — это еще не гарантия отсутствия менингококков, поскольку существуют по крайней мере еще четыре серогруппы этих микроорганизмов. Если результаты реакции агглютинации отрицательны, следует провести исследование на утилизацию углерода, а культуру направить в центральную справочную лабораторию. Предварительные результаты следует сообщать лечащим врачам после завершения каждого этапа идентификации (окраска по Граму, рост, агглютинация и др.), предупреждая, что последует окончательный результат.

Колонии грамположительных палочек, которые дают узкую зону  $\beta$ -гемолиза на кровавом агаре, могут быть колониями *Listeria monocytogenes*. К тестам, позволяющим получить подтверждение ожидаемых результатов, относятся положительная реакция на каталазу, подвижность в бульонной культуре или полужидком агаре, рост и обесцвечивание черных колоний на желчно-эскулиновом агаре.

## Определение чувствительности к антибиотикам

Для грамотрицательных палочек и стафилококков следует использовать стандартный дискодиффузионный метод (Керби—Бауэра).

Для *S.galactiae* или *N.meningitidis* определять чувствительность не требуется.

Все штаммы пневмококков должны быть исследованы на кровяном агаре в отношении чувствительности к хлорамфениколу и пенициллину. В настоящее время рекомендуется определять чувствительность к оксациллину с помощью дисков (содержание вещества 1,0 мкг в одном диске; см. раздел “Инфекции нижних отделов дыхательных путей”).

Штаммы *H.influenzae* следует исследовать на шоколадном агаре или дополнительно на кровяном агаре в отношении чувствительности к хлорамфениколу. Большинство ампициллинрезистентных штаммов продуцируют  $\beta$ -лактомазу, что может быть продемонстрировано путем постановки экспресс-анализа для скрининга  $\beta$ -лактомазопродуцирующих штаммов гонококков.

## Введение

Моча является объектом, наиболее часто предлагаемым для исследования на наличие микроорганизмов. При этом возникает множество проблем, связанных с правильным отбором проб, их транспортировкой, техникой культивирования и интерпретацией полученных результатов. Как и в отношении любых других направляемых в лабораторию проб, чем больше информации предоставит врач, направляющий пробу, тем легче будет лаборатории получить объективные и исчерпывающие результаты культивирования.

Большая часть инфекций мочевого тракта локализована в мочевом пузыре и уретре. Из этих органов инфекция может подниматься по уретре (уретрит) и впоследствии поражать почки (пиелонефрит). Женщины более склонны к инфицированию мочевого тракта, взятие проб мочи для исследования также представляет у них большие сложности.

Как у мужчин, так и у женщин инфекции мочевого тракта ИМТ могут протекать бессимптомно, остро или принимать хронический характер. Бессимптомное течение может быть диагностировано при выделении культур микроорганизмов. Острое течение инфекционных процессов наиболее часто наблюдается у женщин всех возрастов; такие пациенты, как правило, лечатся в условиях поликлиники и редко попадают в стационар. Хронические инфекционные процессы как у женщин, так и у мужчин всех возрастов ассоциируются обычно с вызывающими их заболеваниями (например, пиелонефриты, простатиты или врожденные аномалии мочевого тракта); такие пациенты, как правило, лечатся в условиях стационара. Бессимптомные, острые и хронические заболевания мочевого тракта являются совершенно различными состояниями, в связи с чем результаты лабораторных исследований мочи часто требуют различной интерпретации.

Бессимптомные пиелонефриты у женщин в течение определенного времени могут протекать нераспознанными и поддаются диагностике часто лишь при тщательном лабораторном исследовании большого количества мочи с выделением возбудителя. Хронические простатиты широко распространены и трудно поддаются лечению, они часто являются причиной повторных заболеваний мочевого тракта. Этиологическими агентами большинства инфекций мочевого тракта являются банальные кишечные бактерии; *Escherichia coli* выделяются из мочи чаще, чем любые другие микроорганизмы. Приблизительно у 10 % пациентов, страдающих заболеваниями мочевого тракта, в моче могут присутствовать два микроорганизма, оба из которых могут рассматриваться как возбудители заболевания. Наличие в моче трех или более различных микроорганизмов является серьезным основанием для предположения об ошибках при взятии проб мочи или последующих манипуляциях. Вместе с тем в моче пациентов с инфекциями мочевого тракта, которым установлен постоянный катетер мочевого пузыря, часто отмечается множество различных микроорганизмов.

## Взятие материала для исследования

Невозможно переоценить значение правильно выполненных отбора проб и доставки их в лабораторию, а также первоначального скрининга и культивирования проб в лаборатории. В обязанности лаборатории входит обеспечение лечащих врачей (которые будут отбирать пробы мочи) простерилизованными стеклянными или пластиковыми колбами, лаборатор-

ными стаканами, мерной посудой или другой подходящей лабораторной посудой. Все эти емкости до стерилизации должны быть хорошо укупленными или закрыты сверху коричневой бумагой, стерилизацию осуществляют путем обработки сухим жаром или автоклавированием.

Сбор проб мочи может быть осуществлен с помощью хирургической процедуры, например надлобковой пункции мочевого пузыря, цистоскопии или катетеризации. В других случаях лаборатория должна настаивать на сборе чистой средней порции мочи, особенно у женщин и детей. В связи с тем что моча сама по себе является хорошей питательной средой, все пробы следует доставлять в лабораторию в течение 2 ч после отбора или хранить в холодильнике при 4 °С до момента доставки в лабораторию и начала исследования, однако срок не должен превышать 18 ч.

Предпочтительно отбирать утренние порции мочи. Целесообразно попросить пациента накануне вечером воздержаться от мочеиспускания до взятия анализа.

## Женщины

Женщина в амбулаторных условиях должна выполнить следующие действия.

1. Тщательно вымыть руки с мылом и вытереть их чистым полотенцем.
2. Раздеться в специальной комнате, тщательно вымыть наружные половые органы, используя для этих целей марлевый тампон и теплую мыльную воду. Моют тело, перемещая тампон спереди назад.
3. Тщательно прополаскивают промежность теплой водой и высушивают стерильным марлевым тампоном. Во время этой процедуры большие половые губы должны быть разведены, к вымытым частям тела запрещается прикасаться руками.
4. Начинают мочеиспускание: первую порцию мочи не берут, оставшуюся собирают в стерильную емкость; как только сбор мочи закончен, сразу же закрывают емкость стерильной крышкой.
5. Закрытую емкость чистой средней порции мочи передают среднему медицинскому персоналу для быстрой доставки в лабораторию.

Для тяжелобольных (прикованных к постели) пациентов процедура должна быть аналогичной с той лишь разницей, что медицинская сестра должна оказывать помощь такому пациенту или, если необходимо, проделать всю процедуру, а затем попросить пациента начать мочеиспускание.

И в той и в другой ситуации усилия должны быть сосредоточены на том, чтобы обеспечить взятие чистой порции мочи в стерильную емкость и быструю доставку в лабораторию пробы и информации о пациенте, клиническом диагнозе, требуемом объеме исследования.

## Мужчины

Мужчина в амбулаторных условиях должен выполнить следующие действия.

1. Вымыть руки.
2. Оттянуть назад крайнюю плоть (если она не обрезана) и выпустить небольшое количество мочи.
3. Продолжая оттягивать крайнюю плоть назад, направить струю мочи в стерильную емкость. Это и есть средняя порция мочи.
4. Емкость закрывают сверху крышкой и передают среднему медперсоналу для ее безотлагательной доставки в лабораторию.

У тяжелобольных (прикованных к постели пациентов) процедура выполняется следующим образом.

1. Если необходимо, медицинская сестра должна оттянуть крайнюю плоть больного назад, вымыть водой с мылом и вытереть стерильной салфеткой головку полового члена.
2. Оттянув назад крайнюю плоть, пациенту следует выпустить небольшое количество мочи в мочеприемник.
3. Затем пациент должен направить струю мочи в стерильную емкость. Емкость закрывают крышкой и доставляют в лабораторию.

### Новорожденные и дети

Сбор чистой порции мочи у новорожденных и детей, которые больны и находятся в постели или ничем не могут помочь, сложная процедура. Следует дать ребенку попить воды или другой жидкости, пригодной для питья. Чисто вымыть наружные половые органы ребенка. Можно усадить ребенка на колени матери, медицинской сестры или дежурного по палате, который затем отберет мочу ребенка в стерильную емкость в требуемом количестве. Контейнер следует закрыть крышкой и быстро доставить в лабораторию для безотлагательного исследования мочи.

### Культивирование и интерпретация результатов

Все пробы мочи, доставленные в микробиологическую лабораторию, необходимо незамедлительно исследовать или поместить в холодильник при 4 °С до тех пор, пока с ними не начнут работать. Методика исследования мочи включает следующие этапы.

1. Приготовление мазков и окраска их по Граму.
2. Скрининг проб при выраженной бактериурии.
3. Окончательное культивирование проб мочи, результаты скрининга которых оказались положительными (этап 2), а также культивирование всех проб мочи, полученных с помощью цистоскопии, надлобковой пункции мочевого пузыря или катетеризации.
4. Определение чувствительности к антибиотикам для клинически значимых культур.

Приготовление и микроскопия окрашенного по Граму мазка является необходимым составным элементом лабораторного исследования. Используя стерильную пастеровскую пипетку (отдельно для каждой пробы), наносят каплю хорошо перемешанной нецентрифугированной мочи на предметное стекло. Дают капле высохнуть на воздухе без использования пламени горелки, затем окрашивают. Проводят микроскопическое исследование с использованием масляно-иммерсионного объектива для определения наличия или отсутствия микроорганизмов, полиморфно-ядерных лейкоцитов и слущенных эпителиальных клеток.

Одна или более бактериальных клеток в одном поле зрения микроскопа всегда свидетельствует о наличии  $10^5$  или более микроорганизмов в 1,0 мл исследуемого образца. Наличие одного или более лейкоцитов в одном поле зрения микроскопа является характерным индикатором инфекции мочевого тракта. В моче здорового человека во всем мазке обнаруживается лишь несколько бактериальных клеток или лейкоцитов либо не обнаруживается их совсем. В мазках из мочи, взятой у женщин, наличие большого числа слущенного эпителия независимо от того, обнаружены или не обнаружены любые бактериальные клетки, является очень серьезным предположением о бактериальной контаминации мочи влагалищной микрофлорой, в связи

с чем необходимо взять на исследование повторную пробу мочи независимо от числа бактерий в одном поле зрения микроскопа. Если ответ требуется срочно, можно направить лечащему врачу сообщение о результатах, полученных при исследовании мазка, окрашенного по Граму, с указанием, что в дальнейшем будут представлены результаты о полученных культурах.

### Метод скрининга

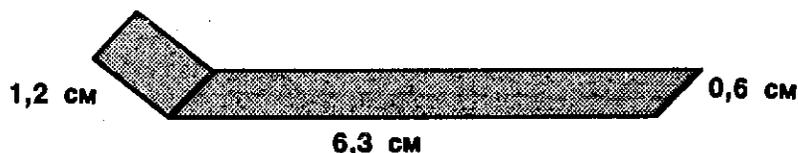
Отсутствие лейкоцитов и микроорганизмов в мазке, окрашенном по Граму и исследованном, как описано выше, является хорошим свидетельством того, что моча не инфицирована. Пробы мочи, которые дали отрицательные результаты при внимательном микроскопическом исследовании полученного из них и окрашенного по Граму мазка, не нуждаются в дальнейшем культивировании. Альтернативным и эффективным методом при этом является бумажный тест эстеразно-нитратной редукции лейкоцитов. Бумажную полоску (индикаторная бумажка) опускают в исследуемую мочу в соответствии с прилагаемой инструкцией. Приобретение розовой окраски считается положительной реакцией, свидетельствующей о присутствии лейкоцитной эстеразы и(или) наличии бактерий в количестве  $10^5$  в 1,0 мл. Пробы мочи, которые дали положительные результаты при постановке этого теста, следует как можно быстрее подвергнуть бактериологическому исследованию путем культивирования, чтобы предотвратить чрезмерный рост не имеющей этиологического значения микрофлоры. Если индикаторная бумажка не окрасилась в розовый цвет, результаты скрининга оценивают как отрицательные, об этом сообщают лечащему врачу, указав, что бактерии не обнаружены. Этот метод может оказаться недостаточно чувствительным, чтобы выявить менее  $10^5$  бактерий в 1,0 мл мочи.

### Комбинированное количественное культивирование и предварительная идентификация

Для количественного культивирования можно рекомендовать метод Лея—Вильямса<sup>1</sup> с использованием полосок фильтровальной бумаги, который предусматривает применение двух питательных сред для предварительной идентификации. Метод основан на адсорбции и последующем переносе определенного (фиксированного) количества мочи на соответствующую плотную питательную среду.

Полоски длиной 7,5 см и шириной 0,6 см вырезают из специальной фильтровальной бумаги (рис. 3). С одного конца на них наносят карандашом метку на расстоянии 1,2 см. Необходимое количество полосок помещают в контейнер и автоклавируют. Стерильные бумажные полоски, выпускаемые под названием Bacteruritest, можно получить, направив заказ в Mast Laboratories (Booth, Merseyside, England). Для каждой исследуемой пробы мочи из контейнера вынимают стерильную полоску. Промаркиро-

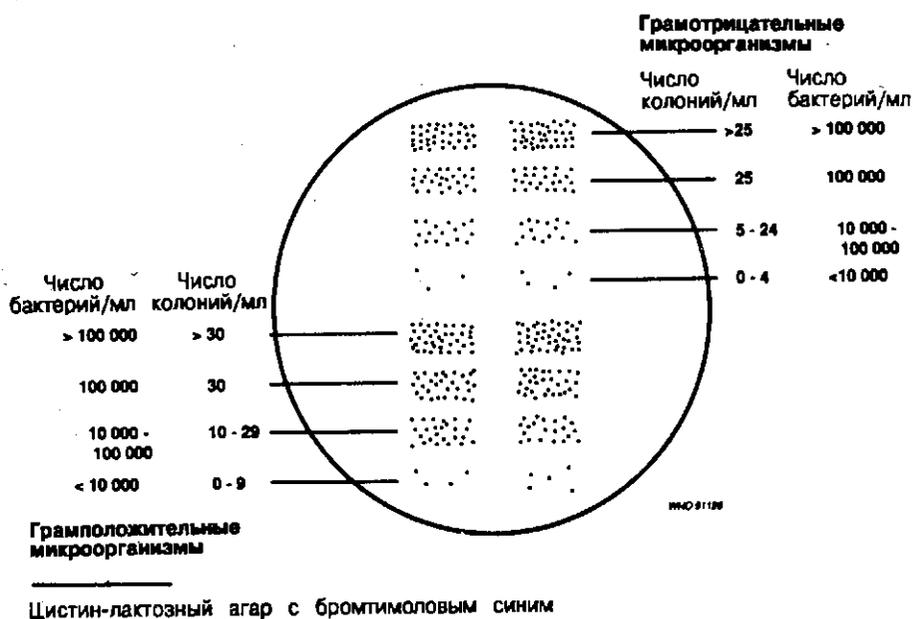
Рис. 3. Диаграмма бумажной полоски



ИЮ 81125

<sup>1</sup> Leigh, D.A. and Williams, J.D. Method for the detection of significant bacteriuria in large groups of patients. *Journal of clinical pathology*, 17: 498-503 (1964).

Рис. 4. Схема посева мочи с помощью бумажных полосок на чашку с агаром и пересчет числа выросших колоний для получения показателя "концентрация бактерий в 1 мл мочи"



ванный карандашом конец полоски опускают в образец хорошо перемешанной мочи на глубину 1,2 см — до метки. Полоску сразу же извлекают из пробы, дают возможность излишнему количеству мочи адсорбироваться.

Часть полоски, расположенную выше намоченного участка бумаги, следует отогнуть наподобие ступни или буквы "L", затем поместить на 2—3 см на поверхность агара бралацин<sup>1</sup> или агара с пурпурным красным. Несколько полосок можно культивировать на одной чашке, разделенной на 16 прямоугольников (рис. 4). Чтобы не перепутать результаты, на каждом прямоугольнике (со стороны дна чашки Петри), следует написать номер или фамилию пациента, моча которого исследуется. Следует вынуть вторую стерильную полоску фильтровальной бумаги из контейнера и абсолютно точно повторить все операции, описанные выше. Чашку, на которую были помещены полоски, пропитанные мочой, инкубируют при температуре 35—37 °С, количество выросших колоний от каждой полоски записывают. С помощью схемы, представленной на рис. 4, можно вычислить среднее количество колоний для каждой пары полосок и пересчитать содержание микроорганизмов в 1,0 мл мочи.

Немедленно после завершения описанной процедуры, используя стерильную бактериологическую петлю, на полчашки с агаром Мак-Конки засевают пробу мочи. Добавление кровяного агара в число сред, на которые засевают мочу, способствует быстрой идентификации грамположительных кокков. Посевы инкубируют при температуре 35—37 °С в течение суток, после чего учитывают рост микроорганизмов. Для идентификации берут отдельные колонии, которые визуально похожи друг на друга. Если необходимо провести определение чувствительности к антибиотикам, колонии для

<sup>1</sup> Цистинлактозный агар с бромтимоловым голубым.

посевов берут с тех же чашек. При таком подходе к исследованию результаты тестов на идентификацию и чувствительность к антибиотикам будут готовы на следующий день.

## Оценка результатов количественного определения микроорганизмов в моче

В течение многих лет считалось, что только наличие не менее  $10^5$  бактерий в 1,0 мл чисто взятой средней порции мочи может считаться убедительным лабораторным подтверждением диагноза инфекции мочевого тракта. Недавно это положение было поставлено под сомнение: некоторые эксперты полагают, что выявление  $10^4$  или даже менее микроорганизмов в 1,0 мл мочи является адекватным индикатором инфекции. Другие считают, что наличие полиморфно-ядерных лейкоцитов играет важную роль в патологии и клинических проявлениях инфекций мочевого тракта. Существует также случай бессимптомного течения инфекции, когда в моче пациентов имеются или отсутствуют лейкоциты, однако у них, несомненно, отмечается значительная бактериурия. Невозможно с высокой степенью вероятности установить минимальное число бактерий в 1 мл мочи, которое является неоспоримым свидетельством инфекции мочевого тракта, так же как нельзя считать неоспоримым признаком инфекции присутствие в моче лейкоцитов. Ниже приведены общие рекомендации относительно оценки результатов количественных тестов.

- Категория 1.** Обнаружение менее  $10^4$  бактерий в 1,0 мл мочи свидетельствует о *"вероятном отсутствии"* инфекции мочевого тракта. (Исключение: присутствие менее  $10^4$  бактерий в 1,0 мл мочи, взятой непосредственно из мочевого пузыря путем надлобковой пункции или цистоскопии. В этом случае сообщают данные о результатах тестов по идентификации культуры и чувствительности к антибиотикам.)
- Категория 2.** Обнаружение  $10^4$ — $10^5$  бактерий в 1,0 мл. Если у пациента отсутствуют проявления заболевания, необходимо взять еще один анализ и повторить подсчет бактерий. Когда у пациента отмечаются симптомы инфекции мочевого тракта, проводят как идентификацию, так и определение чувствительности культуры к антибиотикам, если на питательных средах обнаружен рост одного или двух разных типов колоний. Наличие такого количества бактерий в моче является серьезным основанием для предположения о наличии инфекции мочевого тракта у пациентов с симптомами болезни или лейкоцитурией, когда количество микробов, качество пробы мочи или особенности течения заболевания вызывают сомнения, следует получить другую пробу мочи для повторного исследования.
- Категория 3.** Обнаружение более  $10^5$  бактерий в 1,0 мл мочи. Лечащему врачу сообщают об обнаруженном количестве микроорганизмов; если из мочи выделены колонии одного или двух разных типов, проводят идентификацию бактерий и определяют чувствительность к антибиотикам. Обнаружение такого количества микроорганизмов является серьезным основанием для предположения о наличии инфекции мочевого тракта у всех пациентов, включая женщин без симптомов заболевания.

В тех случаях, когда в пробе мочи обнаруживается более двух видов

микроорганизмов, в категориях 2 и 3 результаты оценивают как "подозрение на контаминацию мочи посторонней микрофлорой" и просят "Направить для исследования свежую чисто взятую пробу мочи".

## Идентификация

Идентификацию следует проводить как можно быстрее. Поскольку подавляющее большинство инфекций мочевого тракта вызывают *E.coli*, следует выполнить ускоренный тест для идентификации колоний красного цвета, выросших на агаре Мак-Конки.

### Тест для определения $\beta$ -глюкуронидазы для быстрой идентификации *E.coli*<sup>1</sup>

1. Готовят высококонцентрированную (как молоко) суспензию микроорганизмов для исследования в маленькой пробирке, содержащей 0,25 мл солевого раствора. Суспензию готовят из колоний, выросших на агаре Мак-Конки.
2. Добавляют одну таблетку 4-нитрофенил- $\beta$ -D-глюкопиранозидовой кислоты для определения  $\beta$ -глюкуронидазной активности. Пробирку закрывают пробковой крышкой и интенсивно встряхивают в течение нескольких секунд.
3. Пробирку инкубируют при 35—37 °C в течение 4 ч.
4. Появление желтого цвета надосадочной жидкости свидетельствует о положительной реакции на *E.coli*.

## Определение чувствительности к антибиотикам

Тест на определение чувствительности (см. с. 88) выполняют только на хорошо изолированных колониях одного типа, которые в свете изложенных выше соображений могут являться этиологическим агентом. Определение чувствительности к антибиотикам в целом более важно для культур, выделенных от госпитализированных пациентов или от пациентов, имевших рецидивы инфекции мочевого тракта. Для культур, выделенных от пациентов с первичной инфекцией мочевого тракта, определения чувствительности к антибиотикам может не потребоваться.

<sup>1</sup> Killian, M. and Bülow, P. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. *Acta pathologica et microbiologica scandinavica*, Section B, 84: 245—251 (1976).

## Введение

Пробы кала могут потребовать химических, бактериологических, вирусологических и паразитологических исследований. Иногда возникают проблемы, связанные со взятием и транспортировкой проб кала, и тогда следует использовать ректальные тампоны. Проба, аккуратно отобранная с помощью ректального тампона, является предпочтительной для выделения бактерий, обитающих в слизи толстого кишечника (это особенно важно для шигелл).

## Взятие проб кала

Взятие проб кала должно осуществляться на ранних этапах болезни, до начала лечения антибиотиками, пока патогенные микробы содержатся в стуле в большом количестве. Кал отбирают в стерильный сосуд соответствующего размера с плотно закрывающейся, исключающей возможность загрязнения окружающей среды пробкой. Со взятым материалом следует начать работу как можно быстрее после доставки его в лабораторию, по крайней мере не позже чем через 2 ч после взятия. Если невозможно приступить к исследованию в течение 2 ч, следует отобрать небольшое количество материала с помощью тампона, который помещают внутрь каловых масс и слегка поворачивают. Затем его следует поместить в соответствующую транспортную среду вместе со слизью и частицами эпителия, если они имеются. Подходящей транспортной средой для всех энтеропатогенных бактерий является среда Кери—Блера, для вибрионов — щелочная пептонная вода.

## Взятие материала с помощью ректальных тампонов

Для взятия материала могут быть использованы тампоны с ватными наконечниками. Если тампоны готовятся на месте, следует быть уверенными, что ватный наконечник плотно прикреплен к аппликатору.

Тампон должен быть увлажнен стерильной жидкостью, не обладающей бактериостатическим эффектом, или транспортной средой (но не масляным гелем), его вводят per rectum, поворачивают и вынимают. После этого следует посмотреть, появилась ли на тампоне фекальная окраска. Число ректальных тампонов зависит от специфики требуемых исследований. Тампоны могут быть также использованы для микроскопических исследований на наличие простейших, однако для этого необходим только свежесобраный материал.

В том случае, когда к исследованию материала приступают в течение 2 ч, тампон следует поместить в сухую пустую пробирку, которую закрывают или ватной пробкой, или завинчивающейся крышкой. Если исследование проб будет начато более чем через 2 ч, тампон необходимо поместить в транспортную среду.

## Исследование проб кала

Безотлагательно исследуют доставленную пробу кала визуально для определения:

— консистенции (оформленный, жидкий);

- цвета (белый, желтый, коричневый, черный);
- наличия нехарактерных включений (слизь, кровь, паразиты).

Микроскопическое исследование проводят для определения:

- паразитов;
- лейкоцитов;
- нехарактерных включений (кровь, слизь, жир).

Образец также необходимо исследовать на наличие патогенных кишечных бактерий. Посев на питательные среды следует производить как можно быстрее после получения лабораторией материала. Безотлагательный посев особенно информативен в отношении шигелл и кампилобактеров. Если невозможно произвести посев каловых масс безотлагательно, образцы хранят при температуре 4 °С.

Существует несколько подходящих питательных сред с различной селективностью, которые позволяют получить рост определенных микроорганизмов; среди них можно выбрать среду, на которой вырастают как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. Такая среда позволяет также дифференцировать различные роды бактерий морфологически.

Чашки с агаром могут быть засеяны материалом, взятым непосредственно с фекального или ректального тампона, при этом посев может быть как легким, так и плотным, в зависимости от вида используемой питательной среды. Вместе с тем, когда материал засевают более чем на три чашки, полезно приготовить фекальную суспензию на физиологическом растворе. Посев суспензии осуществляют с помощью бактериологической петли, что позволяет нанести небольшое количество органического материала, поскольку излишне большое количество может исказить вид появляющихся колоний.

### Приготовление фекальной суспензии

Кал суспендируют с фекального или ректального тампона в пробирке, содержащей 1,0 мл стерильного физиологического раствора (1,0 мл на тампон). Тампон тщательно промывают в физиологическом растворе путем вращения пробирки между ладонями в одну и в другую сторону, что ускоряет вымывание бактерий.

Из оформленных каловых масс берут небольшую часть и суспендируют в физиологическом растворе, чтобы получить непрозрачную суспензию. В жидкие каловые массы нет необходимости добавлять физиологический раствор.

### Посев на плотные питательные среды

Для таких микроорганизмов, как шигеллы, сальмонеллы, кишечная палочка, йерсиния энтероколитика, следует использовать два вида питательных сред: слабоселективные (например, агар Мак-Конки) и высокоселективные (например, дезоксихолатцитратный агар или ксилоза-лизин-дезоксихолатный агар). Для культивирования кампилобактеров используются специально разработанные селективные питательные среды (например, агар Мюллера—Хинтона с 5 % бараньей крови и др.). Большинство штаммов вибрионов растут на агаре Мак-Конки, хотя более предпочтительными являются такие селективные среды, как тиосульфат-цитрат-желчно-солевая (ТСВ), сахарозный агар, щелочно-солевой агар (ВСА) и теллурит-таурохолат-желатиновый агар (ТТВ).

# Инфекции нижних дыхательных путей

## Введение

Инфекции нижних дыхательных путей — это инфекции, возникающие на уровне ниже глотки, т.е. в трахее, бронхах или легочной ткани (трахеиты, бронхиты, легочные абсцессы, пневмонии). Иногда при пневмонии в процесс вовлекается плевра, в результате чего возникает ее поражение (плеврит), иногда в плевральной полости может образоваться жидкость (плевральный выпот).

Специфической инфекцией нижних дыхательных путей является туберкулезная пневмония, которая весьма широко распространена во многих странах. При кашле больного образуется аэрозоль, содержащий *Mycobacterium tuberculosis*, который может попасть в дыхательные пути здорового человека. Такая форма болезни ("открытый" туберкулез) очень легко передается от больного к здоровому человеку и поэтому считается очень серьезным инфекционным заболеванием.

У многих больных с инфекциями нижних дыхательных путей при кашле выделяется гнойная (содержащая гной) мокрота, обычно зеленого или желтоватого цвета, которая может быть подвергнута культивированию, а также исследована макро- или микроскопически.

Существуют инфекции, при которых выделяется либо небольшое количество мокроты, либо ее вообще не выделяется: легионеллез (вызванный *Legionella pneumophila*) и пневмония, вызванная *Mycoplasma pneumoniae* ("первичная атипичная пневмония"). Для диагностики этих двух заболеваний требуется специальная техника, поэтому вопросы, связанные с указанными инфекциями, в дальнейшем обсуждаться не будут. Помимо туберкулезной пневмонии (см. ниже), особое внимание необходимо обращать на микроскопическое исследование и культивирование мокроты пациентов, страдающих инфекциями дыхательных путей, при которых выделяется гнойная мокрота.

## Наиболее распространенные инфекции

### Острые и хронические бронхиты

У больных, страдающих *острыми бронхитами* (обычно появляющимися вслед за вирусными инфекциями, такими, как простуда или грипп), мокроту обычно не подвергают культивированию, за исключением случаев, когда у пациента не обнаруживаются клинических признаков улучшения состояния.

*Хронические бронхиты* — длительно протекающие тяжелые заболевания с периодическими обострениями. Большинство пациентов ежедневно выделяют с кашлем мокроту обычно серого цвета, содержащую слизь; бывают случаи, когда состояние больного начинает ухудшаться, и с кашлем при этом выделяется гнойная мокрота. Это стадия обострения хронического бронхита. Типичные патогены дыхательных путей (*Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, реже *Branhamella catarrhalis*) часто обнаруживаются в анализах мокроты.

### Легочный абсцесс

Абсцесс в легком может образоваться после вдыхания инородного тела, содержимого желудка, секрета верхних дыхательных путей (рта или горла).

Иногда это заболевание называют аспирационной пневмонией. Можно попытаться провести культивирование мокроты (которая часто имеет очень сильный неприятный запах), однако, если абсцесс (зафиксированный рентгенографически) содержит гной, следует провести и микроскопическое исследование, и культивирование. К сожалению, в медицине нет единой точки зрения относительно способа забора гноя, однако прямая пункция и "откачивание" являются одним из возможных способов. Анаэробные микроорганизмы, такие как *Bacteroides melanipogenicus*, *Peptococcus* spp. и *Peptostreptococcus* spp., содержащиеся обычно во рту или глотке, очень часто являются важными этиологическими агентами. Взятие гноя, его транспортировку и исследование проводят с помощью стандартных методов для анаэробного культивирования гноя (см. с. 76 и с. 82—87).

### Пневмония и бронхопневмония

Острая долевая пневмония всегда поражает одну долю легкого. Это заболевание почти всегда вызывает *S.pneumoniae*, и взятая в это время кровь часто позволяет выявить наличие этого микроорганизма. Эта форма болезни очень редко вызывает эпидемии. Редкие случаи сходных форм пневмонии вызываются *Klebsiella pneumoniae*.

Классическая форма пневмонии отмечается лишь у небольшой части пациентов, инфицированных *S.pneumoniae* или *K.pneumoniae*, чаще выявляется такая форма болезни, как бронхопневмония с участками инфильтрации и воспаления (называемыми "сочетанными"), распространяющимися в одном, а чаще сразу в обоих легких.

Бронхопневмония может быть вызвана множеством различных видов вирусов и бактерий. Помимо *S.pneumoniae* и иногда *H.influenzae*, бронхопневмонию может вызывать *Staphylococcus aureus*, особенно во время эпидемий гриппа или кори. Часто обнаруживаются грамотрицательные палочки (особенно *E.coli* и *K.pneumoniae*) и *P.aeruginosa*. Эти инфекции весьма часто встречаются в отделениях интенсивной терапии, особенно там, где широко применяются антибиотики широкого спектра действия или используются технические средства искусственной вентиляции легких, и являются свидетельством беспорядочного применения антибиотиков и недостаточного внимания к пациенту на ранних стадиях болезни.

Если в плевральной полости имеется выпот, жидкость следует исследовать под микроскопом и подвергнуть культивированию в соответствии с методикой, описанной для гноя и экссудата.

### Туберкулез легких

Мокрота больных туберкулезом легких обычно не содержит большого количества гноя, однако это не может служить основанием для отказа от исследования на туберкулез. Мазок, окрашенный по Цилю—Нильсену, следует просмотреть под микроскопом и немедленно выявить пациентов, в мокроте которых обнаружены кислотоустойчивые палочки<sup>1</sup>. Приготовив окрашенный мазок, мокроту следует подвергнуть деконтаминации (см. с. 49) для того, чтобы уничтожить основную массу нетуберкулезных бактерий и оставить жизнеспособными микобактерии, после этого мокрота готова для культивирования на среде Левенштейна—Йенсена.

Поскольку методики бактериологического исследования для диагностики гнойных инфекций дыхательных путей, таких, как бронхиты и пневмонии,

<sup>1</sup> *Manual of basic techniques for a health laboratory*, Geneva, World Health Organization, 1980.

кардинально отличаются от методик диагностики болезней туберкулезной этиологии, они будут рассмотрены отдельно. Лечащий врач, направляющий в лабораторию мокроту, должен очень четко сообщить, какие микроорганизмы он рассчитывает выявить:

- пиогенные бактерии (*H. influenzae*, *S. pneumoniae* и др.);
- туберкулезные бактерии (*M. tuberculosis*);
- оба типа бактерий.

### Взятие проб мокроты

Правильно выполненный забор пробы мокроты само по себе искусство; он описан в других книгах<sup>1</sup>. Исследование неаккуратно взятой пробы может дать ложноположительные результаты из-за контаминации нормальной микрофлорой рта и горла; "мокрота", содержащая слюну и частицы пищи, не подлежит исследованию.

Мокроту следует собирать в стерильную широкогорлую емкость с плотно закрывающейся крышкой и отсылать в лабораторию без промедления. Если после отбора мокроты дать ей постоять, это может привести к чрезмерному росту контаминирующей флоры до начала исследования, поэтому результаты микроскопического исследования и культивирования могут ввести в заблуждение. В связи с этим обычно не разрешается пересылать пробы мокроты в лабораторию по почте. Исключением являются пробы мокроты для исследования на туберкулез, которые может оказаться необходимым направить в районную или региональную лабораторию. При этом необходимо строго соблюдать местные и национальные правила почтовой пересылки инфекционного (патогенного) материала.

### Методика исследования мокроты в лаборатории (для выявления инфекций нетуберкулезной этиологии)

Нельзя позволять хранить пробу до начала исследования при комнатной температуре более 1 ч.

### Макроскопическое исследование

Необходимо описать макроскопические характеристики мокроты. Описание может включать такие характеристики, как:

- гнойная зеленая;
- гнойная желтая;
- слизисто-гнойная (т.е. частично гнойная, частично слизистая);
- с прожилками крови;
- с прожилками крови и зелеными включениями;
- \*серая слизистая;
- \*серая пенная;
- \*белая слизистая;
- \*белая пенная;
- \*белая слизистая с частицами пищи;
- \*водянистая (т.е. присутствует лишь слюна);
- \*водянистая с частицами пищи.

Пробы мокроты, отмеченные звездочкой, обычно не подвергаются исследованию на наличие инфекции нетуберкулезной этиологии.

<sup>1</sup> См., например, *Manual of basic techniques for a health laboratory*, Geneva, World Health Organization, 1980; *Technical guide for sputum examination for tuberculosis by direct microscopy*, *Bulletin of the International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases*, Suppl. 2, 1978.

## Микроскопическое исследование

Пробу гнойной или гнойно-слизистой мокроты используют для приготовления мазка, который окрашивают по Граму.

Если не наблюдаются включения гноя (например, в слизистой мокроте серого цвета) в мазке, окрашенном по Граму, могут быть обнаружены лишь большие, прямоугольной формы, спущенные эпителиальные клетки, часто сплошь покрытые бактериальными клетками. Это свидетельствует о том, что мокрота содержит в основном секреты ротовой полости и глотки, культивирование такой пробы неуместно, поскольку результаты будут сомнительными. В соответствии с общепринятыми рекомендациями следует отказаться от культивирования образцов мокроты, которые содержат менее 10 полиморфно-ядерных нейтрофилов на одной эпителиальной клетке<sup>1</sup>. Результаты срочного микроскопического исследования окрашенного по Граму мазка гнойной мокроты, полученной от больных острыми респираторными заболеваниями (например, пневмонией), во многих случаях могут послужить клиницистам руководством для выбора antimicrobial терапии. Ниже приведены возможные варианты ответов.

- Грамположительные диплококки, окруженные пространством из непрокрашенных капсул (предположительно *S.pneumoniae*).
- Мелкие грамотрицательные кокки (возможно, *H. influenzae*).
- Грамотрицательные диплококки, интрацеллюлярно или экстрацеллюлярно (предположительно *B.catarrhalis*).
- Грамположительные кокки в виде виноградной грозди (предположительно *S.aureus*).
- Грамотрицательные палочки (предположительно энтеробактерии или *Pseudomonas* spp.).
- Большие грамположительные дрожжеподобные клетки, часто с мицелием (предположительно *Candida* spp.).

## Методика культивирования и интерпретация результатов

Отбирают хлопьевидные включения из пробы гнойной мокроты (или из материала, более всего приближенного к гнойной мокроте) и высевают на различные твердые питательные среды (см. ниже).

Рекомендуемый набор питательных сред для культивирования.

- Кровяной агар с диском с оптохином в центре питательной среды.
- Шоколадный агар (или селективный кровяной агар для *H.influenzae*<sup>2</sup>).
- Агар Мак-Конки.

<sup>1</sup> Heineman, H.S., Radano, R.R. Acceptability and cost savings of selective sputum microbiology in a community teaching hospital. *Journal of clinical microbiology*, 10: 567—573 (1979).

<sup>2</sup> Питательную среду готовят следующим образом:

колумбийский агар (основа) — 43 г  
дистиллированная вода — 1000 мл

Среду разливают во флаконы емкостью 100 мл, закрывают пробками, автоклавируют при 120 °С в течение 15 мин. Более жесткого режима автоклавирования следует избегать. Для использования среду нагревают до 100 °С для расплавления агара, а затем остуживают до 56 °С. В эту среду добавляют (на 100,0 мл):

дефибринированную лошадиную кровь — 8,0 мл  
раствор бацитрацина (200 ЕД/мл) — 2,5 мл  
ростовую добавку — 1,0 мл

Ростовой добавкой может служить: добавка VX (Difco 3354, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), VITOX (Oxoid SR 90 Oxoid Ltd., Basingstoke, England), IsoVitale X (BBL Microbiology Systems Division, Becton and Dickinson and Co., Cockeysville, MD, USA) или PolyViteX (Biomérieux, Marcy l'Étoile Charbonnières-les-Bains, France). После тщательного перемешивания среду разливают в чашки (15 мл среды на чашку Петри диаметром 9,0 см). Большинство штаммов комменсалов верхних дыхательных путей неспособны расти на этой среде, но *Haemophilus* spp. растут прекрасно. Рост грамотрицательных кишечных палочек и грибов не подавляется.

Посевы на кровяном и шоколадном агаре инкубируют при 35—37 °С в атмосфере с избыточным содержанием углекислого газа (например, свечной газ), чашки с посевами на агар Мак-Конки инкубируют на воздухе в нормальных условиях.

Для проб мокроты, в которых при окрашивании по Граму обнаружены грамположительные кокки в виде виноградной грозди, культивирование предпочтительно проводить на маннитолсолевом агаре. Наличие в окрашенном мазке грамположительных дрожжеподобных структур служит основанием для высева проб мокроты в пробирки с агаром Сабуро с декстрозой, которые инкубируют при 35—37 °С по крайней мере в течение 3 дней. При проведении рутинных исследований проб мокроты нет необходимости выполнять посевы всех проб на маннитолсолевой агар и агар Сабуро с декстрозой.

Посевы следует проверить после 18-часовой инкубации, однако, если рост оказался менее выраженным, чем ожидалось по результатам микроскопического исследования, или если выросли только очень мелкие колонии, может потребоваться дополнительная 24-часовая инкубация.

В результате культивирования обычно выявляются следующие объекты.

- Плоские, бесцветные колонии с вогнутым центром и зоной зеленого ( $\alpha$ ) гемолиза, также как и зоны задержки роста вокруг диска с оптохином могут быть образованы *S. pneumoniae*. Если учет результатов теста с оптохином на первичных агаровых средах затруднителен, тест следует повторить с использованием субкультуры. Необходимо помнить, что другие  $\alpha$ -гемолитические колонии (так называемые зеленящие стрептококки) являются представителями нормальной микрофлоры рта и глотки.
- Очень мелкие подобные дождевым каплям колонии, растущие как негемолитические колонии-спутники на кровяном агаре, и значительно более крупные прозрачные колонии на шоколадном или обогащенном кровяном агаре предположительно образованы *H. influenzae*. Такие колонии обычно присутствуют в большом количестве, обычно более 20 на чашку. Некоторые лаборатории предпочитают подтверждать результаты путем постановки тестов на X- или Y-зависимые факторы, однако эти тесты необходимо тщательно контролировать и в их постановке нет особой необходимости. Серологическое типирование штаммов из дыхательных путей часто бесполезно, поскольку большинство из них "дикие" и не поддаются типированию.
- Хрупкие, сухие, сероватые колонии как на кровяном, так и на шоколадном агаре могут свидетельствовать о наличии *B. catarrhalis*. Можно поставить пробы на деградацию сахаров (все пробы отрицательны), однако большинство лабораторий этого не делают. Все микроорганизмы рода *Branhamella* обладают выраженными оксидазоположительными свойствами, и этот признак является весьма характерным для выросших колоний.
- Колонии среднего размера с золотистым оттенком характерны для *S. aureus*. Результаты коагулазного теста и теста на ферментацию маннитола положительны, хотя результаты коагулазного теста на стекле ("связанный" коагулазный тест) иногда отрицательны. Если имеется несоответствие между внешним видом колоний и результатами теста на стекле, следует поставить коагулазный тест в пробирке ("свободная" коагуляция).
- Колонии на агаре Мак-Конки предполагают наличие микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, или *Pseudomonas* spp. или *Acinetobacter*. Эти микроорганизмы часто не имеют клинической значимости.
- Белесые, круглые "волосистые" колонии на кровяном или шоколадном агаре могут свидетельствовать о наличии *Candida albicans*, которые

также могут вырасти в пробирках с агаром Сабуро с декстрином в течение 2—3 дней.

Необходимо подчеркнуть, что колонии перечисленных выше микроорганизмов редко вырастают из нормальной комменсальной флоры респираторного тракта или появляются в результате колонизации (например, колиформы, дрожжи). Поскольку они не имеют значения для выбора схемы лечения пациента, о них не следует сообщать в ответе или следует упомянуть как колонизирующую микрофлору.

### Определение чувствительности к антибиотикам

Тесты по определению чувствительности к антибиотикам следует выполнять только при значительном росте культуры и достижении колонией достаточных размеров, их не следует выполнять в отношении любых микроорганизмов, присутствующих в культуре в малых количествах. Интерпретация возможных результатов представлена в табл. 8.

Для энтеробактерий и стафилококков следует использовать стандартный дискодиффузионный метод Ксрби—Бауэра. Определение чувствительности *S. pneumoniae* к тетрациклину, хлорамфениколу, эритромицину и пенициллину следует проводить на агаре Мюллера—Хинтона с добавлением 5 % бараньей крови. Обычный кровяной агар также может быть использован. Для определения чувствительности к пенициллину вместо диска, содержащего пенициллин, следует использовать диск, содержащий 1 мкг оксациллина. Он также более стабилен. Пенициллинный диск может быстро потерять активность в жарком климате, что приведет к ошибочным результатам.

Штаммы *H. influenzae* необходимо исследовать (на шоколадном агаре), чтобы определить чувствительность к тетрациклину и хлорамфениколу и выявить

Таблица 8. Результаты определения чувствительности к антибиотикам "привередливых" микроорганизмов<sup>a</sup>

	Диаметр зоны задержки роста (мм)		
	устойчивые	умеренно чувствительные	чувствительные
<i>S. pneumoniae</i> (кровяной агар)			
Тетрациклин (30 мкг)	≤14	15—18	≥19
Эритромицин (15 мкг)	≤13	14—22	≥23
Оксациллин (1 мкг)	≤19 <sup>b</sup>	—	≤20
Хлорамфеникол (30 мкг)	≤12	13—17	≥18
<i>H. influenzae</i> (шоколадный агар)			
Тетрациклин (30 мкг)	≤19	20—22	≥23
Хлорамфеникол (30 мкг)	≤25	26—28	≥29
<i>S. catarrhalis</i> (кровяной агар)			
Тетрациклин (30 мкг)	≤14	15—18	≥19
Эритромицин (15 мкг)	≤13	14—22	≥23

<sup>a</sup> National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Voluntary consensus standards for clinical laboratory testing*. Villanova, PA, NCCLS, 1990.

<sup>b</sup> Устойчивые или умеренно чувствительные.

продуцирование  $\beta$ -лактамазы, используя, например, тест с нитроцефином. Лишь отдельные штаммы *H. influenzae* могут оказаться ампициллину-стойкими и не продуцирующими  $\beta$ -лактамазу. *V. catarrhalis* необходимо исследовать на способность к продуцированию  $\beta$ -лактамазы. Определение чувствительности к тетрациклину и эритромицину проводить необязательно.

Для *Candida albicans* определять чувствительность к антимикробным агентам нет необходимости.

Большинство лабораторий дают полуколичественную оценку бактериальных культур, выращенных на твердых питательных средах, которая может быть представлена следующим образом:

- (+) = несколько колоний,
- + = скудный рост,
- ++ = умеренный рост,
- +++ = обильный рост.

### Культивирование микобактерий туберкулеза

Помимо приготовления мазка для определения кислотоустойчивых микроорганизмов, в тех случаях, когда клиническая картина позволяет заподозрить туберкулез, рекомендуется подвергнуть материал (как правило, хотя и не всегда мокроту) культивированию для выявления *M. tuberculosis*. У некоторых больных с самыми серьезными подозрениями на туберкулез мокрота при кашле не выделяется. В действительности некоторое количество мокроты продуцируется, однако немедленно проглатывается. В этом случае лечащий врач может отослать в лабораторию пробу желудочного сока, взятого натощак (обычно рано утром). Он должен быть исследован так же, как и мокрота. При рутинном обследовании подвергать культивированию на туберкулез пробы, полученные от всех пациентов, весьма дорогое мероприятие (хотя и позволяет выявить случаи бессимптомно протекающего туберкулеза), и проводить его не рекомендуется.

### Методика концентрирования (деконтаминации)

Мокрота больных туберкулезом очень часто содержит твердые частицы легочной ткани; именно этот материал, если он обнаружен, следует использовать для культивирования. Однако даже содержащая микобактерии туберкулеза мокрота при кашле проходит через глотку и рот и неизбежно загрязняется нормальной микрофлорой. Эти контаминирующие агенты должны быть убиты, чтобы не допустить их буйного роста на среде Левенштейна—Йеисена. Концентрация (деконтаминация) является необходимым методическим приемом во всех случаях, когда мокрота получена из локусов, где присутствует нормальная микрофлора. Один из таких методов сочетает разжижение подчас слизистой мокроты с деструкцией контаминирующих агентов путем обработки раствором гидрата окиси натрия. Однако этот процесс в некоторой мере может оказать токсическое воздействие и на микобактерии, поэтому следует принять все меры предосторожности, чтобы:

- не допустить, чтобы концентрация NaOH превысила 2 %,
- не допустить, чтобы время экспозиции микобактерий туберкулеза в этом растворе NaOH превышало 30 мин, включая время центрифугирования.

В небольшую закрывающуюся стеклянную бутылку или колбу соответствующего объема помещают мокроту и 4 % (40 г/л) гидрата окиси натрия,

смешивают путем встряхивания, инкубируют при комнатной температуре (25—30 °С) в течение 15—20 мин. Каждые 5 мин эту смесь осторожно встряхивают (для этих целей может быть использован шоттель-аппарат). В странах с очень жарким климатом может потребоваться охладить эту смесь или сократить время реакции (например, до 10—15 мин).

Через 15—20 мин пробу следует перенести в стерильную пробирку и центрифугировать с ускорением менее 13 000 g, но не более 10 мин, в противном случае микобактерии погибнут от воздействия избыточного контакта со щелочью. Супернатант следует с осторожностью отобрать; осадок немедленно нейтрализуют, добавляя по каплям раствор HCl (2 моль/л), содержащий 20 мл фенолового красного (на 1 л раствора), до тех пор, пока смесь не станет розовой. Нейтрализованный осадок после этого следует посеять по крайней мере на три пробирки со средой Левенштейна—Йенсена. Чрезвычайно высокая контаминация (выше 5 %) среды Левенштейна всегда означает, что деконтаминация оказалась неэффективной.

### Альтернативный метод концентрирования

Некоторые работники<sup>1</sup> предпочитают смешивать мокроту (4,0 мл) с эквивалентным объемом 10 % раствора<sup>2</sup> (100 г/л) фосфорно-кислого натрия (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) и оставляют эту смесь в течение 18 ч при комнатной температуре или инкубируют при 35 °С предпочтительно с периодическим встряхиванием. Этот метод менее агрессивен в отношении микобактерий и не нуждается в скрупулезном контроле температуры и времени экспозиции. После центрифугирования смеси с ускорением не выше 13 000 g в течение 30 мин для надежного выделения микобактерий рекомендуется вновь провести нейтрализацию осадка (используя по каплям раствор HCl (2 моль/л) с феноловым красным в качестве индикатора) или промыть осадок 15,0 мл стерильной дистиллированной воды.

### Интерпретация результатов культивирования на наличие M.tuberculosis

Пробирки со средой Левенштейна следует инкубировать в течение 2—3 дней при температуре 35—37 °С в горизонтальном положении с открученными на половину оборота крышками. Затем засеянные пробирки хранят при 37 °С в течение 6 нед и еженедельно просматривают посевы на наличие роста. Во время просмотра посевов необходимо обращать внимание на каждую выросшую на поверхности агара колонию. Аккуратно делают мазок и окрашивают его по Цилю—Нильсену. Если при микроскопии мазка не будут обнаружены кислотоустойчивые бактерии, выделенную культуру следует отнести к контаминантам.

Типичные “грубые, жесткие, тяжелые” культуры туберкулеза человека (M.tuberculosis) иногда появляются после 2—3 нед инкубации посевов (но редко раньше).

Культуры туберкулеза бычьего типа (M.bovis) обычно гладкие, белесовато-кремового цвета. Другие, главным образом непатогенные микобактерии, способны расти быстрее (иногда после нескольких дней инкубации), а также могут образовывать пигментированные колонии (красные, желтые или оранжевые).

<sup>1</sup> Corper, H.J. and Stoner, R.E. Improved procedure for diagnostic culture of mammalian tubercle bacilli. *Journal of laboratory and clinical medicine*, 31: 1364-71 (1946).

<sup>2</sup> 230 г Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O на 1 л.

В том случае, если на агаре выросли типичные колонии и в мазке, окрашенной по Цилю—Нильсену, выявлены типичные кислотоустойчивые палочки, сообщают, что обнаружены "Mycobacterium sp, предположительно M.tuberculosis"; выделенную культуру отсылают в национальную или местную справочную лабораторию для идентификации и определения чувствительности к антибиотикам, поскольку это специфические процедуры.

### Общие замечания относительно мер безопасности

Все манипуляции с мокротой проводят осторожно, на исследование берут мокроту в хорошо закупоренных, исключающих проливание емкостях. Это особенно важно, когда пробы пересылаются по почте. Более того, целесообразно все манипуляции с любыми пробами мокроты (даже когда туберкулез не упоминается в направлении на исследование) проводить в специально оборудованном средствами микробиологической защиты боксе. Даже самодельный бокс лучше, чем ничего.

Особую осторожность следует соблюдать, когда флаконы открывают, закрывают или встряхивают, а также когда центрифугируют материал. Бактериальные аэрозоли, которые могут образоваться во время выполнения лабораторных процедур, способны инфицировать лабораторный персонал, для предотвращения заражения необходимо принять соответствующие меры предосторожности<sup>1</sup>.

Транспортировка культур M.tuberculosis по почте в национальную справочную лабораторию сопряжена со специфическим риском, связанным с возможными авариями или повреждением емкостей, в связи с этим пересылаемые по почте емкости с культурами должны быть изготовлены из прочного небьющегося материала.

<sup>1</sup> Technical guide for sputum examination for tuberculosis by direct microscopy. *Bulletin of the International Union against Tuberculosis and Lung Diseases*. Suppl. 2. 1978.

# Инфекции верхних дыхательных путей

## Введение

Верхние дыхательные пути — полые органы, расположенные от глотки до ноздрей, к ним относятся ротоглотка и носоглотка со связывающими полостями, синусами и средним ухом. Верхние дыхательные пути поражают такие инфекционные заболевания, как:

- фарингит, иногда с вовлечением тонзилл, что может привести к “воспалению горла”;
- назофарингит;
- воспаление среднего уха;
- синусит;
- эпиглоттит.

Среди всех перечисленных инфекций фарингиты едва ли не самые распространенные; нелеченные инфекции могут иметь очень серьезные последствия. В настоящем разделе будут рассмотрены лишь фарингиты.

В большинстве случаев фарингиты имеют вирусную этиологию и проходят без постороннего вмешательства. Вместе с тем приблизительно 20 % случаев фарингита вызывают бактериальные агенты и, как правило, для их лечения применяют соответствующие антибиотики. Поскольку лечащий врач, руководствуясь лишь клиническими признаками, практически не в состоянии отличить вирусный фарингит от бактериального, в идеале лечение следует назначать, опираясь на результаты микробиологического исследования.

Бактериологическая диагностика фарингитов затруднена тем, что нормальная микрофлора ротоглотки содержит очень много разных видов аэробных и анаэробных бактерий. Обычно нормальная микрофлора по численности превосходит патогенную, роль бактериолога заключается в том, чтобы установить различия между комменсалами и патогенными микробами. По возможности лечащему врачу следует сообщать лишь о последних.

## Нормальная микрофлора глотки

Нормальная микрофлора глотки включает в себя большое число видов, полную идентификацию которых проводить не следует и о которых также не следует сообщать лечащему врачу:

- $\alpha$ -гемолитические стрептококки и пневмококки;
- непатогенные *Neisseria* spp.;
- *Branchamella* (бывшая *Neisseria*) *catarrhalis* (может также быть патогеном дыхательных путей);
- стафилококки (*S.aureus*, *S.epidermidis*);
- дифтероиды;
- *Haemophilus* spp.;
- дрожжи (*Candida* spp.) в ограниченном количестве;
- различные исключительно анаэробные грамположительные кокки и граммотрицательные палочки спиралеобразной и волокнистой формы.

Горло больных людей преклонного возраста, страдающих иммунодефицитными состояниями или болезнями недостатка питания, особенно тех, кто получал антибиотики, может быть колонизировано энтеробактериями (*E.coli*, *Klebsiella* spp. и др.) и неферментирующими граммотрицательными бактериями (*Acinetobacter* spp. и *Pseudomonas* spp.). У таких больных в глотке

могут расти *S.aureus* или *Candida spp.*, а также дрожжеподобные грибы. Хотя эти микроорганизмы не являются этиологическими агентами фарингитов, кроме тех случаев, когда у пациента наблюдается гранулоцитопения, о них следует сообщить лечащему врачу, поскольку их присутствие подчас может свидетельствовать о наличии (а иногда и являться причиной) инфекций нижних дыхательных путей (например, пневмонии) или бактериемии. Однако в рутинной практике нет необходимости делать их антибиотикограмму.

## Этиологические агенты фарингитов

1. Наиболее часто этиологическим агентом бактериальных фарингитов и тонзиллитов являются *Streptococcus pyogenes* (группа А). Эта инфекция особенно характерна для детей в возрастной группе 5—12 лет. Когда стрептококковый фарингит сопровождается характерной кожной сыпью, можно говорить о наличии у больного скарлатины. При стрептококковых поражениях глотки у новорожденных инфекционный процесс часто распространяется на носоглотку и приводит к гнойному насморку.  $\beta$ -гемолитические стрептококки, не относящиеся к группе А (например, стрептококки групп В, С, D), редко являются этиологическими агентами бактериальных фарингитов, и, если такие микроорганизмы будут обнаружены, о них сообщают лечащему врачу. Инфекции глотки, вызванные *S.pyogenes*, при неэффективном лечении могут вызвать ревматизм и менее часто гломерулонефрит. Идентификация *S.pyogenes* и целенаправленная антибактериальная терапия являются основой профилактики возникновения ревматизма. Рецидивы вызванных *S.pyogenes* фарингитов, возникающие несмотря на правильное лечение пенициллином, могут быть обусловлены:  $\beta$ -лактомазопродуцирующими комменсалами глотки (стафилококками, гемофильными палочками, бронхамеллами или анаэробами).
2. *Corynebacterium diphtheriae* вызывает дифтерию, которая является эндемичным заболеванием для многих тропических стран. Как правило (за редким исключением), *C.diphtheriae* вызывает типичную форму заболевания, для которой характерно наличие серо-белых пленок на пораженных органах — глотке, миндалинах, носу, гортани. Дифтерия — очень серьезное заболевание, и диагноз ставят на основе клинических проявлений. После этого лечащий врач обычно делает специальный запрос о проведении культуральных посевов для выделения дифтерийной палочки. Микробиологу следует быть готовым к поиску колоний, которые представляются типичными при рутинном культивировании материала из зева больного, особенно в странах, где дифтерия является распространенным заболеванием.
3. В некоторых странах с возрастающей частотой регистрируется гонококковый фарингит, заболеваемость которым растет параллельно с ростом числа случаев цервикальной и уретральной гонореи. На основании специального запроса клинициста в лаборатории подвергают культивированию на наличие гонококков материал, полученный из глотки с помощью тампона, используя при этом специальные питательные среды (модифицированная среда Тайера—Мартина).
4. Язвенно-некротический фарингит (ангина Венсана) — довольно редкое состояние, характеризующееся некротическими изъязвлениями глотки с формированием (или без) псевдодифтерийных пленок. Такое состояние характеризуется наличием в пораженных инфекцией органах обильной смешанной флоры строго анаэробной с преобладанием грамотрицательных веретенообразных палочек и спирохет, которые представлены в основном *Fusobacterium spp.* и *Borrelia vincentii*; возможно также присутствие других видов. Несмотря на то что оба упомянутых рода принадлежат к представителям нормальной микрофлоры ротовой полости, при их присутствии в большом количестве в окрашенном по Граму

мазке (из материала с изъязвленных участков) сообщают о выделении "веретено-спирохетального комплекса". Этот диагноз не нуждается в подтверждении с помощью требующего длительного времени и трудно-выполнимого культивирования в условиях анаэробноза. Вместе с тем наличие такого комплекса не исключает необходимости поиска других патогенов, особенно *S. pyogenes*.

5. *Кандидозы полости рта*. Хотя небольшое число *C. albicans* или других представителей рода *Candida* может встречаться в нормальной микрофлоре ротовой полости, значительное увеличение их количества наблюдается при определенных патологических состояниях, например у недоношенных детей с недостаточностью питания, у взрослых с иммунодефицитными состояниями или у больных, получавших антибиотики широкого спектра действия или лечение по поводу онкологических заболеваний. Пораженные участки (язык, миндалины, слизистая оболочка ротовой полости и глотки) могут приобрести интенсивно-красную окраску или покрыться белыми пятнами или сливающейся грязно-белой пленкой (молочница). Диагноз кандидозов ставят при наличии в мазке, окрашенном по Граму, экссудата очень большого числа дрожжевых клеток, часть которых формирует длинные мицелиподобные волокна.
6. *Поиск носителей*. Материал, отобранный тампоном из верхних дыхательных путей, может быть направлен в лабораторию не для установления диагноза инфекционного заболевания, а для выявления потенциальных патогенов у представляющих интерес объектов, т.е. для выявления носителей изофарингеальной патогенной микрофлоры. Это мероприятие осуществляется как составная часть целенаправленного эпидемиологического надзора. В числе патогенов верхних дыхательных путей, способных вызвать носительство, можно назвать:

- *Staphylococcus aureus*. При расследовании больничных вспышек инфекции, вызванной *S. aureus*, иногда подвергают микробиологическому исследованию для выявления носителей материал из носовой полости больных и персонала лечебных учреждений.
- *Neisseria meningitidis*. Носительство менингококка может быть достаточно широко распространено (20 % и более) даже в межэпидемический период. Выявление носителей менингококков в фарингеальной полости требуется редко и не проводится до того, как членам семьи или другим лицам, имевшим тесные контакты с пациентом, не будет проведена профилактическая антибиотикотерапия.
- *Streptococcus pyogenes*. Носительство небольшого числа этого микроорганизма широко распространено, особенно среди школьников (20—30 %).
- *Corynebacterium diphtheriae*. Уровень носительства дифтерийной палочки очень высок среди неиммунизированного населения. В таких коллективах вполне оправданными являются мероприятия по выявлению носителей среди лиц, имевших тесный контакт с больным дифтерией человеком, у которого диагноз подтвержден лабораторно. Там, где программы иммунизации осуществляются должным образом, носительство встречается редко.

### Взятие материала и его доставка

В идеале взятие материала должен осуществлять врач или другой обученный этой процедуре персонал. Пациента следует усадить на стул против источника света. Как только язык будет фиксирован языкодержателем, быстро проводят стерильным ватно-марлевым тампоном по обеим миндалинам, задней стенке глотки и другим воспаленным областям. При выполнении этой процедуры ни в коем случае нельзя прикасаться к языку или слизистым щек. Предпочтительно отбирать материал двумя тампонами. Один используют для приготовления мазка, а другой помещают в стеклянную или пластиковую емкость и отправляют в лабораторию. Можно

также поместить оба тампона в контейнер и направить в лабораторию. В тех случаях, когда исследование не может быть начато в течение 4 ч, тампон необходимо поместить в транспортную среду (Амьеса или Стюарта).

### Прямое микроскопическое исследование

Для определения стрептококков или *Neisseria* spp. окрашенные по Граму мазки не используются. Более того, прямое микроскопическое исследование не является достаточно специфическим и чувствительным методом для выявления дифтерийной палочки, за исключением случаев, когда исследуемый материал был должным образом отобран и исследован опытным микробиологом. Окрашенный по Граму мазок позволяет наилучшим образом распознать "веретено-спирохетальный комплекс" при исследовании материала из некротически изъязвленных участков зева и выявить присутствие грибов *Candida*. Мазок готовят при наличии запроса лечащего врача. При отсутствии такого запроса или информации о клинических проявлениях инфекции приготовления окрашенного по Граму мазка из материала, отобранного из глотки с помощью тампона, не требуется.

### Культивирование и идентификация

#### Культивирование для выявления *Streptococcus pyogenes*

Немедленно после доставки материала в лабораторию материал высевают путем втирания тампона на  $1/4$  чашки Петри с кровяным агаром, оставшуюся часть агара на чашке засевают штриховым методом с помощью стерильной бактериологической петли. Кровяной агар готовят на основе агаровой среды, не содержащей в своем составе глюкозу (или с незначительным содержанием ее), например, триптиказо-соевого агара. Окисление глюкозы *S.pyogenes* подавляет выработку гемолизина. Может быть использована кровь разных видов теплокровных, даже человеческая кровь (свежая донорская) в концентрации 5%. Чашки следует разливать таким образом, чтобы толщина агарового слоя составляла 4—5 мм. Предпочтительно использовать баранью кровь, поскольку она препятствует росту гемолитических *Haemophilus* spp., в этом случае также отсутствует гемолиз с зимогенными вариантами *E.faecalis*.

Выявление  $\beta$ -гемолитических колоний можно облегчить, а их идентификацию ускорить, если на первоначально засеянные участки агара наложить диск с ко-тримоксазолом (подобный тому, который используют для определения чувствительности к антибиотикам) и специальный диск с низким содержанием бацитрацина. В связи с тем что *S.pyogenes* устойчив, а многие другие бактерии чувствительны к ко-тримоксазолу, эта процедура позволяет отчетливее выявить  $\beta$ -гемолитические культуры. Инкубация посевов в атмосфере свечного газа может способствовать выявлению наибольшего числа  $\beta$ -гемолитических стрептококков. Наиболее простой способ усилить гемолиз — глубоко ввести петлю с исследуемым материалом в среду, держа петлю перпендикулярно к поверхности агара, что обеспечит рост колоний не на поверхности, а внутри. После 18-часовой и 48-часовой инкубации посевов при температуре 35—37 °С кровяной агар просматривают для обнаружения роста мелких (0,5—1,0 мм) колоний, окруженных достаточно широкой зоной чистого гемолиза. После окрашивания мазка по Граму для подтверждения грамположительной природы этих кокков колонии направляют для проведения специфических тестов, которые позволили бы подтвердить принадлежность культуры к *S.pyogenes*. Для клинических целей идентификацию *S.pyogenes* осуществляют на основании чувствительности культуры к низкой концентрации бацитрацина. Для этого используют

Таблица 9. Типирование  $\beta$ -гемолитических стрептококков

Вид	<i>S.pyogenes</i>	<i>S.agalactiae</i>	<i>E.faecalis</i> зимогенного типа <sup>а</sup>	Другие
Группа	A	B	D	C,G,F
Гемолиз	$\beta$	$\beta^b$	$\beta$	$\beta$
Зона вокруг дифференциального диска с бацитрацином	+	0 <sup>в</sup>	0 <sup>в</sup>	0 <sup>г</sup>
Желчно-эскулиновый агар (рост и пигментация)	0	0	+	0
САМР-тест	0 (+)	+	0	0
Чувствительность к ко-тримоксазолу <sup>д</sup>	0	0	0	+

<sup>а</sup> *E. faecalis* зимогенного типа проявляют  $\beta$ -гемолитическую активность только на агаре с лошадиной кровью.

<sup>б</sup> 5 % стрептококков группы В не обладают гемолитической активностью.

<sup>в</sup> 5 % положительны.

<sup>г</sup> 10 % положительны.

<sup>д</sup> Такой же диск, какой применяется при определении чувствительности по методу Керби-Бауэра.

специальный дифференцирующий диск с содержанием 0,02—0,05 МЕД бацитрацина. Обычный диск бацитрацина, используемый для определения чувствительности, содержащий 10 МЕД, не годится для дифференциации культур. Если при исследовании культуры  $\beta$ -гемолитических стрептококков выявляют зону гемолиза вокруг специального дифференцирующего диска, их относят к *S.pyogenes*. Если гемолитические колонии достаточно многочисленны, наличие или отсутствие зон задержки роста можно учитывать непосредственно на первичных чашках с кровяным агаром. Если колонии недостаточно многочисленны, одну или две из них следует пересеять на другую чашку и каждую зону высева закрыть диском с бацитрацином. После инкубации в течение суток можно приступать к подсчету зон задержки роста.

В некоторых лабораториях результаты предварительной идентификации культур подтверждают путем постановки серологического теста для выявления специфических полисахаридов клеточной мембраны. Этот тест может быть поставлен с использованием классического метода преципитации или с использованием коммерческих наборов для ко-агглютинации на стекле или латекс-агглютинации, что позволяет выполнить ее быстрее. По желанию бацитрацинрезистентные  $\beta$ -гемолитические стрептококки в дальнейшем могут быть типированы с помощью постановки простых физиологических тестов (табл. 9).

При сообщении о наличии *S.pyogenes* в материале из горла ответ следует давать в полуколичественном выражении (+, ++ или +++). У больного стрептококковым фарингитом обычно наблюдается масснвный рост *S.pyogenes*: колонии вырастают по всей поверхности чашки с агаром. У носителя обычно вырастает мненс 20 колоний на одной чашке. Даже в случае выявления единичных колоний  $\beta$ -гемолитических стрептококков их идентификация нуждается в подтверждении и о них следует сообщать.

### Культивирование для выявления *Corynebacterium diphtheriae*

Несмотря на то что дифтерийная палочка хорошо растет на обычном кровяном агаре, наилучших результатов можно добиться при посеве материала на одну или две специальные питательные среды.

- *Коагулированная сыворотка Леффлера или яичная среда Дорсэ.* Хотя обе среды не являются селективными, они дают обильный рост дифтерийной палочки после суточной инкубации. Более того, клеточная морфология дифтерийной палочки в этом случае будет более "типичной": неравномерно окрашенные, короткие или длинные, слегка изогнутые палочки, включающие изменившие цвет гранулы и образующие V-образные или параллельные линии. Наличие изменивших цвет гранул чаще наблюдается в мазках, окрашенных метиленовым синим или по Альберту, чем в мазках, окрашенных по Граму.
- *Селективный теллурит-кровяной агар.* Эта среда позволяет выделить дифтерийную палочку, даже если она присутствует в очень малом количестве, например в материале, полученном от бессимптомных носителей дифтерии. На этой среде колонии дифтерийной палочки полностью формируются только через 48 ч, цвет колоний — от грязно-серого до черного. Из подозрительных колоний делают мазок, который окрашивают по Граму; при выявлении сходных с коринебактериями форм микроорганизмов колонию отсекают на кровяной агар для получения чистой культуры с "типичной" морфологией. Следует иметь в виду, что у колоний *C.diphtheriae* биотипа *mitis*, который является наиболее распространенным, на кровяном агаре наблюдается четкая зона  $\beta$ -гемолиза.

Предварительный ответ о наличии *C.diphtheriae* часто может быть дан уже на этом этапе. Однако принадлежность культуры должна быть подтверждена путем постановки простых биохимических тестов и демонстрации токсигенности. Поскольку для последних требуется заражение морских свинок, которое может быть выполнено только в центральной лаборатории, здесь будут описаны лишь ускоренные методы биохимической идентификации. *C.diphtheriae* обладают каталазной активностью, редуцируют нитраты. Не гидролизуют мочевины. Образуют кислоту без газа в глюкозе и мальтозе, обычно инертны в отношении сахарозы. Ферментация глюкозы может определяться на среде Клиглера. Наличие уреазной активности может быть продемонстрировано на специальной среде с мочевиной, редукция нитратов — в нитратном бульоне таким же образом, как это принято для энтеробактерий. Для определения ферментации мальтозы и сахарозы могут быть использованы среды, приготовленные на основе пептонной воды с добавлением реактива Андреде и окончательной концентрацией каждого углевода, равной 1%. Результаты учитывают через 24 ч, хотя может потребоваться дополнительная инкубация еще в течение суток. Следует подчеркнуть, что задачей микробиологической лаборатории является подтверждение клинического диагноза дифтерии. Лечение следует начинать сразу же после получения ответа из лаборатории. Более подробную информацию о выделении и идентификации *C.diphtheriae* можно получить в "Руководстве по лабораторной диагностике дифтерии"<sup>1</sup>.

## Определение чувствительности к антибиотикам

Обычно нет необходимости проводить исследования для определения чувствительности к антибиотикам в отношении культур, выделенных из ротовой или фарингеальной полости, так как результаты этих исследований в ряде случаев даже могут ввести в заблуждение. Большинство бактериальных фарингитов вызывает *S.pyogenes* или *C.diphtheriae*. И в том и в другом случае препаратами выбора являются бензилпенициллин или эритромицин. В случаях дифтерии также показано лечение антитоксином.

<sup>1</sup> Неопубликованный документ ВОЗ LAB/81.7. Его можно заказать по адресу: Health Laboratory Technology and Blood Safety, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.

# Заболелания, передаваемые половым путем

## Введение

Некоторые микроорганизмы передаются или могут передаваться половым путем. За последнее десятилетие невероятно расширился спектр клинических синдромов, ассоциируемых с этими агентами. В табл. 10 перечислены передаваемые половым путем заболевания и вызывающие их возбудители. Установление этиологического агента, вызывающего некоторые из этих состояний, представляет собой серьезную задачу для клинических микробиологических лабораторий. Установление лабораторного диагноза имеет важнейшее значение для лечения и организации эпидемиологического надзора в отношении таких заболеваний, как гонорея и сифилис, которые представляют опасность не только для больных, но и для их половых партнеров.

В этом разделе коротко обсуждаются вопросы идентификации наиболее распространенных микроорганизмов, передаваемых половым путем, которые обнаруживают в материале, полученном из половых путей мужчин и женщин. В этой публикации не освещены вопросы, касающиеся диагностики таких вирусных и бактериальных агентов, как *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* и *Mobiluncus spp.* Более подробную информацию читатель может получить в соответствующих документах ВОЗ<sup>1</sup>.

Таблица 10. Некоторые микроорганизмы, передаваемые половым путем, и связанные с ними синдромы

Этиологический агент	Синдром
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Цервицит, уретрит, препубертатный вагинит, проктит, фарингит, конъюнктивит, эпидидимит, простатит, бартолинит, эндометрит, сальпингит, перигепатит, диссеминированная гонококковая инфекция (артрит, дерматит, тендовагинит), хориоамнионит, бесплодие
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Цервицит, уретрит, препубертатный вагинит, проктит, конъюнктивит, трахома, эпидидимит, бартолинит, эндометрит, перигепатит, бесплодие, пневмония новорожденных, воспаление среднего уха новорожденных, синдром Рейтера
<i>Chlamydia trachomatis</i> , серотипы L1, L2, L3	Паховый лимфогранулематоз
<i>Treponema pallidum</i>	Сифилис
<i>Haemophilus ducreyi</i>	Шанкр
<i>Calymmatobacterium granulomatis</i>	Паховая гранулема
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Бактериальный вагинит
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Неонатальный сепсис и менингит
<i>Shigella spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Campylobacter spp.</i>	Кишечные инфекции
Вирус герпеса человека (α)	Генитальный и оральный герпес, неонатальный герпес, менингит, проктит
Цитомегаловирус	Врожденная инфекция
Вирус папилломы человека	Вирусная бородавка, рак шейки матки (?)
Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ)	Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) и связанные с ним состояния
Вирус гепатита В	Гепатит В
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Вагинит, уретрит
<i>Candida albicans</i>	Вульвовагинит, баланопостит

<sup>1</sup> Bench level laboratory for sexually transmitted diseases. Неопубликованный документ ВОЗ WHO/VDT/89.443, который можно получить, направив запрос по адресу: Programme of Sexually Transmitted Diseases, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.

## Уретриты у мужчин

Уретриты у мужчин клинически проявляются расстройством мочеиспускания и (или) дизурией или бессимптомной инфекцией, однако часто встречаются и бессимптомно протекающие процессы, вызываемые *Neisseriae gonorrhoeae* или *Chlamydia trachomatis*. Если не лечить гонококковый и хламидиозный уретриты, они могут прогрессировать и привести к эпидидимиту. У мужчин-гомосексуалистов *N.gonorrhoeae* и *C.trachomatis* могут вызывать также инфекции прямой кишки и ротовой полости и глотки.

С целью выбора правильной тактики ведения больных уретриты следует разделить на гонококковые и негонококковые. Примерно половину случаев негонококкового уретрита вызывает *C.trachomatis*, однако в большинстве оставшихся случаев этиологический агент неизвестен. В соответствии с результатами некоторых исследований уретриты может вызывать также *Ureaplasma urealyticus*, а *Trichomonas vaginalis* обнаруживается у 1—3 % больных негонококковым уретритом. Внутриуретральная инфекция, вызванная вирусом герпеса человека, может привести к нарушениям мочеиспускания. Такие бактериальные агенты, как стафилококки, различные энтеробактерии, *Acinetobacter* spp. и *Pseudomonas* spp., могут быть выделены из уретры здоровых мужчин и не могут быть причислены к возбудителям уретритов.

Исследование материала на наличие *C.trachomatis* является сложной процедурой и не подлежит обсуждению в этом разделе. Помимо выделения чистых культур микроорганизмов, для выявления хламидий в настоящее время разработаны и доступны и некультуральные методы, например энзимоиммунный метод и метод иммуофлюоресценции. Однако эти перспективные методы пока слишком дорогостоящи.

## Взятие и транспортировка материала

Для взятия материала из уретры используют тампоны с очень узким аппликатором или стерильную бактериологическую петлю; их вводят в уретру на глубину 3—4 см, осторожно поворачивают и вынимают. Гнойные выделения могут быть собраны непосредственно тампоном или бактериологической петлей. Для исследования важен материал, полученный как с наконечника, так и со стержня аппликатора тампона. Для выделения культур *N.gonorrhoeae* предпочтительно использовать ватные тампоны, наконечники которых обработаны активированным древесным углем или альгинатом кальция, а также наконечники Дакрона. Если нет возможности получить эти специально обработанные тампоны промышленного производства, вместо них используют обычные ватные тампоны, при этом отобранный материал следует немедленно высевать на питательные среды. При уретритах массаж предстательной железы не приводит к увеличению уровня выделения гонококков или хламидий.

Аноректальный материал получают путем введения тампона на 4—5 см в анальный канал. Материал из ротоглотки, собранный тампоном с задней стенки глотки и крипт миндалин, следует безотлагательно высевать на питательные среды.

В идеале для выделения *N.gonorrhoeae* непосредственно посев материала на питательные среды следует производить в клинике. Засеянные питательные среды следует инкубировать в атмосфере "свечного газа" или в атмосфере, содержащей 5—10 % углекислого газа, при высокой влажности. Если немедленный посев на питательные среды и инкубация невозможны, материал следует поместить в транспортные среды, такие, как среды Амнес

или Стюарта. Время транспортировки должно быть как можно короче: при температуре окружающей среды 30 °С оно не должно превышать 12 ч. Следует избегать охлаждения.

### Прямое исследование и интерпретация полученных результатов

Большинство исследований показало, что наличие четырех или более полиморфно-ядерных лейкоцитов в одном поле зрения микроскопа (масляно-иммерсионная система) является достоверным признаком уретрита у мужчин. Этот критерий особенно полезен для врача, которому предстоит принять решение, назначать ли лечение больному с жалобами на незначительные проблемы со стороны мочевых путей.

В большинстве случаев при гонорее у мужчин имеет место гнойное отделяемое из уретры; при микроскопии мазка обнаруживается значительное число (более 10 в одном поле зрения) полиморфно-ядерных лейкоцитов. Однако при негонорейном уретрите, который сопровождается менее выраженной воспалительной реакцией, эти признаки часто отсутствуют. Мазок, в котором обнаружено более 4 полиморфно-ядерных лейкоцитов в одном поле зрения микроскопа, но не найдены внутриклеточные грамотрицательные диплококки, заставляет с высокой степенью уверенности предположить, что это случай негонорейного уретрита.

Очень тонкий мазок, приготовленный путем прокатывания тампона по предметному стеклу, фиксируют на пламени горелки и окрашивают по Граму. Этот метод сводит до минимума изменение полиморфно-ядерных лейкоцитов. Наличие в мазках из уретры расположенных внутри полиморфно-ядерных лейкоцитов грамотрицательных диплококков является достаточным основанием для подозрения на гонорею. Как чувствительность, так и специфичность микроскопического исследования окрашенного по Граму мазка составляют более 98 % при диагностике гонореи у мужчин.

Не рекомендуется окрашивать по Граму мазки, приготовленные из материала, полученного из уретры, прямой кишки или ротоглотки мужчин, не имеющих клинических признаков заболевания. Вместе с тем микроскопическое исследование гнойного отделяемого, полученного при аноскопии, имеет чрезвычайно высокое диагностическое значение.

### Культивирование для выделения *Neisseria gonorrhoeae*

Засеянные питательные среды — модифицированный агар Тайера—Мартена<sup>1</sup> (или нью-йоркская питательная среда<sup>2</sup>) — следует инкубировать при температуре 35 °С во влажной атмосфере, богатой углекислым газом (свечной

<sup>1</sup> Модифицированный агар Тайера—Мартена готовят путем добавления при 50 °С IsoVitalex или смеси антибиотиков в шоколадный агар, приготовленный на основе агара GC или колумбийского агара. Смесь, содержащая 3 или 4 антибиотика, выпускается на промышленной основе. Смесь VNC содержит ванкомицин, колистин и нистатин; смесь VCNT, помимо указанных антибиотиков, содержит также триметоприм.

Окончательная концентрация антибиотиков в приготовленной среде:

ванкомицин	3,0 мкг/мл
колистин	7,5 мкг/мл
нистатин	12,5 мкг/мл
триметоприма лактат	5,0 мкг/мл.

<sup>2</sup> Нью-йоркская питательная среда готовится путем добавления к 500,0 мл стерильного GC агара, остуженного до 50 °С, следующих компонентов:  
— 50,0 мл лошадиной крови, лизированной с помощью добавления санонина из расчета 5,0 мл/л,  
— стерильного дрожжевого аутолизата,  
— смеси антибиотиков, содержащей ванкомицин, колистин, амфотерицин и триметоприм.  
Эти компоненты производит на промышленной основе фирма Oxoid Ltd, Wadc Rd, Basingstoke, England.

газ), и просматривать ежедневно в течение 2 сут. В лабораториях, которым приходится исследовать большое число образцов на *N.gonorrhoeae*, часто предпочитают использовать неселективный шоколадный агар с добавлением IsoVitaleX или эквивалентных ингредиентов в качестве дополнения к селективному модифицированному агару Тайера-Мартина, поскольку от 3 до 10 % штаммов гонококков могут оказаться чувствительными к концентрациям ванкомицина, используемого в селективном агаре.

После 24-часовой инкубации колонии гонококков достигают 0,5—1,0 мм в диаметре, непрозрачны, выпуклы, блестящи, окраска колоний — от белого до серого цвета. При последующей инкубации можно наблюдать отличающиеся друг от друга по размеру и морфологии колонии, образованные из гонококков 5 различных типов.

## Идентификация *Neisseria gonorrhoeae*

Предварительная идентификация *N.gonorrhoeae*, выделенных из мочеполовых путей, основывается на положительной оксидазной пробе и наличии в окрашенном по Граму мазке грамотрицательных диплококков. Подтверждение предварительно идентифицированной культуры может быть получено с помощью теста для определения деградации в углекислом газе или других тестов с использованием методов и питательных сред, подробные сведения о которых изложены в других источниках<sup>1</sup>.

## Определение чувствительности к антибиотикам

Между штаммами *N.gonorrhoeae*, циркулирующими в разных географических регионах, существуют различия в чувствительности к пенициллину. В регионах, расположенных в зоне Африканской Сахары или Юго-Восточной Азии, в настоящее время выделяются штаммы гонококков, продуцирующие  $\beta$ -лактамазу. Штаммы, резистентность которых к пенициллину обусловлена хромосомными особенностями и не связана с продуцированием  $\beta$ -лактамазы, также все шире распространяются во многих странах. Однако для выявления таких штаммов диффузионный метод с использованием дисков не является адекватным.

В регионах, где до сих пор для лечения гонореи применяют пенициллин, ампициллин или амоксициллин, выделенные штаммы *N.gonorrhoeae* (особенно полученные от пациентов, лечение которых оказалось неэффективным) должны подвергаться рутинному исследованию для выявления способности к продукции  $\beta$ -лактамазы с помощью таких рекомендованных тестов, как тест с нитроцефном<sup>2</sup>. Для постановки этого теста в 0,2 мл физиологического раствора готовят густую суспензию из нескольких колоний. Затем в эту суспензию добавляют 0,025 мл нитроцефина и перемешивают в течение 1 мин. Быстрое изменение цвета (от желтого до розового или красного) свидетельствует, что штамм продуцирует  $\beta$ -лактамазу.

Использование диффузионного метода с применением дисков для определения чувствительности гонококков к антибиотикам не рекомендуется.

<sup>1</sup> *Bench level laboratory manual for sexually transmitted diseases*. Неопубликованный документ ВОЗ WHO/VDT/89.443 можно получить, направив запрос по адресу: Programme of Sexually Transmitted Diseases, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.

<sup>2</sup> Реагент-нитроцефин можно получить в Oxoid (Basingstoke, England), в его состав входит 1,0 мг нитроцефина (SR 112) и один флакон регидратированного раствора (SR 112A). Тест в пробирке может быть заменен тестом с использованием диска, в котором применяют бумажные диски, импрегнированные нитроцефином (диски можно получить, обратившись в BBL Microbiology Systems Division, Becton and Dickinson and Co, PO Box 243, Cockeysville, MD, USA).

## Материал для исследования, полученный из половых путей женщин

Микрофлора влагалища женщины в период, предшествующий менопаузе, в норме представлена в основном лактобактериями, а также разнообразными видами факультативных аэробных и анаэробных бактерий.

При патологических состояниях выделения из влагалища могут быть результатом:

- вагинитов, вызванных *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans*;
- бактериальных вагинозов, вызванных обильным ростом анаэробов и *Gardnerella vaginalis*;
- цервицитов, вызванных *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*.

В отношении других бактерий, таких как энтеробактерии, нет данных, свидетельствующих об их способности вызывать вагиниты. Этиологическими агентами, вызывающими вагиниты у девочек препубертатного возраста, могут служить *N.gonorrhoeae* или *C.trachomatis*.

Бактериальные вагинозы (неспецифические вагиниты) — это состояния, характеризующиеся обильными, зловонными влагалищными выделениями, связанными с выраженным увеличением числа *Gardnerella vaginalis* и различных облигатных анаэробов и снижением числа влагалищных лактобактерий. Минимальный набор диагностических признаков бактериального вагиноза включает по крайней мере три характерных признака: патологические выделения из влагалища, pH влагалищного секрета выше 4,5, специфические клетки (эпителиальные клетки, к которым прикреплено такое множество бактерий, что клеточная стенка становится неразличимой) и появление рыбного, напоминающего аммиак неприятного запаха после добавления капли 10 % едкого калия во влагалищный секрет.

Этиологическими агентами уретритов у женщин также часто служат *N.gonorrhoeae* и *C.trachomatis*.

Восходящая инфекция, вызванная *N.gonorrhoeae* и *C.trachomatis*, вагинальными анаэробами и факультативными анаэробами, может привести к воспалению тазовых органов, в свою очередь приводящему к таким осложнениям, как бесплодие или эктопическая беременность.

Инфекции мочеполовой системы, вызванные бактериальными агентами, включая *N.gonorrhoeae*, *C.trachomatis*, во время беременности могут привести к таким осложнениям, как преждевременные роды, задержка выхода последа, хориоамнионит, а также послеродовой эндометрит у матери и конъюнктивит, пневмония и синдром инфицирования плодного пузыря новорожденного.

При необходимости материал из влагалища и шейки матки может быть исследован на наличие таких бактериальных агентов, как *S.aureus* (синдром токсического шока), *S.galactiae* (стрептококки группы В, неонатальная инфекция), *Listeria monocytogenes* (неонатальная инфекция) и *Clostridium spp.* (септический аборт).

Несмотря на то что инфекции, вызванные *C.Trachomatis* и вирусом герпеса человека, достаточно распространены и обуславливают значительную заболеваемость, эти вопросы не будут обсуждаться в данном руководстве, лабораторная диагностика этих инфекций требует дорогостоящего оборудования и реактивов.

## Взятие материала и его транспортировка

Все материалы для анализов следует забирать во время гинекологического осмотра, используя гинекологическое зеркало. Зеркало перед манипуляцией можно смочить горячей водой, однако антисептики или кремы для гинекологического обследования применять нельзя, поскольку они могут вызвать гибель гонококков.

Для исследований на наличие дрожжей, *T.vaginalis* и бактериальных вагинозов материал (влагалищное отделяемое) может быть собран тампоном с задней стенки влагалища. Материал для исследования на наличие гонококков и хламидий следует собирать из слизистой оболочки канала шейки матки. После введения во влагалище гинекологического зеркала слизь с шейки матки следует промокнуть кусочком стерильной ваты. Затем специальный тампон вводят в канал шейки матки и осторожно поворачивают в нем в течение по крайней мере 10 с, прежде чем вынуть.

Материал из уретры, прямой кишки, ротоглотки для исследования на наличие гонококков забирают таким же образом, как у мужчин.

Во всех случаях воспаления тазовых органов необходимо по крайней мере исследовать шейку матки на наличие *N.gonorrhoeae*. Материал, полученный из маточных труб, дает более надежные результаты, однако во многих регионах наилучшим доступным материалом является материал, отобранный путем аспирации.

У новорожденных с офтальмией конъюнктивальный экссудат следует отбирать с помощью тампонов или петли.

Транспортные среды Амьеса и Стюарта являются оптимальными для транспортировки материала, отобранного из шейки матки и влагалища, исключение составляет материал, предназначенный для исследования на наличие *C.trachomatis*.

## Прямое исследование и интерпретация результатов

Прямое микроскопическое исследование вагинального отделяемого является методом выбора для постановки этиологического диагноза при вагинитах, однако этот метод менее информативен для диагностики цервицитов.

Готовят свежий мазок путем смешивания на предметном стекле вагинального отделяемого и физиологического раствора, после чего препарат накрывают сверху покровным стеклом. Предпочтение следует отдавать разведенным препаратам, которые позволяют добиться отделения клеток друг от друга, которые в противном случае представляли бы слипшийся конгломерат. Для выявления *T.vaginalis* с характерными движениями, почкующихся дрожжей и характерных клеток применяют микроскопическое исследование с увеличением  $\times 400$ . *S.albicans* могут формировать псевдомицелий, который иногда можно наблюдать во влагалищном материале. Характерные клетки могут быть обнаружены у большинства женщин с бактериальным вагинозом. Наличие гранул или посторонних включений в эпителиальных клетках цитоплазмы — менее объективный критерий, чем потеря клеточной стенки. Микроскопическое исследование свежего мазка из шейки матки не рекомендуется.

Приготовление мазков, окрашенных по Граму, является методом выбора для диагностики бактериальных вагинозов. Мазок готовят путем осторожного прокатывания (а не размазывания) тампона по предметному стеклу. В норме в вагинальном мазке содержатся преимущественно лактобактерии (крупные грамположительные палочки) и не более 5 лейкоцитов в поле

зрения. В типичных случаях бактериального вагиноза характерные клетки, покрытые мелкими грамотрицательными палочками, сочетаются со смешанной микрофлорой, состоящей из огромного числа мелких грамотрицательных и грамвариабельных палочек и коккобактерий и очень часто грамотрицательных изогнутых палочек при отсутствии более крупных грамположительных палочек. Лишь несколько (менее 5) лейкоцитов обнаруживаются в поле зрения микроскопа. Эта картина является чувствительным и специфическим индикатором бактериального вагиноза, вызванного *G.vaginalis*.

Большое число белых кровяных клеток (более 10 в поле зрения) в окрашенном по Граму мазке дает основания предполагать трихомоноз или цервицит.

Окраска мазка по Граму не очень полезна для диагностики гонококковой инфекции у женщин. Чувствительность метода исследования окрашенного по Граму мазка эндоцервикального отделяемого для выявления интрацеллюлярных грамотрицательных диплококков с целью диагностики гонореи составляют 50—70 %, а специфичность — 50—90 %, что обуславливает невысокую диагностическую значимость положительных результатов при обследовании популяции с невысокой распространенностью гонореи. Если в мазке цервикального отделяемого обнаруживают грамотрицательные интрацеллюлярные диплококки, именно так и сообщают лечащему врачу, не называя их *N.gonorrhoeae* или гонококки. Следует избегать неправильной интерпретации результатов исследования мазков, полученных из шейки матки, в которых часто обнаруживаются грамотрицательные коккобактерии и биполярно окрашенные палочки.

Исследование мазка из шейки матки наиболее информативно в плане выявления слизисто-гнойных цервицитов: наличие более 10 полиморфно-ядерных лейкоцитов в одном поле зрения микроскопа (с иммерсионной системой) является достаточно хорошим индикатором слизисто-гнойного цервицита, чаще всего вызванного *N.gonorrhoeae* и(или) *S.trachomatis*.

Исследование окрашенного по Граму мазка из материала, полученного из конъюнктивального мешка, является чувствительным и специфическим методом для диагностики конъюнктивита гонококковой этиологии. Наличие интрацеллюлярных грамотрицательных диплококков является диагностическим признаком гонококкового конъюнктивита.

### Культивирование

Материал, взятый из шейки матки, прямой кишки, уретры, конъюнктивального мешка, может подвергаться культивированию на наличие *N.gonorrhoeae* с использованием методов, описанных на с. 61. Приступать к исследованию необходимо сразу же после поступления материала в лабораторию, предпочтительно начинать исследование непосредственно в клинике. Культивирование материала на наличие гонококковой инфекции для женщины является очень важным диагностическим инструментом. Чувствительность метода культивирования материала из шейки матки для выявления гонореи составляет 80—90 %. Чувствительность метода снижается, если материал для исследования взят во время менструации.

Культивировать материал на наличие *G.vaginalis* или анаэробов в целях диагностики бактериальных вагинозов не рекомендуется, поскольку эти микроорганизмы обнаруживаются у 20—40 % женщины в отсутствие вагинальной инфекции. Наличие *G.vaginalis* в отделяемом из влагалища само по себе еще не является показанием к лечению, которое следует

назначать лишь тем больным, у которых выявлены диагностические признаки бактериального вагиноза.

По сравнению с методом микроскопического исследования метод культивирования позволяет увеличить частоту обнаружения *C.albicans* на 50—100 %. Методы культивирования обычно более эффективны в тех случаях, когда материал содержит незначительное число микроорганизмов. Вместе с тем небольшое число *C.albicans* обнаруживается во влагалище 10—30 % женщин, у которых отсутствуют какие-либо расстройства или синдромы вагинита, лишь наличие большого числа *C.albicans* следует рассматривать как признак влагалищного кандидоза. Поэтому проводить культивирование не рекомендуется. Культивирование на выявление *T.vaginalis*, выполняемое в дополнение к исследованию свежего мазка, главным образом позволяет выявить бессимптомных носителей, поэтому применять его для диагностики не рекомендуется.

### Материал из генитальных язв

Язвы половых органов — весьма распространенное явление во многих развивающихся странах. Установление этиологической роли отдельных микроорганизмов в возникновении генитальных язв и выбор тактики лечения больных представляют серьезную проблему как для микробиологов, так и для клиницистов. Часто встречаются смешанные инфекции. Генитальные язвенные поражения могут быть вызваны различными агентами, передаваемыми половым путем:

- вирус герпеса человека,
- *Treponema pallidum*,
- *Haemophilus ducreyi*,
- *Calymmatobacterium granulomatis*, возбудитель паховой гранулемы,
- *Chlamydia trachomatis*, серотипы L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>.

В большинстве промышленно развитых стран вирус генитального герпеса является наиболее частым этиологическим агентом, вызывающим генитальные язвы, а также причиной опасных для жизни осложнений у больных с иммунодефицитными состояниями и у новорожденных детей, родившихся от инфицированных матерей. Методы лабораторной диагностики генитального герпеса не подлежат обсуждению в настоящем руководстве.

Сифилис до сих пор остается наиболее серьезным заболеванием, сопровождающимся генитальными поражениями, поскольку он может приводить к тяжелым осложнениям в поздних периодах болезни и вызывать врожденный сифилис. Хотя серологические исследования играют важную роль в диагностике сифилиса на всех стадиях болезни, в настоящем руководстве обсуждается только метод исследования в темном поле. Техника постановки серологических тестов на сифилис и учет их результатов подробно описаны в других источниках<sup>1</sup>.

Во многих развивающихся регионах шанкр является основной причиной изъязвления половых органов. Клинические проявления включают боли, гнойные язвы, иногда гноящиеся паховые бубоны. Случаев осложнений поздних периодов болезни не наблюдалось. На основании клинических признаков трудно отличить шанкр от других заболеваний, сопровождающихся появлением генитальных язв.

<sup>1</sup> *Bench level laboratory manual for sexually transmitted diseases*. Неопубликованный документ ВОЗ. WHO/VDT 89.443 можно получить, направив запрос по адресу: Programme of Sexually Transmitted Diseases. World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.

Паховая гранулема характеризуется обширной деструкцией, краснотой, гранулярными генитальными изъязвлениями. Бубон образуется редко.

Хламидиозная лимфогранулема в типичных случаях сопровождается паховой и(или) бедренной лимфоаденопатией и реже образованием маленьких язв, которые проходят спонтанно. Диагностика основана на серологическом исследовании и выделении *C. trachomatis* серотипов L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>.

### Взятие материала

*Treponema pallidum*. Манипуляции следует проводить в защитных резиновых перчатках. Язву зажимают двумя пальцами и протирают поврежденную поверхность ватным тампоном, смоченным физиологическим раствором. При наличии корок их удаляют. Если выступила капля крови, ее промокают сухим ватным тампоном, после чего берут серозный экссудат, прикладывая хорошо вымытое стерильное предметное стекло к поврежденной поверхности. Каплю экссудата сверху немедленно покрывают предметным стеклом. Альтернативным методом является аспирация материала с поврежденного участка или из увеличенного лимфатического узла с помощью стерильной иглы и шприца. Готовый препарат следует немедленно подвергнуть микроскопическому исследованию в темном поле, эту процедуру должен выполнять опытный микробиолог.

*Haemophilus ducreyi*. Материал следует брать из основания язвы с помощью тампона и немедленно высевать на питательную среду. Материал можно также получить с помощью пункции паховых лимфоузлов, но в этом случае выделение *H. ducreyi* менее вероятно, чем при исследовании материала непосредственно из генитальных поражений. Транспортная среда для *H. ducreyi* не разработана.

Если имеется подозрение на паховую гранулему, идеальным способом забора материала является биопсия тканей в области активного гранулематозного поражения. Свежий мазок следует делать, используя раздавленный кусочек биопсийного материала. Альтернативным способом взятия материала является соскоб с поверхности пораженной области.

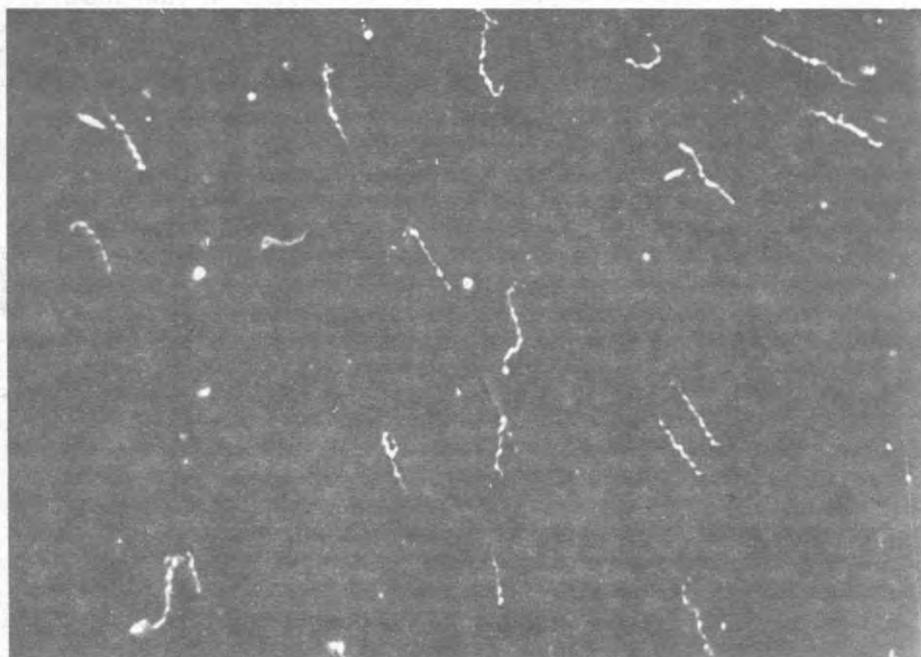
### Прямое исследование

Выявление бледных спирохет в материале, полученном из язвы, является методом выбора при диагностике первичного сифилиса. Несмотря на то что *T. pallidum* может быть окрашена (например, азотнокислым серебром), рекомендуется применять микроскопическое исследование в темном поле, поскольку этот метод наиболее чувствителен и специфичен. Для этого требуются хороший источник света и специальный конденсор. Конденсор для исследования в темном поле полностью исключает попадание на препарат прямых лучей света и пропускает только периферические лучи (которые отражаются от таких объектов, как бледная спирохета).

Наносят несколько капель иммерсионного масла на конденсор микроскопа для исследования в темном поле. Медленно опускают конденсор до тех пор, пока иммерсионное масло не окажется ниже уровня станины микроскопа. На рабочем столе микроскопа размещают предметное стекло с исследуемым материалом, а конденсор поднимают до тех пор, пока масло не коснется нижней поверхности предметного стекла. Все операции выполняют осторожно, чтобы избежать образования пузырьков воздуха в иммерсионном масле.

Используя объектив малого увеличения (x10), фокусируют его на образце.

Рис. 5. Вид *T. pallidum* при микроскопическом исследовании в темном поле



Чтобы добиться правильного освещения, производят настройку, поднимая и опуская конденсор, уменьшая диафрагму до тех пор, пока не получат самый узкий пучок света. При необходимости производят центровку света. Затем берут сухой объектив ( $\times 40$ ), настраивают его и внимательно исследуют образец. Лучшей контрастности можно добиться, если микроскопическое исследование проводить в темноте. Следует избегать дневного света.

*T. pallidum* проявляются как белые светящиеся “штрихи” на темном фоне (рис. 5). Микроорганизм идентифицируют по типичным морфологическим признакам, размеру и подвижности. Это тонкий ( $0,25-0,3$  мкм) микроорганизм длиной  $6-16$  мкм с  $8-14$  симметричными, туго закрученными спиралями. Он совершает быстрые, прерывистые движения, вращаясь вокруг своей оси, подобно штопору. Вращательные движения сопровождаются изгибами и скручиваниями в средней части. Также могут наблюдаться удлинения и укорачивания (подобно эластичной спирали эспандера). Извивающиеся, конвульсивные движения могут вызывать искривления. Если на спирохету оказать давящее воздействие другим объектом, наблюдается усиление движения искривленных спиралей. У других спирохет, не являющихся возбудителями сифилиса, спирали могут отсутствовать, быть толстыми и грубыми, их движения не похожи на движения штопора, а напоминают корчи с выраженными изгибами и частыми расслаблениями спиралей.

Выявление спирохет с морфологическими признаками и движениями, характерными для *T. pallidum*, дает основание для постановки диагноза первичного или вторичного сифилиса. У больных с первичным шанкром, у которых при микроскопическом исследовании отделяемого из шанкра в темном поле выявляются *T. pallidum*, серологическая реакция на сифилис может быть отрицательной. Она становится положительной только через несколько недель.

Отрицательные результаты микроскопического исследования в темном поле не исключают диагноза "сифилис". Отрицательный результат может быть обусловлен следующими причинами.

- Недостаточное число возбудителей в исследуемом материале (чувствительность метода микроскопического исследования в темном поле при однократном применении не превышает 50 %).
- Больной незадолго до исследования принимал антибиотики.
- Язва находилась в стадии естественного рубцевания.
- Язва не была вызвана возбудителем сифилиса.

Независимо от результатов микроскопического исследования материала из язвы в темном поле следует брать кровь для постановки серологического теста.

Для диагностики паховой гранулемы делают мазок, который фиксируют в ацетоне и окрашивают по методу Гимзы. Возбудители выявляются в виде типичных интрацеллюлярных инкапсулированных бацилл внутри макрофагов. Диагностика этого заболевания подробно описана в других источниках.

При диагностике шанкroids не рекомендуется проводить исследования окрашенного по Граму мазка, поскольку чувствительность и специфичность этого метода составляет менее 50 %. Для диагностики хламидиозной лимфогранулемы не рекомендуется исследовать мазки, окрашенные по методу Гимзы. Однако материал, взятый из язвы, следует подвергать микроскопическому исследованию в темном поле на наличие *T.pallidum*.

## Культивирование

Иногда из генитальных язв выделяют гонококки, однако значимость таких находок неясна. За исключением *N.ducreyi*, в отношении любых других видов бактерий, будь то факультативные аэробы или облигатные анаэробы, не удалось получить данных о том, что они могут вызывать заболевания, при которых появляются генитальные язвы.

Материал, предназначенный для исследования на наличие *N.ducreyi*, необходимо сразу же засеять на селективную среду — чашки с обогащенным агаром<sup>1</sup>. Среда должна быть приготовлена не ранее чем за неделю до использования. Посевы следует инкубировать при температуре 33—35 °С в атмосфере свечного газа, чашки с агаром необходимо закрыть влажным полотенцем. Спустя 48—72 ч появляются мелкие, не слизистые, желто-серые, непрозрачные или полупрозрачные колонии, которые могут заполнить все пространство на чашке. Чувствительность метода культивирования для выделения *N.ducreyi* составляет 70—80 %.

Предварительный диагноз может быть сделан на основе характерных морфологических признаков колоний на селективной среде и выявления мелких грамтрицательных плеоморфных коккобацилл, которые часто выстраиваются в цепь (стрептобациллы), параллельные цепи ("рыбья школа") или образуют конгломерат клеток. Хотя *N.ducreyi* геминезависимый микроорганизм, большинство клинических изолятов плохо растут на средах, которые используют для определения X- и Y-факторов. Почти все недавно изолированные в развивающихся странах штаммы обладают способностью к продукции β-лактамазы.

<sup>1</sup> *Bench level laboratory manual for sexually transmitted diseases*. Неопубликованный документ ВОЗ. WHO/VDT 89.443 можно получить, направив запрос по адресу: Programme of Sexually Transmitted Diseases, World Health Organization, 1211 Geneva 27, Switzerland.

<sup>2</sup> К используемому в качестве основы агару Мюллера—Хинтона добавляют 5% стерильной лошадиной крови, 1% IsoVitaleX и 3 мкг/мл ванкомицина.

# Гнойные экссудаты, раны и абсцессы

## Введение

Одним из самых распространенных инфекционных процессов, наблюдающихся в настоящее время, является продукция гнойного (иногда серозно-гнойного) экссудата как результат бактериального инфицирования полости, ткани или органа тела. Такие инфекции могут проявляться в виде достаточно простых и безобидных “папул” или множественных гнойных карманов в абсцессах в одном или нескольких анатомических участках. Экссудат состоит из белых кровяных телец, преимущественно полиморфно-ядерных лейкоцитов, инородных организмов и смеси транссудата с фибрином. При некоторых заболеваниях экссудат может быть обнаружен как “оболочка” на поверхности органа, например на поверхности мозга, при остром бактериальном менингите. В одних случаях экссудат может накапливаться в межклеточном пространстве в пределах ткани, например фурункул или подкожный нарыв, в то время как в других случаях экссудат образуется в связи с открытыми ранами, из которых вытекают мутная жидкость или гной.

Как анатомические участки, вовлеченные в экссудативные процессы, так и организмы, вызывающие эти процессы, могут быть весьма разнообразными. В действительности любой микроорганизм — представитель нормальной микрофлоры, или любой другой бактериальный агент, который имеет возможность проникнуть в организм, может быть вовлечен в процесс “производства” экссудата. Некоторые грибы, особенно те виды, которые способны размножаться в тканях тела, также могут быть вовлечены в процесс выработки экссудата. Возбудители вирусных инфекций в отличие от грибов и бактерий очень редко являются продуцентами гнойного экссудата.

Микробиолог должен быть осведомлен о разнообразии анатомических зон и микроорганизмов, которые могут быть вовлечены в инфекционный процесс, быть готовым к проведению соответствующего макроскопического и микроскопического исследования материала, а также уметь проводить первичный посев с правильным подбором питательных сред, чтобы вырастить большинство микроорганизмов, способных участвовать в выработке экссудата. Вслед за выделением возбудителя в чистой культуре необходимо как можно быстрее провести его идентификацию и определить чувствительность к антибиотикам.

Взаимосвязь между лечащим врачом и микробиологом особенно важна при постановке диагноза и выборе тактики лечения больного при наличии заболевания, сопровождающегося гнойной инфекцией. Микробиолог должен сотрудничать с лечащим врачом, чтобы обеспечить взятие материала по всем правилам и незамедлительную его доставку в лабораторию для безотлагательного проведения необходимых исследований.

## Наиболее распространенные клинические состояния и наиболее часто встречающиеся этиологические агенты

### Хирургический материал

Хирургический материал может быть получен при пунктировании местных абсцессов или во время других хирургических процедур. Хирургу следует посоветовать отбирать несколько маленьких кусочков различных тканей и имеющиеся образцы гнойного экссудата. Если возможно, не следует

пользоваться ватным тампоном. Экссудат необходимо отбирать стерильным шприцем с иглой. Если использован ватный тампон, следует отобрать как можно больше экссудата и поместить тампон в соответствующую емкость для отправки в лабораторию. После поступления материала в лабораторию следует проанализировать сопроводительную информацию и затем составить план исследования для выявления микроорганизмов, которые могут быть обнаружены в присланных для анализа образцах.

Некоторые примеры клинических состояний и обнаруживаемых при этом микроорганизмов в различных образцах хирургического материала приведены ниже:

- *Перитонеальная полость* наиболее часто содержит грамотрицательные кишечные бактерии, грамотрицательные анаэробные палочки (*Bacteroides fragilis*) и клостридии.
- *Межклеточный абсцесс* может содержать любые микроорганизмы, как одного вида, так и смешанные: наиболее часто выделяются грамположительные кокки и грамотрицательные бактерии. Необходимо учитывать возможность присутствия анаэробных бактерий и амеб в зависимости от места расположения абсцессов.
- *Лимфатические узлы* наиболее часто вовлекаются при системных инфекциях. Они увеличиваются в размерах и часто имеют тенденцию к аккумулярованию гнойного экссудата. Если лимфатический узел флюктуирует, содержащаяся в нем жидкость может быть пунктирована лечащим врачом. Биоптат или пунктат лимфатического узла ребенка следует исследовать на наличие *Mycobacterium tuberculosis* или других микобактерий. Дополнительно материал исследуют на наличие стафилококков, стрептококков и грамотрицательных кишечных бактерий; лимфатический узел может быть хорошим материалом для диагностики системных и подкожных микозов (гистоплазмоз, споротрихоз).
- *Кожные покровы и подкожная клетчатка* являются локусами как для абсцессов, так и раневых инфекций. Подкожные абсцессы, как правило, вызываются стафилококками. Открытые, поврежденные, мокнущие кожные покровы часто поражены *beta*-гемолитическим стрептококком и (или) стафилококком, как при импетиго. Другие разновидности кожных поражений, требующие хирургического вмешательства, часто рассматриваемые как результат внутрибольничных инфекций, — это пролежни. Бактерии, являющиеся комменсалами кожи или микрофлорой кишечника и обладающие способностью к пролиферации на поверхности язвы, имеют неприятный запах и вид. Микроорганизмы, которые наиболее часто изолируют из биоптатов, являются кишечными бактериями; эти же микроорганизмы могут быть обнаружены при культивировании поверхностных экссудатов. Не всегда возможно выявить роль этих микроорганизмов в возникновении пролежней, однако для лечения требуется поддерживать язву в чистоте, сухой и свободной от бактерий. Иногда возбудитель из язвы может проникнуть в кровяное русло, что вызывает серьезные осложнения.
- *Ожоги*, особенно ожоги II и III степени склонны к инфицированию различными видами бактерий. Очень важно, чтобы при хирургической обработке раны был выполнен забор материала для культивирования. Наиболее часто обнаруживаемыми бактериальными агентами являются стафилококки и *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Экссудаты*. Иногда серозная или гнойная жидкость собирается в полостях, в которых в норме содержится очень маленький объем стерильной жидкости, например в перикардиальной сумке, плевральной полости, суставах или синовиальных сочленениях. Пунктирование полости иглой в асептических условиях позволяет взять материал для исследования, из которого может быть выделен и идентифицирован возбудитель. Обычно причиной появления экссудатов являются бактерии, однако грибы и вирусы также могут быть ответственными. Обычно инфекции моноспецифичны, однако встречаются также смешанная

аэробная и анаэробная инфекции. Пункция из плевральной полости может выявить пневмококки, стрептококки, *H. influenzae*, анаэробные стрептококки или *Bacteroides* spp.

### Проникающие раны

Различные поражения проникающего характера, которые связаны с повреждением кожных покровов, как правило, содержат смесь микроорганизмов, эти микроорганизмы обычно являются частью микрофлоры кожи или нормальной микрофлоры почвы или воды. При проникающих ранениях может повреждаться кишечник, что вызывает необходимость принятия серьезных лечебных мер, поскольку кишечная микрофлора может способствовать инфицированию раны. При укусах животных будет также присутствовать микрофлора полости рта укусившего животного. Во многих частях света бешенство, являющееся следствием укуса животного, — одно из самых опасных инфекционных заболеваний; при подозрении или установленном случае бешенства необходимо проведение безотлагательного лабораторного исследования, а также обязательной профилактической иммунизации. Однако в настоящем руководстве детального описания бешенства не приводится.

Проникающие или резаные раны могут возникать от ударов острыми или тупыми предметами. Металлические, стеклянные, деревянные и другие предметы часто являются причинами проникающих ранений, независимо от того, случайно или преднамеренно они были применены. Столбняк возникает в результате проникающего ранения и является угрожающей жизни болезнью для неиммунизированного индивидуума. Аналогично столбняку может произойти заражение ботулизмом, но это заболевание может остаться нераспознанным, если лечащий врач и микробиолог не подозревают о возможности инфицирования. Диагноз столбняка и ботулизма наилучшим образом устанавливается клинически, лабораторное подтверждение может быть обеспечено центральной справочной лабораторией. Лица, работающие с животными или продуктами животноводства, подвержены риску инфицирования спорами *Bacillus anthracis*, которые могут проникать через мелкие повреждения или царапины кожи и образуют типичный черный струп антракса. Другие почвенные микроорганизмы, такие, как *Clostridium perfringens*, могут проникать глубоко в рану и приводить к газовой гангрене.

*Укусы животных или царапины* — частое явление как в городской, так и в сельской местности. Укусить могут домашние, сельскохозяйственные или дикие животные. При этом в первую очередь следует помнить о бешенстве. Если возможность заражения бешенством исключена, можно рассматривать другие вероятные этиологические агенты, которые многочисленны и разнообразны. Ротовая полость животных содержит гетерогенную флору, состоящую из аэробных и анаэробных бактерий, дрожжей, простейших и вирусов. Инфекции, возникающие в результате укуса или оцарапывания, вызывают преимущественно бактериальные агенты. Наиболее яркий пример — инфекция, вызванная *Pasteurella multocida*, которая нередко развивается вследствие укуса собаки или кошки, если место укуса не было соответствующим образом обработано. Укус человека иногда может вызвать серьезную смешанную инфекцию, вызванную аэробными и анаэробными микроорганизмами.

### Внутрибольничные раневые инфекции

Одна из главных забот при выполнении всевозможных диагностических процедур и лечении госпитализированных больных — предотвратить воз-

возможность нанесения какого-либо вреда здоровью пациента. К сожалению, 5—10 % госпитализированных больных приобретают инфекцию во время пребывания в стационаре. Внутрибольничные инфекции приводят к серьезным материальным затратам, обычно их легко избежать, можно также существенно снизить их уровень. Известно, что большинство внутрибольничных инфекций возникает в хирургических отделениях. Частота инфицированных послеоперационных ран в различных стационарах разная; в условиях одного стационара наиболее частые осложнения наблюдаются у больных с хирургическими вмешательствами и в брюшной и грудной полостях, а также на суставах. Инфицирование хирургических ран может возникнуть в течение короткого времени или через несколько дней после операции. Область инфицирования может быть либо ограничена хирургическим швом, либо распространяться на все операционное поле. Наиболее частым «виновником» при этом является *Staphylococcus aureus* (всегда пенициллинорезистентный, а в настоящее время и метициллинорезистентный), следующие по значимости — *E. coli* и другие кишечные бактерии. Анаэробные бактерии толстого кишечника больного могут попасть на операционное поле и вызвать смешанную инфекцию, которая очень быстро распространяется в стационарах, где программа профилактики послеоперационных инфицированных ран не уделяется должного внимания. *Bacteroides fragilis* и иногда *Clostridium perfringens* могут проникать в кровяное русло и приводить к сепсису и быстрому фатальному исходу послеоперационного инфекционного процесса.

Операции в ротовой полости или стоматологические вмешательства хотя и редко, но служат причинами очень серьезных инфекций, это происходит, когда доступ для операционного вмешательства в свищ осуществляется через кожу лица или шеи, а выделения содержат «серные» гранулы актиномицетов.

## Взятие и транспортировка материала

Не представляется возможным описать в этом разделе детали методики взятия материала из каждого типа раны, абсцесса и т.д. Должно быть совершенно ясно, что эта задача требует тесного сотрудничества персонала лаборатории и лечащего врача. Во множестве случаев это единственная возможность получить материал для исследования, поскольку во многих ситуациях «вторичного» материала для исследования просто не существует. В связи с этим выполненное по всем правилам взятие материала, его транспортировка и хранение чрезвычайно важны и каких-либо отступлений от принятой процедуры следует избегать. После того как материал получен, его упаковывают, отправляют в лабораторию, где начинают лабораторное исследование без промедления. После предварительного осмотра должно быть выполнено полное исследование с целью выделения культур возбудителей; оставшуюся часть материала помещают в контейнер, маркируют, закупоривают и хранят в холодильнике до тех пор, пока полностью не отпадет необходимость в дополнительном лабораторном исследовании материала.

## Абсцессы

В случае обнаружения абсцесса или множественных абсцессов лечащему врачу или хирургу следует посоветоваться с микробиологом, чтобы определить дальнейшие действия. Техника забора гноя и кусочков ткани из абсцесса аналогична той, что применяется при хирургической операции. Максимально возможное количество гнойного материала следует забирать шприцем, взятый материал переносят в стерильную емкость в асептических условиях. В том случае, если стерильной емкости не оказалось, взятый

материал может быть оставлен в шприце с закрытой иглой. В этом случае сам шприц необходимо доставить в лабораторию. Доставленный материал следует незамедлительно подвергнуть лабораторному исследованию; в доставленном материале могут оказаться как аэробные, так и анаэробные культуры.

Аналогичные ситуации могут возникнуть, когда при хирургических вмешательствах совершенно по другим причинам случайно обнаруживаются единичный или множественные абсцессы в каком-либо органе, грудной или брюшной полости, тазовых органах. Учитывая такую возможность, лабораториям следует подготовить специальную стерильную укладку (набор) для взятия содержимого абсцессов и быстрой доставки материала для исследования. Следует принять меры к недопущению забора малого количества материала с помощью тампона, когда в действительности имеется большой объем экссудата. Тампон в виде исключения может быть использован только для сбора гноя, когда имеется очень малое его количество или когда гной отбирают из анатомической области, требующей обращения с особой осторожностью, например из глаза. Когда кусочки ткани из области абсцесса получены для исследования, его необходимо измельчить в маленьком объеме стерильного бульона или разрезать на мелкие части, используя стерильные ножницы. Аэробные и анаэробные культуры могут быть приготовлены, как описано в разделе "Культивирование".

### Инфицированные рваные, проникающие ранения, послеоперационные раны, ожоги, пролежни

Невозможно сформулировать общие стандартные требования для взятия материала. Тем не менее целесообразно следовать определенным фундаментальным рекомендациям, которые дают возможность получать материал соответствующего качества для проведения лабораторных анализов. После тщательной обработки операционного поля хирург определяет места, где скапливается гной, расположены некротические ткани, выделяется газ (крепитация) или наблюдаются другие аномальные признаки. Частицы пораженных тканей, предназначенные для лабораторного исследования, помещают в стерильную марлю для последующей обработки, как описано выше. Гной или другой экссудат должен быть аккуратно собран и помещен в стерильную пробирку. При необходимости могут быть использованы тампоны.

### Свищи или отделяемое лимфатических узлов

В тех случаях, когда свищи или воспаленные лимфатические узлы самопроизвольно дренируются, этот материал должен быть тщательно собран с помощью стерильной пастеровской пипетки с резиновой грушей и помещен в стерильную пробирку. Если самопроизвольного дренирования не наблюдается, хирургу следует получить материал, используя стерильный шприц с иглой или зонд. Использование тампона, опять-таки по возможности, следует избегать.

### Экссудаты

Ненормально большой объем скопившейся жидкости в полостях тела, таких, как плевральная полость, брюшная полость, коленный сустав, требует вмешательства хирурга, который в асептических условиях производит прокол, собирает жидкость в стерильную емкость, организует быструю

доставку материала в лабораторию для микробиологического и цитологического исследования. В тех случаях, когда продукция экссудата постоянно продолжается и поставлен открытый дренаж, необходимо собрать дренажную жидкость в асептических условиях для соответствующего микробиологического исследования и постановки других тестов.

## Макроскопическое исследование

Провести оценку образцов гноя или отделяемого ран, отобранных с помощью тампона, очень трудно, особенно когда тампоны были помещены в транспортную среду. Когда образцы гноя получены в стерильной емкости или шприце, опытному работнику лаборатории следует внимательно исследовать их для выявления особенностей цвета, консистенции и запаха.

### Цвет

Цветовая гамма гноя варьирует от желто-зеленого до красно-коричневого. Красный цвет обычно является следствием наличия в нем крови или гемоглобина. Пунктат из первичного амебиозного печеночного абсцесса имеет желатинообразную консистенцию и светло-коричневый или темно-коричневый цвет. Гной из послеоперационных или травматических ран (ожогов) может быть окрашен в зелено-голубой цвет за счет пигмента пиоцианина, вырабатываемого *Pseudomonas aeruginosa*.

### Консистенция

Консистенция гноя может варьировать от очень жидкой до очень густой и клейкой. Экссудаты, полученные из суставов, плевральной полости, перикардального мешка или брюшины, обычно жидкие с возможной градацией от серозных до гнойных.

Гной, полученный из дренажа свищей шейной области, необходимо исследовать на наличие маленьких желтых гранул "серы", которые являются колониями волокон *Actinomyces israelii*. Наличие серных гранул позволяет предположительно поставить диагноз шейно-лицевого актиномикоза. Мелкие гранулы различного цвета (белый, черный, красный, коричневый) типичны для мицетомы — гранулематозной опухоли, которая обычно поражает нижние конечности (так называемая мадурская стопа) и характеризуется множественными абсцессами и дренированием свищей. Окрашенные гранулы соответствуют "волоконистым" бактериям или мицелию грибов.

Гной из туберкулезного "холодного абсцесса" (с наличием нескольких характерных признаков воспаления) иногда сравнивают с мягким сыром и называют "казеином" или "казеиновым гноем".

### Запах

Отвратительный фекальный запах — один из главных характерных признаков анаэробной или смешанной аэробно-анаэробной инфекции, хотя этого может быть недостаточно в некоторых случаях. О характерном запахе вместе с результатами микроскопии мазка, окрашенного по Граму, следует сразу же сообщить лечащему врачу, поскольку это может быть полезно для эмпирического подбора соответствующего антибиотика. Это также поможет определить, необходимо ли исследование материала на наличие анаэробов.

## Микроскопическое исследование

Каждый образец следует окрашивать по Граму и подвергать микроскопии. В некоторых частных случаях или по требованию лечащего врача исследуют нативный материал или готовят мазок, окрашенный по Цилю—Нильсену.

### Окраска по Граму

С помощью бактериологической петли берут материал из наиболее гнойной части пробы и наносят его на чистое предметное стекло. Когда для исследования доставлен материал, отобранный тампоном, предметное стекло прежде следует простерилизовать на пламени горелки Бунзена и дать ему остыть. Затем делают осторожные вращательные движения тампоном по поверхности предметного стекла, не допуская при этом излишне сильного надавливания. Высушивают мазок на воздухе (защищая его от мух) или в термостате. Фиксируют с помощью высокой температуры, окрашивают и микроскопируют в иммерсионном масле, используя объектив  $\times 100$ . Внимательно просматривают мазок, отмечая наличие и количество (обозначая +) следующих микроорганизмов:

- полиморфно-ядерные гранулоциты (клетки гноя);
- грамположительные кокки, расположившиеся в виде грозди винограда (предположительно стафилококки);
- грамположительные кокки, расположившиеся цепями (предположительно стрептококки);
- грамотрицательные палочки, сходные с коли-формами (*Escherichia coli*, *Klebsiella* и т.д.), другие энтеробактерии (*Proteus*, *Serratia* и т.д.), неферментирующие палочки (*Pseudomonas* spp.) или облигатные анаэробы (*Bacteroides* spp.);
- крупные прямые грамположительные палочки с “обрубленными” концами — предположительно *Clostridium perfringens* — этиологический агент газовой гангрены или *Bacillus anthracis* — этиологический агент сибирской язвы;
- разнообразие бактериальные клетки, включая стрептококки, грамположительные и грамотрицательные палочки разных размеров, включая веретенообразные формы палочек; такая картина свидетельствует о “смешанной анаэробной флоре”, о чем должно быть сообщено лечащему врачу;
- *Candida* или другие дрожжевые клетки, которые выглядят как овальные грамположительные почкующиеся сферы, часто формируют дочерний псевдомицелий.

Серные гранулы актиномицетов или гранулы мицетомы должны быть раздавлены на стекле, окрашены по Граму и исследованы на наличие тонких фрагментарных грамположительных волокон.

### Прямая микроскопия

По требованию лечащего врача или когда имеются основания предполагать грибковую или паразитарную инфекцию, следует проводить микроскопию нативного материала. Если гной слишком густой, его берут бактериологической петлей, помещают на предметное стекло, где смешивают с каплей физиологического раствора. Когда исследуют материал на наличие грибов, для очищения образца гной смешивают с каплей 10 % гидроокиси калия. Сверху материал покрывают покровным стеклом и, используя объектив  $\times 10$  и  $\times 40$ , внимательно исследуют на наличие:

- активно движущихся амёб в пунктате из печеночных абсцессов;
- дрожжевых клеток *Histoplasma capsulatum*, var. *duboisii*, *Blastomyces dermatitidis* (в эндемичных зонах), *Candida* spp.;
- грибковых гифов и бактериальных нитей в раздавленных гранулах мицетомы;
- паразитов (в эндемичных странах), таких, как микрофилярии, крючья *Echinococcus*, яйца *Schistosoma*, *Fasciola* и *Paragonimus*.

### Окраска кислотоустойчивых микроорганизмов (по Цилю—Нильсену)

Окраска мазка по Цилю—Нильсену выполняется по запросу лечащего врача. Окрашивать мазок указанным методом целесообразно также в тех случаях, когда при микроскопии гнойных мазков бактериальная микрофлора отсутствует в окрашенных по Граму мазках либо обнаруживаются лишь слабоокрашенные грамположительные коринсформные палочки. Туберкулезные палочки чаще всего ожидают обнаружить в гное или гнойном экссудате из плевральной полости, суставов, костных абсцессов, лимфатических узлов. Нетуберкулезные (так называемые атипичные) кислотоустойчивые микроорганизмы иногда обнаруживаются в абсцессах ягодицы, образующихся после внутримышечных инъекций длинной иглой. Такие абсцессы часто вызывают быстрорастущие микобактерии, принадлежащие к группе *Mycobacterium fortuitum — chelonae*. В тропических зонах отделяемое или скарификат из некротизированных кожных язв, находящихся на руках или ногах, может содержать медленно растущие кислотоустойчивые палочки, называемые *M. ulcerans* (язва Бурули). *M. marinum* — другая медленно растущая кислотоустойчивая палочка, которая может быть обнаружена в хронических изъязвленных узелковых поражениях на руках, ногах, других открытых участках кожных покровов у пловцов и рыбаков.

### Культивирование

В том случае, когда при микроскопическом исследовании обнаружены бактерии или грибы, материал следует засеять на соответствующие питательные среды. Независимо от результатов микроскопического исследования все пробы гноя или экссудата следует посеять как минимум на три питательные среды:

- кровяной агар для выделения стрептококков и стафилококков;
- агар Мак-Конки для выделения грамотрицательных палочек;
- бульон, который может служить средой обогащения как для аэробов, так и для анаэробов, например тиогликолевый бульон или среда из вареного мяса.

Количество посевного материала определяют в зависимости от результатов микроскопии, оно колеблется от одной бактериологической петли до нескольких капель. Если в окрашенном по Граму мазке наблюдалось очень большое число микроорганизмов, исследуемый материал перед посевом на плотные питательные среды можно даже разбавить небольшим количеством стерильного бульона. В том случае, когда посев производят тампоном, им осторожно прикасаются к небольшой площади агара, рассеивая затем материал по оставшейся поверхности бактериологической петлей. Если тампон сухой, его прежде следует смочить небольшим количеством стерильного бульона или физиологического раствора. В любом случае техника посева должна обеспечить рост отдельных колоний, которые могут быть использованы для идентификации и постановки тестов на определение чувствительности к антибиотикам.

Наилучшим для посева является кровяной агар, предварительно подсушенный в течение 20 мин в термостате; это необходимо для снижения риска зарастания чашек за счет очень быстрого роста протей. Засеянный материал инкубируют при температуре 35 °С в атмосфере свечного газа. Обычно все питательные среды следует инкубировать в течение 2 дней, ежедневно контролируя наличие роста. Для обнаружения “привередливых” в отношении питательных сред микроорганизмов может потребоваться длительная инкубация (1—2 нед и более). Если рост появился в бульоне, следует приготовить мазок, окрасить его по Граму, исследовать под микроскопом и в зависимости от результатов вести дальнейшее культивирование материала на соответствующих питательных средах. Дополнительные питательные среды следует использовать или при наличии специального запроса, или по результатам микроскопического исследования, например, в случаях, перечисленных ниже.

- При выявлении стафилококков целесообразно дополнительно использовать маннито-солевой агар для получения роста чистой культуры и предварительной дифференциации между *S. aureus* и другими кокками.
- При выявлении стрептококков их идентификацию можно ускорить, положив дифференцирующий диск с бацитрацином на зону первичного посева.
- При обнаружении дрожжей или грибов пробу следует засеять в две пробирки с агаром Сабуро с декстрозой, одну из них инкубируют при 35 °С, другую — при комнатной температуре; наблюдение за посевами ведут в течение 1 мес (кровяного агара вполне достаточно для выделения *Candida* spp.).
- При обнаружении в мазке, окрашенном по Цилю—Нильсену, кислотоустойчивых палочек материал засевают в три пробирки со средой Левенштейна—Йенсена. В том случае, когда в мазке также выявлены некислотоустойчивые бактерии, прежде следует провести деконтаминацию материала. Быстрорастущие микобактерии, такие как *M. fortuitum*, могут погибнуть в процессе деконтаминации; они дают рост на кровяном агаре и агаре Мак-Конки в течение 3—7 дней. Ветвистые, волокнистые, частично кислотоустойчивые палочки из гноя, полученного с плевры или из мозгового абсцесса, могут оказаться *Nocardia asteroides*, которые вырастают на кровяном агаре в течение нескольких дней.
- Гной у больных артритами, плевритами, остеомиелитами, воспалением подкожной клетчатки, особенно полученный от детей в возрасте до 5 лет, следует высевать на шоколадный агар для выявления *H. influenzae*.
- Культивирование в строго анаэробных условиях необходимо осуществлять, если в окрашенном по Граму материале обнаружена “смешанная анаэробная флора”, а также когда этот материал имеет типичный неприятный запах. Анаэробный кровяной агар также необходим для роста *Astipomyses*. Анаэробное культивирование потребуется, если лечащий врач подозревает вызванную клостридиями газовую гангрену. Методы анаэробного культивирования описаны в главе “Анаэробная бактериология”.

## Идентификация

За исключением бактериального загрязнения посторонней микрофлорой из внешней среды или с кожи (например, *Staphylococcus epidermidis*), все другие микроорганизмы, выделенные из ран, гноя или экссудата, следует рассматривать как значимые и предпринимать усилия для их идентификации. Однако полная идентификация необходима не всегда, особенно в случае смешанной микрофлоры.

Бактерии и грибы, выделенные из гноя или экссудата, могут принадлежать почти ко всем группам и видам. Критерии, позволяющие проводить

идентификацию, приведены в этом разделе лишь для "пиогенных" стафилококков, наиболее часто встречающихся в гное, а также для двух других патогенов — *Pasteurella multocida* и *Bacillus anthracis*, которые хотя и редко выделяются из ран или инфекционных поражений кожных покровов, но очень важны для определения тактики лечения больного. Полное описание методов идентификации можно найти в специальной литературе по клинической микробиологии. В любом случае сначала внимательно исследуют отдельно расположенные колонии, выявляют колонии каждого типа, готовят окрашенный по Граму мазок и затем дают характеристику микроорганизмам, выявленным при его микроскопическом исследовании.

## Стафилококки

Стафилококки — бактериальные агенты, наиболее часто ассоциирующиеся с продукцией гноя. Для клинических целей стафилококки могут быть разделены на обладающие и не обладающие коагулазной активностью. Обладающие коагулазной активностью стафилококки принадлежат к виду *S.aureus*, которые представляют наибольший клинический интерес. Из нескольких видов стафилококков, не обладающих коагулазной активностью, в настоящем разделе описаны только два вида стафилококков (*S.epidermidis* и *S.saprophyticus*).

Несмотря на то что *S.aureus* присутствует в обычной комменсальной микрофлоре носа (указанный микроорганизм обнаруживается у 40 % взрослых здоровых людей), кожи и кишечного тракта, он вызывает импетиго, фурункулез, абсцессы, раневую инфекцию, инфицирование язв и ожогов, остеомиелиты, маститы (абсцессы грудной железы), эмпиему плевры, гнойные миозиты, синдром токсического шока, а также другие виды гнойной инфекции.

*S.epidermidis* также является обычным комменсалом кожи, носа и других слизистых оболочек, он обладает очень низкой патогенностью. Однако его наличие в гное не всегда следует расценивать как результат вторичной контаминации гноя микрофлорой кожи. Несмотря на то что *S.epidermidis* обладает низкой инфективностью, он может вызвать инфицирование кожи в тех местах, где поставлен катетер, канюля или какой-нибудь другой медицинский прибор. Инфекционные процессы, обусловленные *S.epidermidis*, доставляют особые хлопоты в сердечно-сосудистой и ортопедической хирургии, вызывая инфицирование имплантатов — искусственных клапанов сердца или искусственных тазобедренных суставов.

*S.saprophyticus* известен как обычный возбудитель инфекций мочевого тракта у молодых женщин, занимая второе место после *E.coli* среди некоторых групп населения.

Стафилококки хорошо растут в аэробных условиях на кровяном агаре и образуют непрозрачные белые или кремовые колонии диаметром 1—2 мм после суточной инкубации. Они уникальны тем, что растут на питательных средах с высоким содержанием поваренной соли, например на маннито-солевом агаре. Их можно отличить от стрептококков по морфологическим признакам и по продукции каталазы. Наличие каталазной активности у стафилококков выявляют следующим образом: собирают петлей с чашки немного выросшей культуры, помещают ее в капиллярную трубочку, которую переносят в маленькую лабораторную пробирку, в нее добавляют каплю 3 % перекиси водорода и закрывают ватной пробкой. Появление пузырьков кислорода является индикатором наличия каталазной активности. В табл. 11 представлены дифференциальные признаки трех основных видов рода *Staphylococcus*.

Таблица 11. Отличительные признаки наиболее значимых в медицине видов стафилококков

	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.saprophyticus</i>
Коагулазная активность	+	0	0
Реакция окисления маннита на маннито-солевом агаре <sup>а</sup>	Кислая (желтый)	Нейтральная (красный)	Кислая (желтый)
Пигментация колоний <sup>а</sup>	Серые, кремовые или желтые	Белые	Белые
Чувствительность к новобицину <i>in vitro</i>	Чувствителен	Чувствителен	Резистентен <sup>б</sup>

<sup>а</sup> Возможны исключения.

<sup>б</sup> Зона задержки роста размером менее 16 мм при использовании 5-микрограммового диска и постановке опыта по стандартной методике определения чувствительности дискодиффузионным методом.

Учитывая важность коагулазного теста для идентификации *S.aureus*, его постановка будет рассмотрена подробно. Коагулаза является ферментом, способствующим образованию сгустка плазмы. Стафилококковая коагулаза существует в двух формах: связанная коагулаза, или фактор сгусткообразования, которая демонстрируется в слайд-тесте, и свободная коагулаза, которая демонстрируется в пробирочном тесте.

- Слайд-тест. На чистое стекло наносят одну или несколько одинаковых колоний стафилококка и эмульгируют в капле физиологического раствора. Суспензия должна быть достаточно густой. Погружают проводочную петлю в плазму, вносят ее в бактериальную суспензию и помешивают. Сгусткообразование наблюдают в течение 10 с. Ложноотрицательная реакция в слайд-тесте наблюдается у 10 % штаммов *S.aureus*. При отрицательных результатах слайд-теста в отношении выделенной культуры, которая представляется патогенной на основании иных факторов (пигмент, клинический источник), необходимо провести повторное определение в пробирочном тесте.
- Пробирочный тест. Несколько капель плазмы (0,5 мл) помещают в стерильную пробирку размером 12x75 мм и добавляют несколько капель бульонной культуры исследуемого штамма. Суспензия эквивалентной плотности также может быть приготовлена непосредственно из колоний, выросших на кровяном агаре. Пробирку помещают в термостат при температуре 35 °С, за результатами (сгусткообразованием) наблюдают в течение 4—18 ч.

Для постановки реакции может быть использована свежая человеческая или кроличья плазма, обработанная этилен-диамин-тетраацетатной кислотой (ЭДТК). Ее следует хранить в холодильнике в небольших объемах (1,0 мл); ее действие проверяют на культурах *S.aureus* и *S.epidermidis*, проводя контрольные тесты параллельно тестам с исследуемой культурой.

## *Pasteurella multocida*

Значительное число грамотрицательных микроорганизмов передается при укусах животных, они могут вызывать инфекционные болезни человека; чаще всего возбудителем является *Pasteurella multocida*. *P.multocida* — комменсал, обнаруживаемый в нормальной микрофлоре ротовой полости многих животных. В результате укуса *P.multocida* проникает через поврежденную кожу и может вызвать интенсивное воспаление подкожной клетчатки, проникать в суставы, вызывая артриты. Описаны также случаи остеомиелита, бактериемии и даже менингита.

*P.multocida* следует целенаправленно искать в отделяемом из раны, если

установлено или предполагается, что эта рана возникла в результате укуса животного. *P.multocida* — очень мелкая грамотрицательная, неподвижная коккобацилла. Микроорганизм хорошо растет на кровяном агаре при температуре 35 °С, но его рост полностью угнетается желчными солями, которые содержатся в селективных для кишечных бактерий средах (таких, например, как агар Мак-Конки). После суточной инкубации на кровяном агаре вырастают мелкие, негемолитические, прозрачные, слизистые (за счет наличия капсул у вирулентных форм) колонии.

Биохимическая идентификация основана на следующих свойствах:

- ферментация глюкозы без газа: *P.multocida* растет на агаре Клиглера с железом с окислением столбика агара;
- оксидазный тест всегда отрицательный;
- положительный тест на каталазу;
- редукция нитратов в нитриты (0,1 % нитрат калия в питательном бульоне);
- уреазоотрицательная реакция;
- индолположительная реакция — тест в бульоне (триптиказо-сосевый бульон) или в среде, предназначенной для определения подвижности, индолообразования и уреазной активности после 48-часовой инкубации.
- высокая чувствительность к пенициллину при использовании дискодиффузионного метода определения.

### *Bacillus anthracis*

Род *Bacillus* включает в себя множество видов аэробных, спорообразующих, грамположительных палочек, широко распространенных в почве. Вид *B.anthraxis* очень важен с точки зрения общественного здравоохранения как возбудитель инфекций кожных покровов. Другие виды, выделяемые из ран или гноя, обычно являются “посторонней” микрофлорой — контаминантами или оппортунистической микрофлорой.

*B.anthraxis* поражает преимущественно крупный рогатый скот, овец, коз или других домашних животных. Этот микроорганизм также поражает диких животных. Сибирская язва вызывает заболевания людей, особенно жителей Африки и Азии, работающих или живущих в тесном контакте с домашними животными. К инфицированию людей может привести контакт с продуктами животного происхождения, контаминированными спорами возбудителя сибирской язвы, к числу таких продуктов относятся шерсть, шкура, мех, кости.

Самой распространенной формой заболевания у людей является кожная форма сибирской язвы, которая может прогрессировать до септицемии и менингита. Споры проникают через поврежденную кожу и вызывают везикулярную язву с некротизирующим центром, окруженным зоной интенсивного отека (“злокачественная пустула”). В везикулярной жидкости, окрашенной по Граму, наблюдаются большие грамположительные инкапсулированные палочки с обрубленными концами без спор.

*B.anthraxis* растут в аэробных условиях. На кровяном агаре они образуют большие, плоские, серые колонии до 5 мм в диаметре с грубой поверхностью, строение тканей представляет разного возраста волоски (голова медузы). Этот признак очень важен, поскольку на этом этапе лабораторной диагностики позволяет дифференцировать очень патогенную *B.anthraxis* от обычно безвредных сапрофитных видов.

Предварительная дифференциация должна базироваться на отсутствии гемолиза, чувствительности к пенициллину и отсутствии подвижности, характерных для *B.anthraxis*. В отличие от этого большинство сапрофитных

видов рода *Bacillus* подвижны и обязательно обладают гемолитической активностью. Предположительная идентификация может быть основана на выявлении этих трех характерных свойств. Для окончательного диагноза (для подтверждения диагноза) чистая культура выделенного микроорганизма должна быть немедленно направлена в центральную ветеринарную или медицинскую лабораторию.

*B. anthracis* является весьма патогенным микроорганизмом, в связи с этим обращаться с пробами, а также проводить культивирование следует с большой осторожностью, чтобы не допустить загрязнения окружающей среды и инфицирования лабораторного персонала.

### Определение чувствительности к антибиотикам

Антибиотики не всегда необходимы для лечения больных с язвами, абсцессами, экссудатами. Рациональное хирургическое вмешательство, дренаж и обработка раны обычно являются более важными, чем применение антибактериальных лекарственных средств. Результаты определения чувствительности микроорганизма к антибиотикам могут быть получены в течение 48 ч после доставки образцов для исследования.

Обычно не требуется определять чувствительность к антибиотикам бактерий, принадлежащих к видам с известной чувствительностью, таких, как стрептококки, *Pasteurella*, *Actinomyces*, которые почти все без исключения чувствительны к пенициллину.

Для энтеробактерий, не ферментирующих грамтрицательных палочек и стафилококков, следует использовать стандартный дискодиффузионный метод (Керби—Бауэра). Исследовать нужно только антибиотики, которые назначает лечащий врач. Новые или дорогостоящие антибиотики исследовать на их активность в отношении возбудителя нужно только по специальному запросу лечащего врача или в тех случаях, когда возбудитель устойчив к другим препаратам.

При определении чувствительности стафилококков как *S. aureus*, так и *S. epidermidis*, нередко возникают трудности. Около 80 % штаммов, выделенных от людей, обладают  $\beta$ -лактамазной активностью и устойчивы к пенициллину и ампициллину. Инфекции, вызванные пенициллиноустойчивыми стафилококками, часто лечат  $\beta$ -лактамазоустойчивыми пенициллинами из группы метициллина (оксациллин, клоксациллин и др.). В настоящее время для определения чувствительности этой группы рекомендуется оксациллиновый диск (1,0 мкг). Диск с оксациллином стабилен и подходит для определения чувствительности всей группы. Такая резистентность часто оказывается гетерорезистентного типа, т.е. резистентной оказывается только часть популяции микроорганизмов. Поскольку гетерорезистентность стафилококков легче установить при низких температурах, инкубацию следует проводить при температуре не выше 35 °С. Рост гетерогенной популяции выглядит совершенно иначе — наблюдаются различия в установленных размерах зон задержки роста, еще более неясный вид картина приобретает от наличия мелких колоний, которые неверно могут быть приняты за постороннюю микрофлору. Если такой рост появился, следует провести окраску по Граму с тем, чтобы исключить наличие посторонней микрофлоры.

Гетерорезистентные штаммы в клинической картине устойчивы ко всем цефалоспорином, так же как и к препаратам группы метициллина. По этой причине нет необходимости исследовать устойчивость стафилококков к цефалоспоринолу. Существует абсолютная перекрестная устойчивость между пенициллином и ампициллином. Поэтому исследовать отдельно чувствительность стафилококков к ампициллину не следует.

# Анаэробная бактериология

## Введение

В предыдущих главах настоящего руководства достаточно часто упоминались анаэробные бактериальные инфекции и анаэробные бактерии. Анаэробная бактериальная инфекция может возникать в любых тканях и анатомических зонах тела, где имеются соответствующие условия, обеспечивающие преимущество для анаэробов.

Большинство анаэробных бактериальных заболеваний вызывают эндогенные бактерии, являющиеся частью нормальной микрофлоры, которые никак не проявляются и не вызывают нарушений здоровья до тех пор, пока не возникает изменения баланса нормальной микрофлоры или не происходит "переноса" микроорганизмов из одной анатомической области в другую. Экзогенные анаэробные бактерии, в первую очередь *Clostridium tetani*, *S. botulinum*, иногда *S. perfringens*, и некоторые другие виды клостридий могут проникать через поврежденную кожу, вызывая столбняк, раневой ботулизм или газовую гангрену. Абсцессы практически всех органов, бактериемия, перитонит, торакальная эмпиема, воспаление подкожной клетчатки и аппендицит — это лишь некоторые из заболеваний, в патогенезе которых анаэробные бактерии играют ведущую роль. В связи с этим очень важно, чтобы микробиолог знал, как и в каких случаях следует осуществлять культивирование доставленного в лабораторию материала на наличие анаэробных бактерий.

## Описание микроорганизмов по их отношению к кислороду

Ниже приведены упрощенные, но исключительно важные в лабораторной и клинической работе характеристики бактерий по их требованиям в отношении кислорода.

- *Облигатным аэробным* бактериям необходим газообразный кислород для завершения собственного энергетического цикла. Эти микроорганизмы не могут расти без доступа кислорода. Примерами облигатных аэробных бактерий являются *Micrococcus* spp. и *Nocardia asteroides*.
- *Облигатным анаэробным* бактериям для осуществления функций обмена веществ кислород не нужен, более того, кислород токсичен для большинства из них. Энергию эти микроорганизмы вырабатывают в результате реакций ферментации, конечными продуктами которых могут быть вещества с отвратительным запахом. Примерами таких анаэробных бактерий являются *Bacteroides fragilis* и *Peptostreptococcus magnus*.
- *Факультативно анаэробные бактерии* — это такие микроорганизмы, которым для роста или выработки энергии необязательно присутствие кислорода; они могут использовать кислород, но могут расти за счет анаэробных механизмов. Такие бактерии характеризуются высокой степенью адаптации и всегда могут приспособиться к условиям окружающей среды, вырабатывая энергию для роста и размножения за счет "включения" наиболее эффективного механизма. *E. coli* и *S. aureus* — примеры факультативных анаэробов.
- Помимо вышеуказанных еще существуют *микроаэрофильные* бактерии, которые лучше растут в атмосфере с пониженным содержанием кислорода. *Campylobacter jejuni* — пример микроаэрофильных микроорганизмов.

## Бактериология

Приблизительно 80 % диагностируемых анаэробных инфекций вызывают анаэробные микроорганизмы, принадлежащие к трем большим группам. Это *Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus* spp. и *Clostridium* spp. *perfringens*. Чаще всего встречаются следующие представители трех вышеназванных групп: *Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus magnus* и *Clostridium*. Специфические методы выделения и идентификации этих трех родов и видов микроорганизмов могут служить моделью для выделения и подбора способов идентификации для других клинически значимых анаэробных бактерий.

## Взятие материала и доставка его в лабораторию

Эти вопросы достаточно подробно рассматривались в предыдущих разделах настоящего руководства. Следует избегать использования тампонов для сбора материала, поскольку анаэробы очень чувствительны к воздуху и высушиванию. Образцы для культивирования на наличие анаэробов следует брать очень аккуратно из анатомических зон, пораженных инфекцией. Для взятия некоторых образцов может потребоваться вмешательство хирурга. Особенно это касается взятия гноя путем пункции, забора тканей и(или) проб гноя из инфицированных ран, эмпиемы или дренирования абсцессов. Отобранные образцы необходимо поместить в стерильную, плотно закрытую емкость, а если подходящей емкости нет, образцы пунктатов следует незамедлительно доставлять в лабораторию непосредственно в стерильном шприце с закупоренной или закрытой резиновой пробкой иглой.

## Условия для культивирования анаэробов

Существуют различные методы для создания анаэробных условий. Одним из простых и недорогих методов является использование анаэробного сосуда из толстого стекла или поликарбоната емкостью 2,5—3,5 л, снабженного безопасной газонепроницаемой крышкой, которая легко открывается и закрывается. После того как засеянные чашки Петри помещены внутрь сосуда, в нем создаются анаэробные условия путем применения выпускаемого на промышленной основе одноразового анаэробного генератора при закрытой крышке. Простым и недорогим генератором является Anaerocult A (Merck, Darmstadt, Germany, Cat. No. 13829). Он представляет собой бумажный пакет, содержащий сухие реагенты. Непосредственно перед использованием равномерно на поверхность пакета наливают 35 мл воды, используя мерный цилиндр. Такое активирование связывает кислород и высвобождает углекислый газ. Увлажненный пакет затем укладывают внутрь сосуда по его длине вместе с засеянными чашками Петри. Крышку плотно закрывают и сосуд помещают в термостат при температуре 35 °C на 48 ч. Если понадобилось проверить наличие роста и характера колоний культуры на одной или более чашках после 24-часовой инкубации, для последующей инкубации потребуется использование нового активированного пакета Anaerocult A. Другие одноразовые приборы для создания анаэробноза представляют собой плоские запечатанные пакеты из фольги, которые выделяют и кислород, и углекислый газ после добавления воды. Однако эти пакеты действуют только в присутствии палладиевого катализатора, закрепленного на нижней стороне крышки сосуда. С течением времени катализатор теряет свою активность, в связи с чем его необходимо реактивировать или заменять на новый; эту процедуру следует проводить через определенное время, рекомендованное производителем. Специальные одноразовые окрашенные бумажные индикаторы, которые меняют цвет с голубого (красного) до полного обесцвечивания в анаэробной атмосфере, можно приобрести у многих производителей.

Пробирки с бульоном для культивирования анаэробов, например с тиогликолевым бульоном или бульоном из вареного мяса, не следует инкубировать в анаэробных условиях, поскольку в их составе содержатся ингредиенты, которые способны создавать анаэробную среду. При достаточном объеме (10—12 мл на стандартную завинчивающуюся пробирку диаметром 15 мм) свежеприготовленного бульона анаэробные условия создаются в нижней части пробирки. В тех случаях, когда бульон не используют в день приготовления, пробирки с приоткрытыми крышками в течение 15 мин следует нагревать на водяной бане для удаления растворенного кислорода; крышки после этого плотно закрывают, среды дают остыть перед посевом в нее материала.

### Питательные среды для культивирования анаэробов

Анаэробное культивирование следует осуществлять лишь по специальному запросу лечащего врача, когда пробы имеют отвратительный запах или когда результаты микроскопического исследования мазков, окрашенных по Граму, свидетельствуют о вероятности анаэробной инфекции, например, о присутствии плеоморфной смешанной флоры грамположительных и грамотрицательных палочек и кокков, веретенообразных палочек или толстых грамположительных палочек с обрубленными концами, которые могут принадлежать к роду *Clostridium*.

Обычно анаэробное культивирование не следует осуществлять для проб мочи, выделений из половых органов, фекалий или выплюнутой мокроты; присутствие в них анаэробных бактерий — свидетельство контаминации нормальной комменсальной микрофлорой. Клиницистов следует информировать о том, что пробы, содержащие нормальную микрофлору, не нужно подвергать анаэробному культивированию, если для этого нет серьезных оснований.

Обычный кровяной агар является хорошей твердой питательной средой для выделения наиболее важных анаэробных патогенов. Для выделения более требовательных к питательным средам видов рекомендуется обогатить кровяной агар, добавив в него ростовые факторы (гемин и витамин К<sub>3</sub>). Можно использовать такие доступные питательные среды, как производимый на промышленной основе анаэробный агар Вилкинса-Чалгрена.

Анаэробные бактерии нередко являются составной частью микрофлоры, в которой также содержатся аэробные микроорганизмы; поэтому для того, чтобы придать кровяному агару селективные свойства, в него добавляют один или несколько антибиотиков. Так, например, добавление аминогликозидов (неомицин, канамицин) при концентрации 50 мкг/мл приводит к подавлению роста аэробных и факультативных бактерий. Раствор аминогликозида готовят путем растворения 500 мг препарата в 100 мл дистиллированной воды. Расплавляют 100 мл основы анаэробного агара и после остывания до 56 °С асептически добавляют 5 мл дефибринированной крови и 1 мл раствора антибиотика. Хорошо перемешивают и в асептических условиях наливают по 15—18,0 мл приготовленного агара в стерильные чашки Петри. Готовые чашки следует использовать как можно скорее или хранить в холодильнике предпочтительно в закрытой пластиковой сумке или пакете.

### Методика посева и выделения

Образцы, предназначенные для исследования на наличие анаэробной инфекции, следует без промедления засеивать на следующие питательные среды:

- анаэробный кровяной агар для инкубирования в анаэробном сосуде;
- анаэробный кровяной агар для инкубирования в атмосфере свечного газа;
- в чашку с агаром Мак-Конки;
- в пробирку с анаэробным бульоном (тиогликолят или вареное мясо).

Для аэробного культивирования посев материала производится, как обычно, учет результатов для определения наличия аэробов и факультативных бактерий осуществляют после инкубации в течение 24—48 ч. Посев для культивирования анаэробов проводят, нанося материал на очень небольшой участок поверхности анаэробного кровяного агара, а затем рассеивая его по всей поверхности с помощью бактериологической петли. Инкубируют посевы в анаэробных условиях в течение 48 ч. Если рост окажется незначительным, посевы могут быть подвергнуты реинкубации еще в течение 24—48 ч. Посев культуры в бульон должен производиться обильной дозой с использованием пастеровской пипетки с тем, чтобы обеспечить распределение посевного материала по всей высоте пробирки.

После 48-часовой инкубации следует учесть результаты роста микроорганизмов на анаэробном кровяном агаре в сравнении с ростом микрофлоры на чашках с аэробной средой. Каждый тип выросших колоний должен быть подвергнут микроскопическому исследованию (окраска по Граму). Микроорганизмы, которые дали рост как на анаэробном, так и на аэробном агаре, следует рассматривать как факультативные анаэробы. Колонии, которые выросли только на анаэробном агаре, по-видимому, являются анаэробами, их следует пересеять на 2 чашки с кровяным агаром, одну из которых инкубируют в строго анаэробных условиях, а другую в атмосфере свечного газа. Если после этого рост микроорганизмов обнаружен только в условиях анаэробноза, следует попытаться идентифицировать чистую культуру анаэроба.

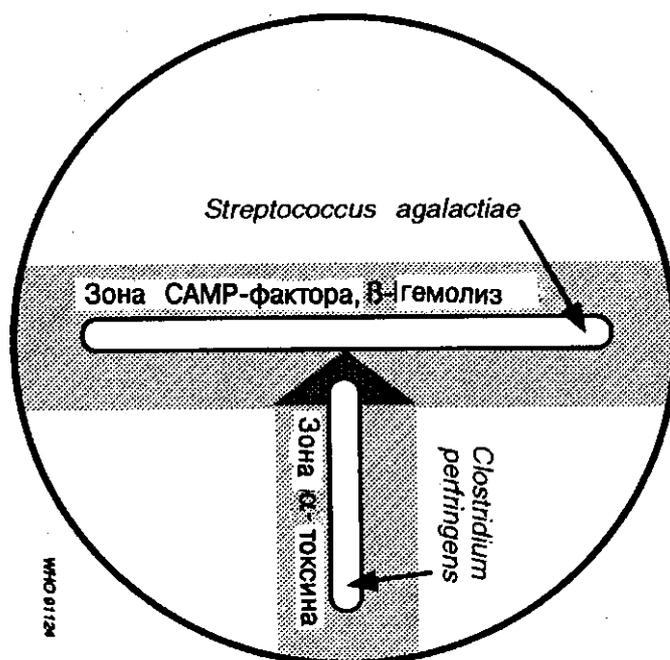
Если рост наблюдается в глубине анаэробного бульона, его следует пересеять на аэробный и анаэробный кровяной агар и исследовать таким же образом, как чашки с первичным посевом. Поскольку жидкая питательная среда засеивается большим объемом гноя, она может дать положительный результат, в то время как первичные чашки Петри останутся стерильными.

## Идентификация анаэробов, имеющих важное значение в медицинской практике

### Группа *Bacteroides fragilis*

Эта группа включает в себя несколько сходных типов, принадлежащих к нормальной микрофлоре кишечника и влагалища. Они нередко служат причиной смешанной инфекции кишечника и тазовых органов, а также вызывают бактериемию. *B. fragilis* — неподвижная грамотрицательная, часто плеоморфная палочка, быстро растет на анаэробном кровяном агаре. После 48-часовой инкубации вырастают колонии умеренных размеров (до 3 мм в диаметре), полупрозрачные, серо-белого цвета, не обладающие гемолитической активностью. Ускоренная идентификация возможна с помощью теста желчной стимуляции. Чистую культуру исследуемого микроорганизма засевают в глубь двух пробирок с тиогликолевым бульоном, одна из которых содержит 20 % (2 мл в 10 мл) стерильной (автоклавированной) бычьей желчи. После 24-часовой инкубации следует сравнить рост в двух пробирках: добавление в пробирку желчи выражено стимулирует рост *B. fragilis*.

Рис. 6. Обратный CAMP-тест



### *Clostridium perfringens*

Род *Clostridium* включает в себя множество видов спорообразующих грамположительных палочек, некоторые из них являются представителями нормальной кишечной микрофлоры, другие обнаруживаются в пыли и почве. Наиболее важное клиническое значение имеет вид *C. perfringens*. Этот возбудитель является этиологическим агентом газовой гангрены, способен вызывать бактериемию и другие глубокие инфекции. В отличие от большинства других видов рода *Clostridium* *C. perfringens* неподвижен, не образует спор в пораженных тканях и молодых культурах.

*C. perfringens* хорошо растет в анаэробном бульоне с обильным газообразованием. На анаэробном кровяном агаре колонии умеренного размера (2—3 мм) выявляются после 48-часовой инкубации. Для большинства штаммов характерна двойная зона гемолиза: зона внутреннего полного гемолиза и зона внешнего частичного гемолиза.

Быстрая идентификация возможна с помощью обратного CAMP-теста, который осуществляют следующим образом (рис. 6)<sup>1</sup>.

- Готовят чашки с кровяным агаром с 5 % трижды отмытой бараньей кровью.
- Наносят по диаметру чашки Петри полоску чистой культуры *Streptococcus agalactiae*. Перпендикулярно этой полосе, но не касаясь ее, наносят полоску исследуемой на принадлежность к *Clostridium* культуры.
- Инкубируют в анаэробных условиях в течение 24 ч.

*C. perfringens* образуют на границе двух полосок культур отчетливую,

<sup>1</sup> Hansen M.V., Elliot L.P. New presumptive identification test for *Clostridium perfringens*: Reverse CAMP test. *Journal of clinical microbiology*, 12: 617—619 (1980).

глубокую зону гемолиза в виде заостренного наконечника стрелы. При отрицательном результате CAMP-теста сообщают о том, что исследуемая культура является "Clostridium sp., а не *C.perfringens*".

### **Peptostreptococcus**

Некоторые виды облигатных грамположительных кокков принадлежат к обычной микрофлоре респираторного, пищеварительного и урогенитального тракта. Они в ассоциации с другими анаэробами или аэробными бактериями могут приводить к анаэробным абсцессам, раневым инфекциям и даже бактериемии. Рост анаэробных кокков на искусственных питательных средах обычно происходит медленнее, чем рост *Bacteroides* или *Clostridium*, их колонии появляются на кровяном агаре не ранее чем через 48 ч. Видовой идентификации при рутинных бактериологических исследованиях обычно не требуется. Грамположительные кокки, образующие на кровяном анаэробном агаре мелкие, выпуклые, белые колонии, но не растущие в аэробных условиях, можно предварительно идентифицировать как *Peptostreptococcus* spp.

### **Исследование чувствительности к антибиотикам**

В связи с тем что в настоящее время отсутствует стандартизованная методика определения чувствительности анаэробов к антибиотикам диско-диффузионным методом, проводить это исследование в обычной лабораторной практике нет необходимости.

Большинство анаэробных инфекций вызывают пенициллиночувствительные бактерии, за исключением инфекций, первоначально возникших в кишечном тракте или во влагалище. Такие инфекции обычно связаны с *Bacteroides fragilis*, которые вырабатывают  $\beta$ -лактамазу и устойчивы к пенициллину, ампициллину и большинству препаратов цефалоспоринового ряда. Эти инфекции следует лечить клиндамицином, метронидазолом или хлорамфениколом. Аминогликозиды не обладают активностью в отношении анаэробов, однако их часто используют для лечения больных со смешанной инфекцией, поскольку они весьма эффективны по отношению к аэробным бактериям, являющимся составной частью смешанной бактериальной микрофлоры.

# Определение чувствительности к антимикробным средствам

## Введение

На конгрессе, организованном ВОЗ в Женеве в 1977 г.<sup>1</sup>, обсуждались вопросы, связанные с повсеместным увеличением числа микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам, что связано с неконтролируемым их использованием для лечения людей и животных. В последние годы резистентные к антибиотикам штаммы вызвали несколько серьезных вспышек инфекционных болезней со значительным числом смертных случаев. Это привело к необходимости разработки национальных и международных программ надзора и мониторинга за устойчивостью микроорганизмов путем определения их чувствительности адекватными стандартными методами, позволяющими получать сравнимые результаты. Доступная микробиологическая и эпидемиологическая информация может помочь клиницистам в выборе наиболее эффективного антимикробного агента для лечения бактериальных инфекций.

Если прогноз верен, исследование чувствительности следует проводить аккуратно, по воспроизводимой методике, а полученный результат следует использовать непосредственно в клинической практике. Окончательным критерием достоверности результатов определения чувствительности, получаемых разными методами, является корреляция этих данных с клиническими результатами — эффективностью антибактериальной терапии.

На конгрессе ВОЗ рассматривался вопрос об усовершенствованном диско-диффузионном методе Керби—Бауэра, для которого ВОЗ сформулировала требования в 1976 г.<sup>2</sup> Было принято решение рекомендовать этот метод для клинических и эпидемиологических целей, поскольку он прост в исполнении и воспроизводим. Этот метод особенно подходит для исследования микроорганизмов из семейства энтеробактерий, однако также может быть рекомендован в качестве общего метода для исследования других быстрорастущих патогенов, за исключением строгих анаэробов. Было также рекомендовано ознакомить лабораторных работников со всеми особенностями этого метода<sup>3</sup>.

## Основные принципы определения антимикробной чувствительности

Тест на антимикробную чувствительность позволяет измерить способности антибиотика или другого антимикробного агента вызывать угнетение роста бактериальных клеток *in vitro*. Эта способность может быть оценена с помощью метода разведений или диффузионного метода.

<sup>1</sup> WHO Technical Report Series, No. 624, 1978 (*Surveillance for the prevention and control of health hazards due to antibiotic-resistant enterobacteria: Report of a WHO Meeting*).

<sup>2</sup> WHO Technical Report Series, No. 610, 1977 (Twenty-eight report of the WHO Expert Committee on Biological Standardization), Annex 5.

<sup>3</sup> Сопоставимым методом, основанным на тех же принципах и требованиях контроля качества, что и метод Керби—Бауэра, является метод NEO-SENSITABS, разработанный ROSCO Diagnostica, Тааструп, Дания. Для этого метода вместо бумажных дисков используют окрашенные таблетки антибиотика диаметром 9 мм. Эти таблетки обладают очень высокой стабильностью, срок их годности 4 года, даже при хранении при комнатной температуре. Такая высокая стабильность очень важна, особенно для лабораторий тропических стран.

## Метод разведения

Для количественной оценки активности антибиотика различные разведения антибиотика можно внести в бульон или агаровую среду, на которые затем будет посеян исследуемый микроорганизм. Самая низкая концентрация, которая препятствует росту микроорганизма после суточной инкубации, считается минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) антимикробного агента. Показатель МИК затем сравнивают с концентрацией лекарственного вещества, которую можно создать в сыворотке или других жидкостях тела человека, что позволяет оценить возможный клинический ответ.

## Дискодиффузионный метод

Бумажные диски, импрегнированные антибиотиками, укладывают на поверхность агара, засеянного строго определенной дозой исследуемого микроорганизма. Вокруг диска путем диффузии в агаре создается определенный градиент концентрации антибиотика, в связи с чем рост тест-микроорганизма ингибируется на определенном расстоянии от диска, которое зависит, помимо других факторов, и от чувствительности микроорганизма.

Существует линейная связь между логарифмом МИК, измеренной при использовании метода разведения, и диаметром зоны задержки роста при использовании дискодиффузионного метода. Линия регрессии, отражающая эту связь, может быть получена при параллельном исследовании двумя методами очень большого числа штаммов (рис. 7 и 8).

Рис. 7. Графическое изображение взаимосвязи между  $\log_2$  МИК и диаметром зоны задержки роста, полученным с помощью диффузионного метода при использовании дисков, содержащих одинаковую концентрацию антибиотика

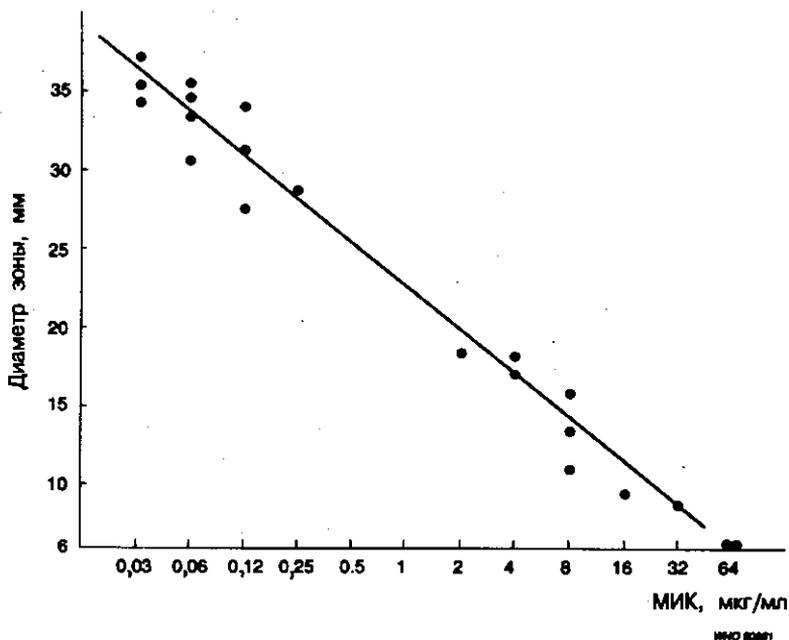
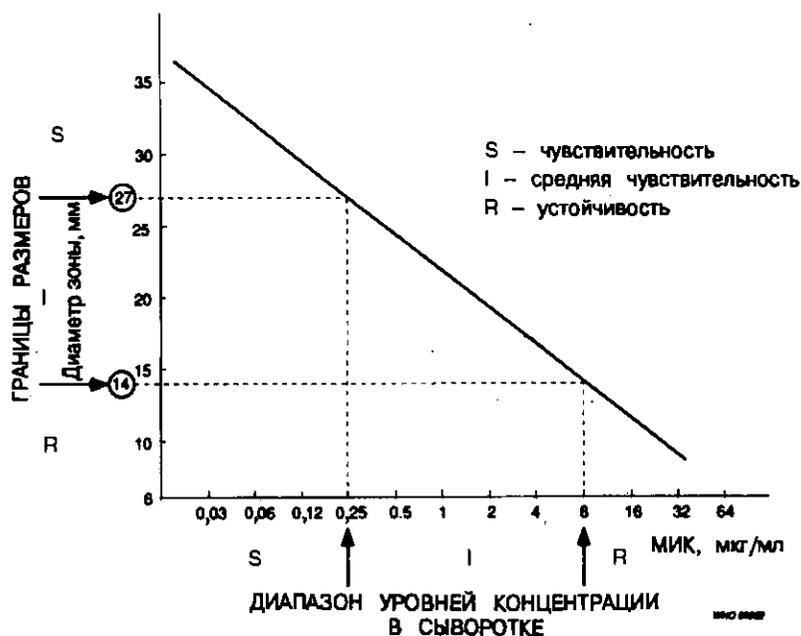


Рис. 8. Интерпретация размеров зоны задержки роста в зависимости от их связи со значением МИК и установление на основе этих показателей трех уровней антимикробной чувствительности



### Клиническое определение терминов “устойчивость”, “чувствительность”: система трех категорий

Результаты теста на определение чувствительности, которые сообщают лечащему врачу, представляют собой классификацию микроорганизма по степени чувствительности, в соответствии с которой его относят к одной из двух или более категорий. Самая простая система включает в себя лишь две категории чувствительности: чувствительность или устойчивость. Несмотря на то что эта классификация весьма удобна для статистических и эпидемиологических целей, она недостаточно гибка для клинического использования. В связи с этим чаще всего используют классификационную систему, включающую три уровня чувствительности. Метод Керби—Бауэра и его модификации предусматривают три категории чувствительности, и, что очень важно, и клиницисты, и лабораторные работники одинаково понимают точный смысл и клиническое значение этих категорий.

- **Чувствительность.** Микроорганизм считается чувствительным к лекарственному препарату, когда вызванная им инфекция хорошо поддается лечению этим препаратом в рекомендуемых дозах.
- **Средняя чувствительность.** Этот термин характеризует две возможные ситуации. Он применим к штаммам, проявляющим “умеренную чувствительность” к антибиотику, который мог бы использоваться для лечения заболевания, вызванного таким штаммом, в более высоких дозах, либо поскольку его токсичность низка, либо поскольку он способен накапливаться в местах концентрации возбудителя (например, в моче).

Это же определение используется для характеристики штаммов, проявляющих “умеренную чувствительность” к более токсичному антибиотику, который не может быть использован в более высоких дозах. В этой ситуации категория “средняя устойчивость” служит буферной зоной между такими категориями, как “чувствительность” и “резистентность”. Поскольку большинство клиницистов не имеют представления о тонком,

хотя клинически очень важно различии между средней и умеренной чувствительностью, многие лаборатории при выдаче ответа о результате исследования используют термин "средняя чувствительность".

- *Устойчивость*. Этот термин означает, что исследуемый микроорганизм не реагирует на данный лекарственный препарат независимо от доз и локализации инфекции.

Для определения реакции стафилококков на бензилпенициллин признают лишь две категории: "чувствительность" и "устойчивость" (в соответствии с их способностью к продуцированию  $\beta$ -лактамазы).

Окончательное решение об использовании конкретного антибиотика и определение дозы будут зависеть не только от результатов определения чувствительности, но и от интерпретации этого результата лечащим врачом. Другие факторы, такие, как патогенетическое значение возбудителя, побочные эффекты, фармакокинетика лекарственного препарата, его проникновение в разные участки тела и иммунный статус пациента, также следует принимать во внимание.

### Показания к рутинному проведению теста на определение чувствительности

Тест на определение чувствительности можно выполнять в клинических лабораториях с целью:

- оказать помощь лечащему врачу в выборе наилучшего антимикробного агента для каждого отдельного больного;
- собрать эпидемиологическую информацию об устойчивости к антибактериальным средствам микроорганизмов, циркулирующих в определенных регионах и представляющих определенную угрозу для общественного здравоохранения.

### Определение чувствительности в качестве критерия для руководства при выборе схемы лечения

Не следует определять чувствительность контаминантов или комменсалов, принадлежащих нормальной микрофлоре, или других микроорганизмов, не имеющих отношения к инфекционному процессу. Например, присутствие *Escherichia coli* в моче в количествах, не имеющих диагностического значения, не рассматривается в качестве фактора, обусловившего инфекцию, поэтому составление антибиотикограммы не принесет пользы и даже может ввести в заблуждение.

Определение чувствительности следует проводить только с использованием чистой культуры микроорганизма, рассматриваемого в качестве этиологического агента инфекционного процесса. Этот микроорганизм должен быть идентифицирован (типирован), поскольку нет необходимости выполнять антибиотикограмму для каждого микроорганизма, выделенного от инфекционного больного.

В повседневной лабораторной практике нет надобности выполнять тесты на чувствительность в следующих ситуациях:

- Когда этиологический агент принадлежит к виду с прогнозируемой чувствительностью к определенным лекарственным препаратам. Это относится к *Streptococcus pyogenes* и *Neisseria meningitidis*, которые до сих пор чувствительны к пенициллину (однако недавно появилось

несколько сообщений о спорадически обнаруживаемых пенициллиноустойчивых менингококках). Это также относится к фекальным стрептококкам (энтерококкам), которые, за очень небольшим исключением, чувствительны к ампициллину. Если на клиническом уровне появилось подозрение на наличие устойчивости среди таких микроорганизмов, следует направить несколько штаммов таких культур для исследования в компетентную справочную лабораторию.

- Если возбудитель относится к медленно растущим "привередливым" микроорганизмам и требует специальных сред обогащения (например, *Haemophilus influenzae* и *Neisseria gonorrhoeae*), дискодиффузионный метод может дать недостоверные результаты. Появление  $\beta$ -лактамазопродуцирующих вариантов среди этих видов привело к внедрению специальных тестов, таких как определение продукции  $\beta$ -лактамазы *in vitro*, описанных в разделе "Исследование чувствительности к антибиотикам" в главе "Болезни, передаваемые половым путем". В обязанности центральной или региональной лаборатории вменяется мониторинг чувствительности пневмококков, гонококков и *Haemophilus*. Если возникают проблемы с резистентными штаммами, необходимо проявить озабоченность и предоставить инструкции для использования соответствующих методов анализа или альтернативных схем лечения.
- Если имеет место неосложненная кишечная инфекция, вызванная сальмонеллами (кроме *S.typhi* или *S.paratyphi*), исследовать чувствительность к антибиотикам нет необходимости. Лечение антибиотиками таких инфекций не оправдано даже в тех случаях, когда применяют препараты, которые проявили активность *in vitro*. В настоящее время имеются убедительные свидетельства, что антибактериальная терапия обычных сальмонеллезных гастроэнтеритов (а также большинство диарейных заболеваний неустановленной этиологии) не приносит пользы больному. Как это ни парадоксально, антибиотики способствуют экскреции и диссеминации сальмонелл, а также могут привести к появлению резистентных штаммов.

### Тест на определение чувствительности как инструмент эпидемиологического надзора

Рутинное исследование чувствительности большинства патогенных микроорганизмов (*S.typhi*, шигеллы) — полезный составной элемент общих программ надзора за кишечными инфекциями. Их результаты позволяют информировать лечащих врачей о появлении антибиотикорезистентных штаммов (хлорамфениколорезистентные штаммы *S.typhi*, котримоксазолорезистентные и ампициллинорезистентные шигеллы), а также о необходимости внесения изменений в используемые схемы лечения. Несмотря на то что результаты определения чувствительности сальмонелл (не принадлежащих к возбудителю брюшного тифа) — возбудителей кишечных инфекций не имеют практического значения для лечения больных, появление полирезистентных штаммов — сигнал для лечащих врачей о чрезвычайно широком и часто неверном использовании антимикробных препаратов.

Постоянный учет результатов рутинных исследований чувствительности является отличным источником информации о распространении резистентных стафилококков и грамотрицательных микроорганизмов, которые могут обусловить перекрестную устойчивость микроорганизмов в больнице. Периодическая информация о характере чувствительности представителей наиболее распространенных штаммов — важный фактор при формировании разумной политики использования антибиотиков в стационарах путем ограничения использования или чередования использования сохраняющих жизнь препаратов, таких как аминогликозиды и цефалоспорины.

## Выбор препаратов для рутинного исследования чувствительности в клинической лаборатории

Выбор лекарственных препаратов для рутинного определения антибиотикограммы осуществляют с учетом спектра антимикробной активности, фармакокинетики, токсичности, эффективности, доступности, а также стоимости как для больного, так и для общества. Среди множества антибактериальных агентов, которые могли бы использоваться для лечения больного, инфицированного одним из патогенных микроорганизмов, лишь ограниченное число скрупулезно отобранных антибиотиков следует включать в перечень препаратов для определения чувствительности.

В табл. 12 перечислены лекарственные препараты, которые могут быть использованы в различных ситуациях. Представленные препараты разделены на два набора. В набор 1 включены препараты, которые доступны для большинства клиник и в отношении которых следует выполнять рутинные тесты на исследование чувствительности каждого штамма. Исследования в отношении препаратов, включенных в набор 2, выполняют только либо по специальному запросу лечащего врача, либо если возбудитель резистентен к антибиотикам первого выбора, либо по другим причинам (включая аллергию к препарату или невозможность получения препарата), которые оправдывают постановку дополнительных тестов. Многие антибиотики, весьма эффективные при клиническом применении, не нашли отражения в таблице, следует отметить, что они редко используются для лечения больных. В очень редких случаях в перечень антибактериальных агентов может быть включено 1—2 дополнительных препарата, основанием для такого включения служит либо специальный запрос лечащего врача, либо появление новых более эффективных средств. Следует периодически пересматривать списки, представленные в этой таблице, однако делать это нужно только после тщательного обсуждения вопроса с клиницистами. На практике возникает много проблем из-за того, что клиницисты не всегда понимают, что в перечень для рутинных исследований включено лишь по одному представителю каждой группы антибактериальных препаратов. Результаты, полученные в отношении включенного в перечень препарата, затем могут быть экстраполированы на все или большинство других представителей этой группы. В некоторых странах возникают сложности в связи с тем, что врачи знакомы лишь с коммерческими названиями препаратов и не знают видовых непатентованных названий фармацевти-

Таблица 12. Основные наборы лекарственных средств для рутинного исследования чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам<sup>a</sup>

	Staphylococcus	Enterobacteriaceae			Pseudomonas aeruginosa
		кишечник	моча	кровь и ткани	
Набор 1 Препараты первого выбора	Бензилпенициллин	Ампициллин	Сульфонамид	Ампициллин	Пиперациллин
	Оксациллин	Хлорамфеникол	Триметоприм	Хлорамфеникол	Гентамицин
	Эритромицин	Ко-тримоксазол	Ко-тримоксазол	Ко-тримоксазол	Тобрамицин
	Тетрациклин	Налидиксовая кислота	Ампициллин	Налидиксовая кислота	
	Хлорамфеникол	Тетрациклин	Нитрофурантоин	Тетрациклин гентамицин	
Набор 2 Дополнительные препараты	Гентамицин	Норфлоксацин	Норфлоксацин	Цефуроксим	Амикацин
	Амикацин		Хлорамфеникол	Цефтриаксон	
	Ко-тримоксазол		Гентамицин	Ципрофлоксацин	
	Клиндамицин			Пиперациллин Амикацин	

<sup>a</sup> Комментарии, касающиеся отдельных антибактериальных агентов, приведены в тексте.

ческих веществ. Следует предпринять серьезные усилия, чтобы информировать медицинский персонал о международных непатентованных наименованиях фармацевтических веществ и поощрить их использование.

1. Диск *бензилпенициллина* используют для определения чувствительности ко всем  $\beta$ -лактамазочувствительным пенициллинам (таким, как оральный феноксиметилпенициллин и фенетициллин). Выделенные стафилококки, которые относят к категории резистентных за счет продукции  $\beta$ -лактамазы, требуют применения  $\beta$ -лактамазорезистентных пенициллинов или других препаратов, например эритромицина.
2. Диск с *оксациллином*. Оксациллин является представителем целой группы  $\beta$ -лактамазорезистентных пенициллинов (включая метициллин, нафциллин, флоксациллин, дихлоксацин и флулоксацин). Более того, имеются убедительные клинические данные, подтверждающие наличие перекрестной устойчивости между группами метициллина и цефалоспоринов. Поэтому включать цефалотин в список препаратов, к которым предстоит определить чувствительность стафилококков, бесполезно, это может только ввести в заблуждение. Часто микроорганизмы проявляют к метициллину и сходным препаратам устойчивость гетерогенного типа, т.е. большинство клеток проявляют абсолютную чувствительность и образуют широкие зоны задержки роста, в то же время резистентная часть популяции формирует мелкие дискретные колонии, растущие внутри зоны задержки роста. Этот тип резистентности более наглядно проявляется при температуре инкубации не более 35 °C<sup>2</sup> или при более длительной инкубации.

Серьезным недостатком метициллина в качестве наполнителя диска для группы  $\beta$ -лактамазорезистентных пенициллинов является его высокая лабильность даже при оптимальных условиях хранения. Диск с оксациллином более устойчив и поэтому предпочтителен для выполнения стандартизованного теста по дискодиффузионному методу. Диски с локсациллином и дилоксациллином не используются, поскольку с их помощью не всегда удается выявить присутствие гетерорезистентных штаммов.

3. Результаты, полученные при использовании диска с *тетрациклином*, могут быть экстраполированы на хлортетрациклин, окситетрациклин и других представителей этой группы. Между тем большинство тетрациклиноустойчивых стафилококков остаются чувствительными к миноциклину. В связи с этим использование диска с миноциклином может быть полезным для изучения устойчивости полирезистентных штаммов стафилококков.
4. Результаты с диском с *хлорамфениколом* могут быть экстраполированы на триамфеникол и на аналогичные препараты со сходным спектром антимикробной активности без учета известного риска апластической анемии.
5. Из числа сульфаниламидов лишь один представитель (сульфафуразол) подходит для выполнения теста на определение чувствительности.
6. Диск с *ко-тримоксазолом* содержит комбинацию триметоприма и сульфаниламида (сульфафуразола). Хотя использование дисков, содержащих комбинацию препаратов, было признано нежелательным в предыдущих докладах ВОЗ<sup>3</sup>, ко-тримоксазол является исключением, поскольку эта композиция двух синергистов обладает известными фармакокинетическими свойствами и обычно действует "как единый препарат".
7. *Ампициллин* является прототипом группы пенициллинов широкого спек-

<sup>1</sup> *International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances, Cumulative List No. 7.* Geneva, World Health Organization, 1988.

<sup>2</sup> Sahm D.F. et al. Current concepts and approaches to antimicrobial agent susceptibility testing. In: *Cumitech 25*, Washington, DC, American Society for Microbiology, 1988.

<sup>3</sup> WHO Technical Report Series, No. 796, 1990 (*The use of essential drugs: fourth report of the WHO Expert Committee*).

- тра действия, активных в отношении множества грамотрицательных бактерий. Поскольку они чувствительны к  $\beta$ -лактамазе, их не следует использовать для определения устойчивости стафилококков. Обычно чувствительность к ампициллину проявляется и в отношении других представителей этой группы: амоксициллина, пивампициллина, талампициллина и др. (хотя амоксициллин вдвое активнее в отношении сальмонелл, он также вдвое пассивнее в отношении шигелл и *H. influenzae*).
8. **Цефалотин.** Для рутинных исследований подходит только цефалотин, поскольку спектр его антимикробной активности аналогичен спектру активности всех остальных цефалоспоринов первого поколения (цефалексин, цефрадин, цефалоридин, цефазолин, цефапирин). Если имеется возможность использовать цефалоспорины второго и третьего поколений, а также соответствующие прописи (цефамизины) с расширенным спектром антимикробной активности, в отдельных случаях оправдано применение отдельного диска с некоторыми из этих новых препаратов (цефокситин, цефамандол, цефуроксим, цефотаксим, цифтриаксон). Несмотря на то что некоторые цефалоспорины можно использовать для лечения тяжелых стафилококковых инфекций, чувствительность культур, послуживших возбудителем инфекции, можно определить по результатам тестов с оксациллином, как описано выше в п.2.
  9. **Эритромицин** используется для исследования чувствительности к некоторым другим представителям группы макролидов (олеандомицин, спирамицин).
  10. **Аминогликозиды.** Эта группа химических препаратов включает стрептомицин, гентамицин, канамицин, нетилмицин и тобрамицин. Спектры их антимикробной активности не всегда оказываются достаточно близкими, чтобы гарантировать отсутствие перекрестно-устойчивых микроорганизмов, однако в отношении тестируемых микроорганизмов все эти препараты проявили равную эффективность. Многочисленные исследования, посвященные сравнительной оценке нефротоксичности и ототоксичности гентамицина, нетилмицина и тобрамицина, не позволили сделать окончательного заключения о меньшей токсичности какого-либо препарата по сравнению с другими. Настоятельно рекомендуется, чтобы каждая лаборатория самостоятельно отобрала один из препаратов для первичного определения чувствительности. Другие препараты следует держать в запасе для лечения инфекционных больных с резистентной микрофлорой.
  11. **Нитрофурантоин** используют только для лечения инфекций мочевыводящего тракта; не следует проверять чувствительность к нему микроорганизмов, выделенных откуда-либо, кроме мочевыводящей системы.

## Усовершенствованный метод Керби—Бауэра

Оригинальный дискдиффузионный метод, описанный в 1966 г.<sup>1</sup>, хорошо стандартизован и широко используется для количественной оценки. Официальные агентства рекомендовали его (с незначительными модификациями) в качестве справочного теста, которым следует пользоваться при рутинной работе в клинической лаборатории.

### Реагенты

#### Агар Мюллера—Хинтона

1. Агар Мюллера—Хинтона следует готовить из дегидратированной основы в соответствии с рекомендациями изготовителя. Среда должна быть

<sup>1</sup> Bauer, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American journal of clinical pathology*, 44: 493—496 (1966).

такого качества, чтобы размеры контрольных зон соответствовали пределам, указанным в табл. 13. Очень важно при приготовлении не перегреть среду.

2. Среду остужают до 45—50 °С и разливают по чашкам таким образом, чтобы толщина агарового слоя составляла приблизительно 4 мм. Для чашки Петри диаметром 9 см требуется примерно 25 мл среды.
3. После того как агар застынет, чашки, которые предполагается использовать немедленно, подсушивают в горизонтальном положении с закрытыми крышками в термостате при 35 °С.
4. Чашки, которые не предполагается использовать сразу же, хранят в пластиковом пакете, который следует заклеить и поместить в холодильник. Таким образом чашки могут храниться в течение 2 нед. Чтобы гарантировать достаточную надежность метода измерения размеров зоны задержки роста при исследовании чувствительности к сульфаниламиду и ко-тримоксазолу, агар Мюллера—Хинтона должен содержать пониженные концентрации ингибиторов тимидина и тимина. Поэтому каждую новую партию агара Мюллера—Хинтона следует проверять с использованием контрольного штамма *Enterococcus faecalis*

Таблица 13. Предельные размеры зон задержки роста для контрольных штаммов<sup>а</sup>

Антибиотик	концентрация антимикробного агента в одном диске	Диаметр зоны задержки роста (мм)		
		<i>S.aureus</i> (ATCC 25923)	<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	<i>P.aeruginosa</i> (ATCC 27853)
Амикалин	30 мкг	20—26	19—26	18—26
Ампициллин	10 мкг	27—35	16—22	—
Бензилпенициллин	10 МЕД	26—37	—	—
Цефалотин	30 мкг	29—37	17—22	—
Цефтриаксон	30 мкг	22—28	29—35	17—23
Цефуроксим	30 мкг	27—35	20—26	—
Хлорамфеникол	30 мкг	19—26	21—27	—
Ципрофлоксин	100 мкг	22—30	30—40	25—33
Клиндамицин	2 мкг	24—30	—	—
Ко-тримоксазол	25 мкг	24—32	24—32	—
Эритромицин	15 мкг	22—30	8—14	—
Гентамицин	10 мкг	19—27	19—26	16—21
Налидиксовая кислота	30 мкг	—	22—28	—
Нитрофурантоин	300 мкг	18—22	20—25	—
Норфлоксацин	10 мкг	17—28	28—35	22—29
Оксациллин	1 мкг	18—24	—	—
Пиперациллин	100 мкг	—	24—30	25—33
Сульфонамид <sup>б</sup>	300 мкг	24—34	18—26	—
Тетрациклин	30 мкг	19—28	18—25	—
Тобрамици	10 мкг	19—29	18—26	19—25
Триметоприм	5 мкг	19—26	21—28	—

<sup>а</sup> National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests Tentative standards*. 4th ed. Villanova, PA, USA, NCCLS, 1988.

<sup>б</sup> Сульфафуразол.

(ATCC 29212 или 33186) и диска с ко-тримоксазолом. Партии удовлетворительного качества дают отчетливую зону задержки роста диаметром 20 мм или более, которая совершенно свободна от какого-либо неясного бактериального роста или отдельных колоний.

### Диски с антибиотиками

Можно использовать любые производимые промышленно диски необходимого диаметра и соответствующей концентрации. Запас дисков с антибиотиками предпочтительно хранить при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ ; для хранения вполне подходит морозильное отделение домашнего холодильника. Небольшой запас используемых в работе дисков может храниться в холодильнике не более 1 мес. После извлечения из холодильника контейнер с антибиотиками должен находиться при комнатной температуре в течение 1 ч, чтобы сравнялась температура. Такая процедура снижает объем конденсата, который образуется при контакте теплого воздуха с холодным контейнером. Если используется автоматический прибор для аппликации дисков, он должен быть снабжен плотно закрывающейся крышкой и храниться в холодильнике. Перед тем как открыть крышку, его также следует согреть при комнатной температуре.

### Раствор стандартной мутности

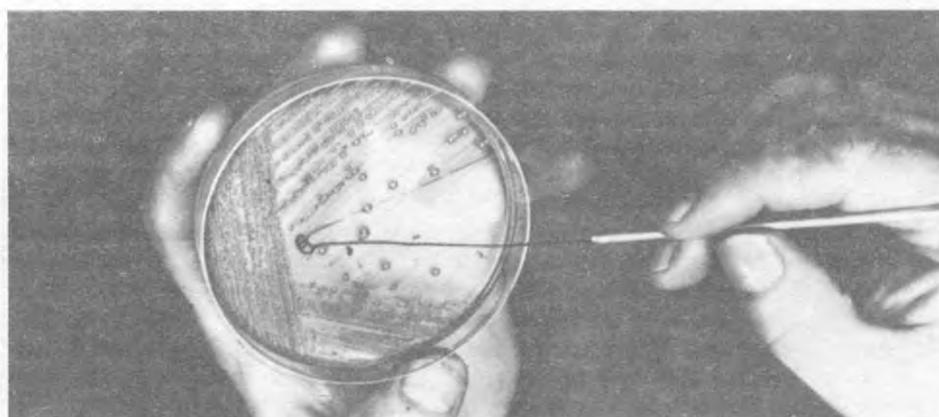
Раствор стандартной мутности готовят следующим образом: в градуированный цилиндр емкостью 100 мл вносят 0,6 мл 1 % (10 г/л) раствора хлорида бария дигидрата, доводят объем до 100 мл 1 % раствором (10 мл/л) серной кислоты. Раствор стандартной мутности следует разлить в пробирки, идентичные тем, которые будут использоваться для образцов бульонной культуры. Их хранят не более 6 мес в темноте при комнатной температуре плотно закупоренными, чтобы предохранить от испарения.

### Тампоны

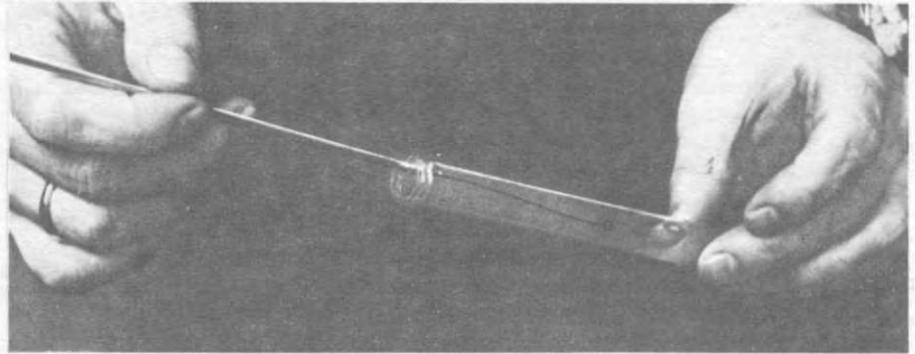
Следует приготовить запас ватных тампонов на деревянных палочках-апликаторах. Их можно стерилизовать в банках, бактериологических пробирках или на бумаге путем автоклавирования или сухим горячим воздухом.

### Методика

Для посева культуры, которую берут с первичных чашек, прикасаются стерильной бактериологической петлей к верхней части 3—5 однотипных колоний микроорганизма, который предполагают исследовать.



Переносят этот материал в стерильный физиологический раствор.



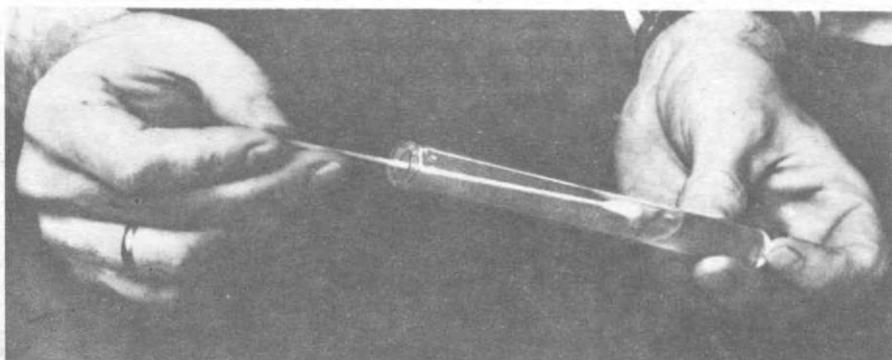
Если нужно произвести посев чистой культуры, берут полную бактериологическую петлю сливного роста и аналогичным образом суспендируют в стерильном физиологическом растворе.

Сравнивают мутность раствора в пробирке с исследуемой культурой со стандартом мутности и приводят мутность исследуемого раствора в соответствие со стандартом путем добавления либо бактериальной массы, либо физиологического раствора.

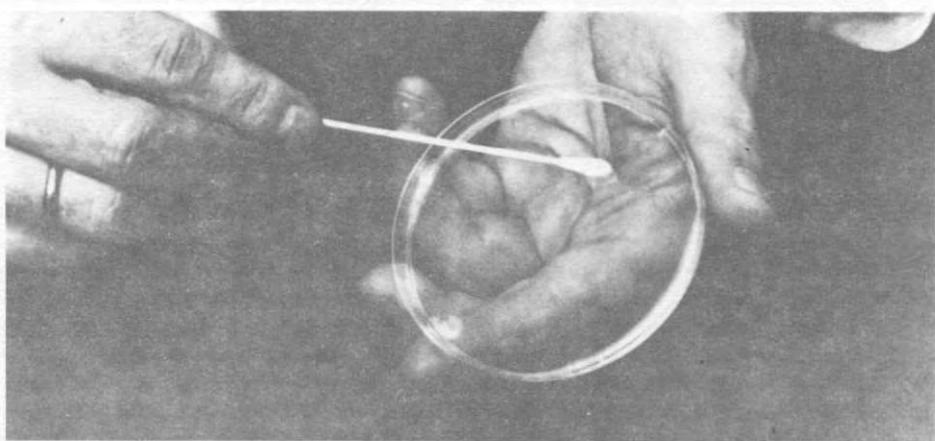


Приготовление микробной взвеси требуемой мутности является необходимым условием, обеспечивающим наличие сливного или почти сливного роста.

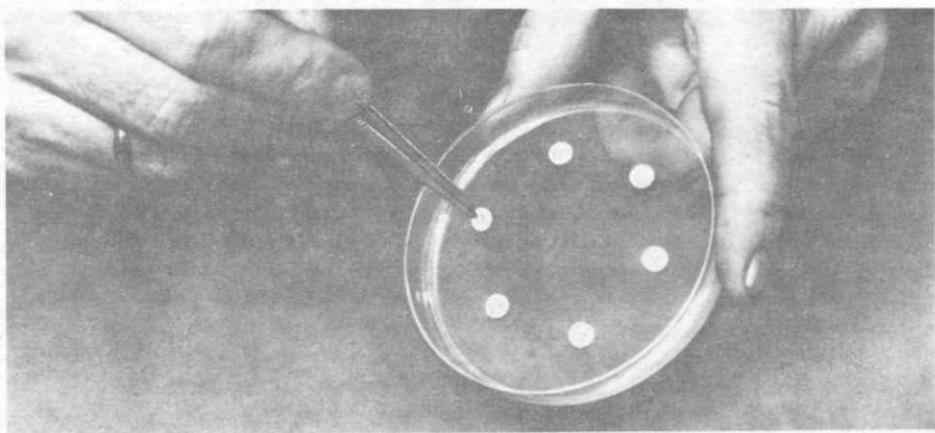
Посев материала на чашку производят следующим образом. Стерильный тампон помещают в пробирку с посевным материалом. Излишнюю жидкость с тампона убирают путем покручивания тампона, прижатого к стенкам пробирки над уровнем жидкости в разные стороны.



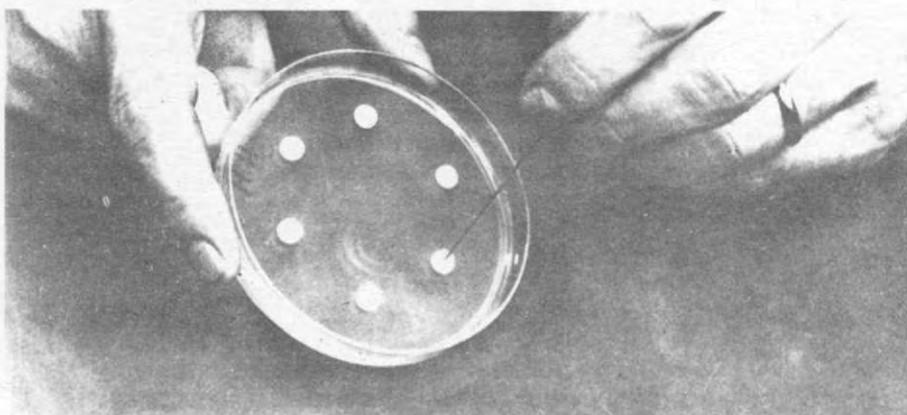
Посев культуры на чашку производят штрихообразным движением по всей поверхности агар трижды, каждый раз после аппликации поворачивая чашку вокруг своей оси на  $60^\circ$ . В заключение делают несколько вращательных движений тампоном по краям агаровой поверхности. После этого посевам дают возможность подсохнуть в течение нескольких минут при комнатной температуре в чашках с закрытыми крышками.



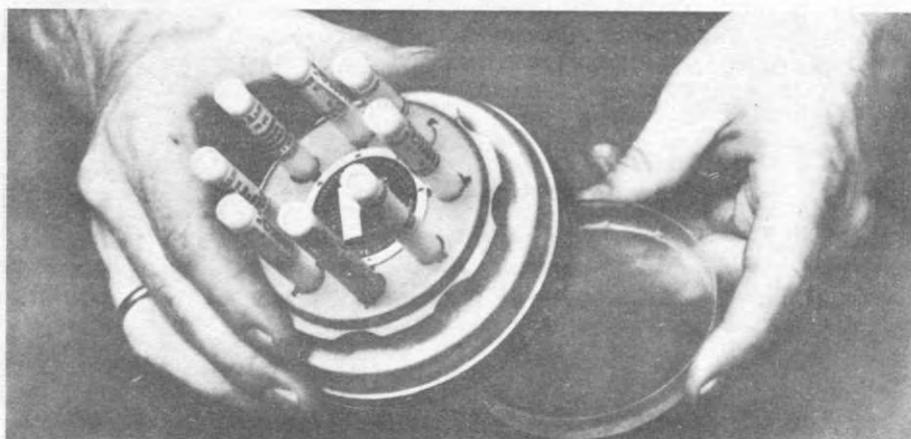
Диски с антибиотиками можно наносить на засеянную чашку с помощью пары стерильных пинцетов. Целесообразно использовать трафарет (см. рис. 10), чтобы расположить диски на чашке единообразно.



Конец стерильной иглы также может быть использован для нанесения дисков с антибиотиками на засеянную чашку.



Можно также использовать специальный автоматический прибор для нанесения дисков на засеянную чашку.



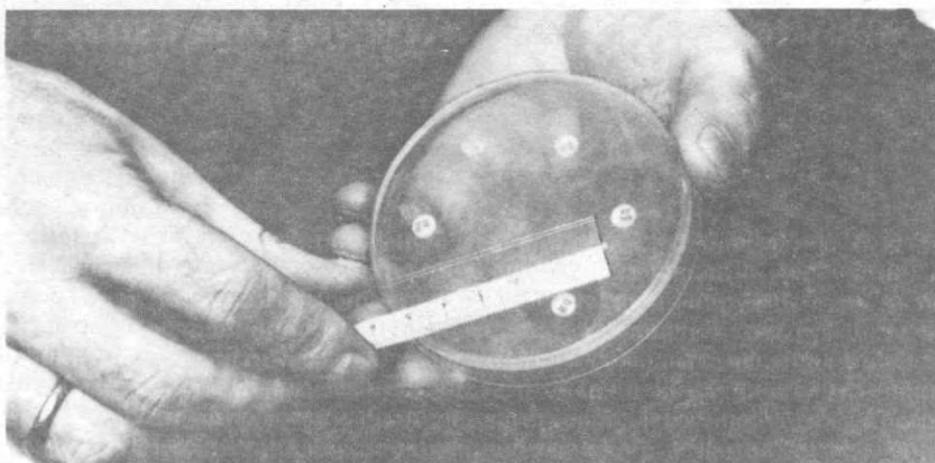
На чашку Петри размером 9—10 см в диаметре можно нанести не более 7 дисков. Шесть дисков можно уложить по окружности не ближе 15 мм к краю агара, а один — в центр. Каждый диск следует аккуратно прижать, чтобы обеспечить его контакт с питательной средой.

Чашки с посевами в течение 30 мин после завершения укладывания дисков следует поместить в термостат, где поддерживается температура 35°C. Если температура превышает 35 °С, это может привести к искажению результатов в отношении оксациллина/метициллина.

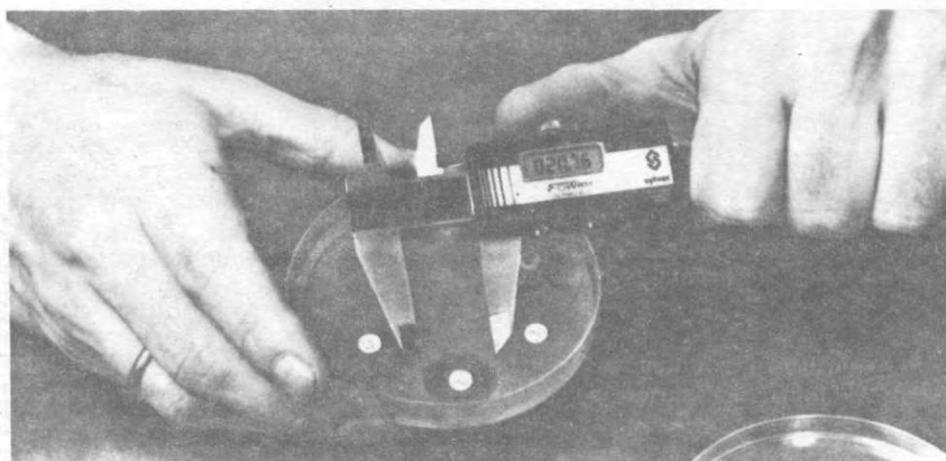
Ни в коем случае не следует инкубировать посевы в атмосфере углекислого газа.

После суточной инкубации следует измерить диаметр каждой зоны роста (включая диаметр диска) и записать их размер в миллиметрах. Интерпретацию полученных результатов проводят в соответствии с предельными размерами диаметров, показанных в табл. 14.

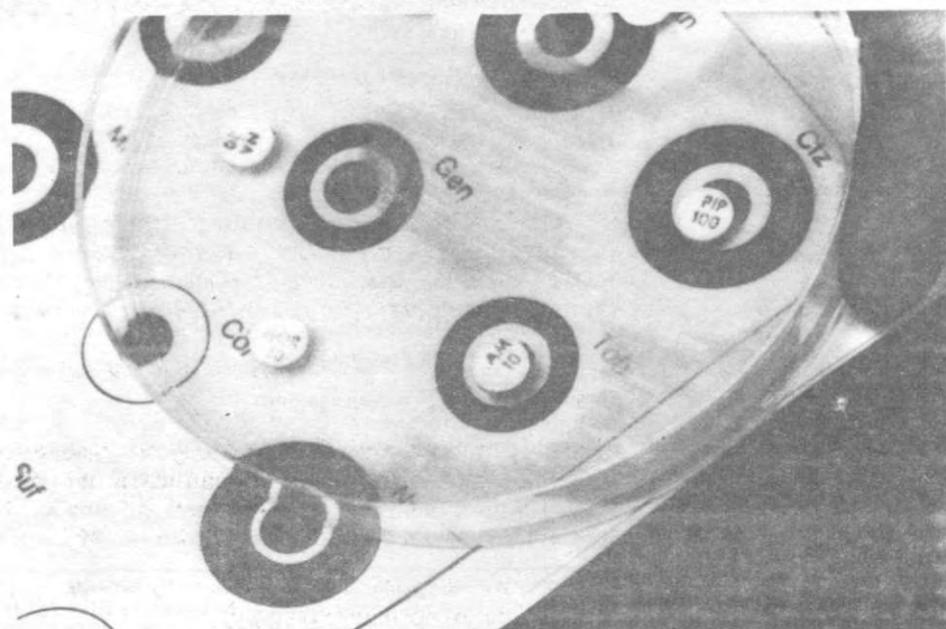
Измерения делают с помощью линейки с обратной стороны поверхности чашки, не открывая крышку.



Если среда непрозрачная, зону можно измерить с помощью штангенциркуля.



Трафарет (см. рис. 9) может быть использован для окончательного учета результатов теста на определение чувствительности.



О размере зоны задержки роста судят при просмотре посевов невооруженным глазом, и ее диаметр определяют от того места, где имеется начало микробного роста. Однако в трех случаях делают исключение:

- В тестах с сульфаниламидами и ко-тримоксазолом появляется скудный рост внутри зоны задержки роста: такой рост не следует принимать во внимание.
- Когда исследуют  $\beta$ -лактамазопродуцирующие стафилококки в отношении их чувствительности к пенициллину, зоны задержки роста характеризуются конгломератами с четким краем, которые легко выявляются при сравнении с чувствительным контролем, независимо от размера зоны задержки роста, результаты следует оценивать как устойчивость.
- Некоторые виды протеев могут прорасти внутри зон задержки роста, образующихся вокруг некоторых антибиотиков, однако зона задержки роста обычно четко очерчена, а тонкими пластинами ползучего роста следует пренебречь.

### Интерпретация размеров зоны

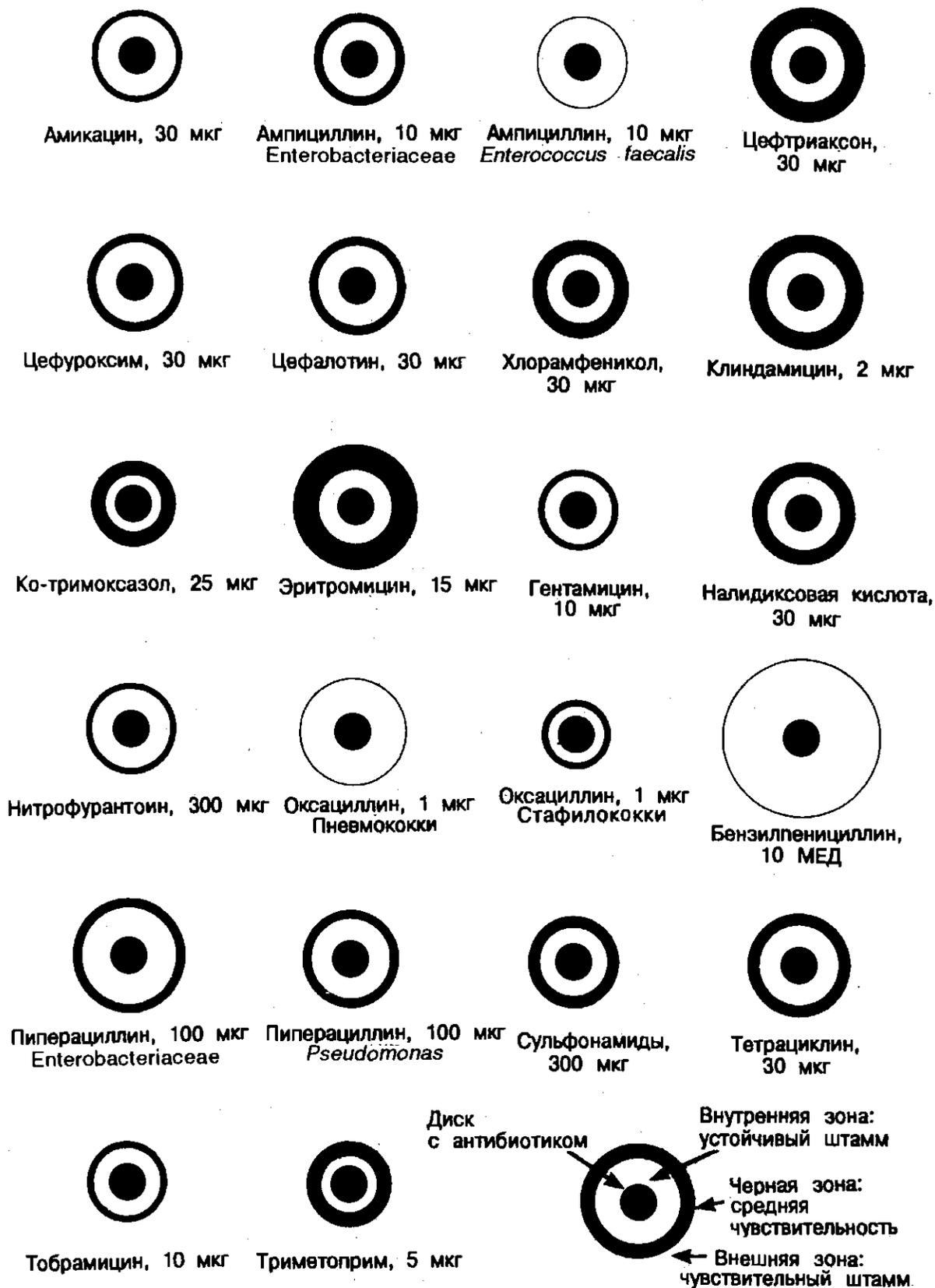
- *Использование трафарета.* Когда размер зоны сравнивают с трафаретом (рис. 9), оценку результатов по степени чувствительности можно провести немедленно: "чувствительность" — когда края зоны задержки роста выходят за черный круг; "устойчивость" — когда нет зоны задержки роста или она располагается внутри белого круга; "средняя чувствительность" — когда окружность зоны задержки роста лежит внутри черного круга.
- *Использование линейки.* Когда зону задержки роста измеряют линейкой в миллиметрах, результаты следует интерпретировать в соответствии с предельными размерами диаметров, представленными в табл. 14.

Таблица 14. Таблица интерпретации размеров зон задержки роста<sup>a</sup>

Антибиотик или химиотерапевтический агент	Диаметр зоны задержки (мм)			
	содержание вещества в диске	устойчивость	средняя/умеренная чувствительность	чувствительность
Амикацин	30 мкг	≤ 14	15—16	≥ 17
Ампициллин при определении:				
— Enterobacteriaceae	10 мкг	≤ 13	14—16	≥ 17
— Enterococcus faecalis	10 мкг	≤ 16	—	≥ 17
Бензилпенициллин при определении стафилококков	10 МЕД	≤ 28	—	≥ 29
Цефтриаксон	30 мкг	≤ 13	14—20	≥ 21
Цефуроксим калия	30 мкг	≤ 14	15—17	≥ 18
Цефалотин	30 мкг	≤ 14	15—17	≥ 18
Хлорамфеникол	30 мкг	≤ 12	13—17	≥ 18
Клиндамицин	2 мкг	≤ 14	15—20	≥ 21
Ко-тримоксазол	25 мкг	≤ 10	11—15	≥ 16
Эритромицин	15 мкг	≤ 13	14—22	≥ 23
Гентамицин	10 мкг	≤ 12	13—14	≥ 15
Налидиксовая кислота	30 мкг	≤ 13	14—18	≥ 19
Нитрофурантоин	300 мкг	≤ 14	15—16	≥ 17
Оксациллин при определении:				
— стафилококков	1 мкг	≤ 10	11—12	≥ 13
— пневмококков	1 мкг	≤ 19	—	≥ 20
Пиперациллин при определении:				
— Enterobacteriaceae	100 мкг	≤ 17	18—20	≥ 21
— Pseudomonas	100 мкг	≤ 14	15—17	≥ 18
Сульфаниламиды	300 мкг	≤ 12	13—16	≥ 17
Тетрациклин	30 мкг	≤ 14	15—18	≥ 19
Тобрамицин	10 мкг	≤ 12	13—14	≥ 15
Триметоприм	5 мкг	≤ 10	11—15	≥ 16

<sup>a</sup> National Committee for Clinical Laboratory Standards. Voluntary consensus standards for clinical laboratory testing. Villanova, PA, NCCLS, 1990.

Рис. 9. Диаметры зон задержки роста для определения антимикробной чувствительности при использовании стандартного дискодиффузионного метода



WNO 91127

## Методика прямого и непрямого определения чувствительности

Стандартизованный метод, описанный выше, предусматривает приготовление посевного материала из колоний, выросших на чашках с первичной культурой или на чашках с чистой культурой. Этот метод называется "методом непрямого определения чувствительности". В некоторых случаях, когда очень важен быстрый ответ, стандартизованный метод может быть заменен прямым посевом непосредственно патологического образца, например мочи, крови, тампона с гноем. Для образцов мочи прежде всего следует провести микроскопическое исследование осадка (после центрифугирования) с тем, чтобы выявить визуальные признаки наличия инфекции, например присутствие клеток гноя и(или) микроорганизмов. Затем моча может быть использована как посевной материал в стандартизованном тесте. Аналогичным образом тест на определение чувствительности может быть выполнен на культурах, полученных на инкубированной крови, в которой обнаружен бактериальный рост; также возможно использование для прямого посева тампона с гноем, в котором при окраске по Граму обнаружено значительное число микроорганизмов одного вида. Это называется "методом прямого определения чувствительности"; он имеет преимущества по сравнению с непрямым методом, поскольку позволяет получать результаты на 24 ч раньше. Главный недостаток прямого метода заключается в невозможности должным образом проконтролировать посевную дозу. Когда на чашках наблюдается слишком обильный или слишком скудный рост или вырастает смешанная культура, результаты следует интерпретировать с большой осторожностью, а тест на определение чувствительности следует повторить с использованием чистой культуры.

## Технические факторы, оказывающие влияние на размер зоны задержки роста при использовании дискодиффузионного метода

### Концентрация посевной дозы

Если посев слишком скудный, зона задержки роста будет больше, хотя чувствительность микроорганизма неизменна. Относительно устойчивый штамм в этом случае может быть учтен как чувствительный. Наоборот, если посев слишком плотный, размер зоны задержки роста будет уменьшен и чувствительный штамм может быть учтен как устойчивый. Обычно оптимальные результаты получают, когда величина посевной дозы обеспечивает почти сливной рост.

### Продолжительность аппликации дисков

В том случае, когда чашки, засеянные штаммом, в отношении которого проводится тестирование, оставляют при комнатной температуре на срок, превышающий установленное стандартом время, размножение посеянного микроорганизма может начаться еще до аппликации диска с антибиотиком. Это приводит к уменьшению диаметра зоны задержки роста, вследствие чего при учете результатов чувствительный штамм будет учтен как устойчивый.

### Температура инкубации

При выполнении теста на определение чувствительности инкубацию обычно проводят при температуре 35 °С, которая является оптимальной для роста.

При более низкой температуре необходимо больше времени для эффективного роста культуры, в результате чего зона задержки роста будет больше. Когда исследованию в отношении метицилина (оксацилина) подвергают обладающий гетерогенной устойчивостью штамм *Staphylococcus aureus*, резистентная часть популяции может быть выявлена при температуре 35 °С. При более высоких температурах вся популяция дает рост, который интерпретируют как чувствительность. При температурах 35 °С и ниже устойчивые колонии вырастают внутри зоны задержки роста. Эти устойчивые колонии легче определить, если чашки до учета результатов оставить на несколько часов при комнатной температуре. Такие колонии обязательно следует идентифицировать, чтобы выяснить, не принадлежат ли они к контаминантам.

### Время инкубации

Большинство методик рекомендует время инкубации между 16 и 18 ч. При острой необходимости, однако, предварительный учет результатов может быть проведен через 6 ч. При обычной рутинной работе этого делать не рекомендуется, результаты всегда следует подтверждать после инкубации, проведенной с соблюдением необходимого времени.

### Размер чашки, толщина агарового слоя среды и расположение дисков с антибиотиками

Обычно определение чувствительности проводят на чашке диаметром 9—10 см, помещая 6 или 7 дисков на одну чашку. Если необходимо определить чувствительность к большему числу антибиотиков, следует использовать две чашки или одну чашку диаметром 14 см. Чрезвычайно большие зоны задержки роста могут формироваться на средах, разлитых тонким слоем; обратная зависимость справедлива для питательных сред, разлитых толстым слоем. Незначительные изменения глубины агарового слоя не оказывают существенного влияния. Правильное расположение дисков является необходимым условием и позволяет избежать частичного совпадения зон задержки роста разных дисков или деформации зон у края чашки (рис. 10).

### Содержание активных веществ в дисках

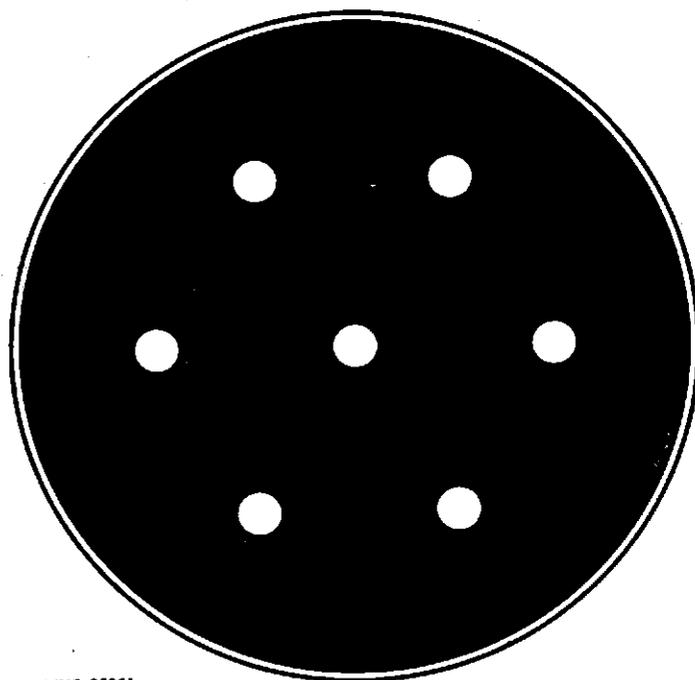
Диаметр зоны задержки роста зависит от количества лекарственного препарата в диске. Если во время хранения дисков произошло снижение содержания препарата в результате разрушения активного вещества, размер зоны задержки роста будет соответственно меньше.

### Состав питательной среды

Питательная среда оказывает влияние на размер зоны за счет своих ростовых свойств в отношении конкретных видов микроорганизмов, уровня диффузии антибиотиков и активности ингредиентов. Использование соответствующей питательной среды для определенного метода является необходимым составным элементом исследования.

Множество факторов, влияющих на размер зоны задержки роста, которые способны привести к получению разных результатов в отношении одного и того же микроорганизма, наглядно демонстрируют необходимость стандартизации дискодиффузионного метода. Лишь при соблюдении основопо-

Рис. 10. Трафарет для равномерного укладывания дисков с антибиотиками по чашкам диаметром 90 мм



WHO 85961

лагающих принципов и точном выполнении требований методики могут быть получены достоверные результаты. Произвольное изменение любого из факторов, имеющих значение для определения чувствительности, может привести к сообщению клиницистам искаженных необъективных результатов исследования.

За точным и аккуратным соблюдением методики работы следует установить постоянный надзор путем реализации программы контроля качества, описанной ниже. Любые выявленные отклонения должны быть немедленно исследованы, и предприняты неотложные меры для исправления положения и устранения ошибок.

## Контроль качества

### Необходимость контроля качества при постановке тестов на определение чувствительности

Окончательный результат определения чувствительности дискодиффузионным методом зависит от множества факторов. Некоторые факторы, такие, как посевная доза и температура инкубации, легко контролировать, однако работники лабораторий редко знают точный состав производимых промышленностью питательных сред или отличия качества разных партий препаратов, кроме того, невозможно проконтролировать содержание антимикробного агента в диске. В связи с этим результаты теста на определение чувствительности должны быть объектом постоянного мониторинга, являющегося элементом программы контроля качества; непосредственно программа контроля качества может рассматриваться как самостоятельный раздел работы.

Точность и аккуратность выполнения теста на определение чувствительности контролируется путем параллельного использования контрольных штаммов с известной чувствительностью к антимикробным агентам. Контрольные штаммы исследуют точно по такой же методике, что и целевые микроорганизмы, чувствительность которых определяют. Размеры зон задержки роста, выявленных в тестах с контрольными микроорганизмами, должны полностью совпадать с предельными размерами диаметров, представленными в табл. 13. Если результаты регулярно не совпадают с этими параметрами, их следует рассматривать как свидетельство того, что при выполнении определения чувствительности допущена техническая ошибка или что использовавшиеся реагенты оказались неудовлетворительного качества. Каждый реагент и каждый этап теста на определение чувствительности следует подвергнуть исследованию с тем, чтобы установить причину допущенной ошибки и устранить ее.

### Стандартная методика контроля качества

В программах контроля качества при определении чувствительности к антибиотикам следует использовать референс-штаммы тех же видов бактерий, которые изучают параллельно в тестах с "клиническими" культурами. Эту процедуру целесообразно осуществлять еженедельно или при использовании каждой пятой упаковки для тестов и дополнительно каждый раз, когда открывают новую упаковку агара Мюллера—Хинтона или новую упаковку дисков.

### Стандартные штаммы для контроля качества

*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)  
*Escherichia coli* (ATCC 25922)  
*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

Культуры могут быть получены из национальных хранилищ живых культур. Они доступны на коммерческой основе в форме флаконов или ампул высушенной чистой культуры.

Культуры для каждодневного пользования следует выращивать на скошенном питательном агаре (для этих целей подходит триптиказо-соевый агар) и хранить в холодильнике. Пересевы культур на свежий скошенный агар следует осуществлять каждые 2 нед.

### Посев материала

Культуры можно сеять в бульоны любых типов и инкубировать до тех пор, пока в бульоне не появится микробный рост (помутнение). Каждый бульон пересевают штрихом на чашку с агаром и инкубируют в течение суток. Затем следует отобрать единичные колонии и направить их для определения чувствительности по методике, описанной в данной главе в разделе "Методика".

### Расположение дисков с антимикробными агентами

После посева культуры на чашку с агаром на нее укладывают соответствующие диски, как это описано в данной главе в разделе "Методика". Диски, которые следует подобрать для каждого контрольного штамма, перечислены в табл. 13.

### Учет результатов

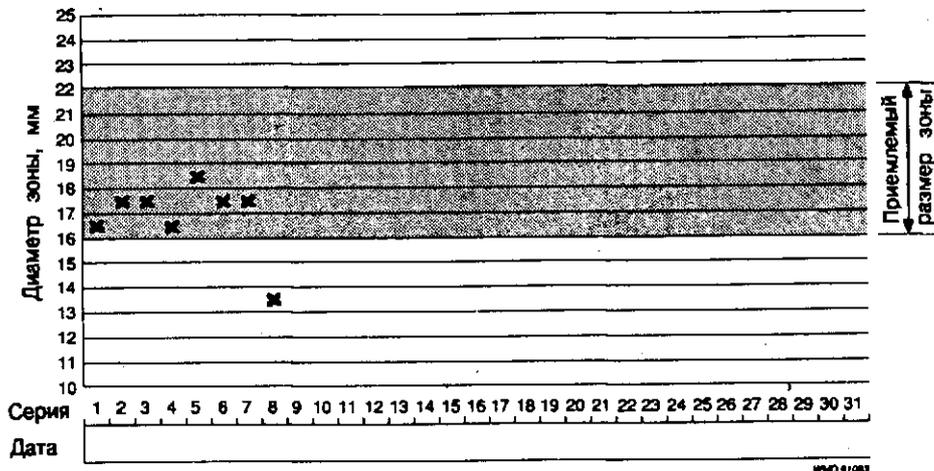
После инкубирования посевов в течение 16—18 ч следует линейкой измерить диаметры зон задержки роста, результаты измерений и дату

проведения анализа заносят в специальную карточку контроля качества. В такой карточке фиксируют информацию по каждой комбинации диск—штамм. Карточка представляет собой график, на котором по оси ординат в масштабе фиксируют размер (диаметр) зоны задержки роста, по оси абсцисс — дату проведения анализа. Пример такой карточки приведен на рис. 11. В том случае, когда результаты оказываются вне пределов предусмотренных лимитов, следует принять меры для улучшения качества проведения исследования.

Выраженные отклонения результатов, которые нельзя объяснить техническими ошибками в методике, могут свидетельствовать о загрязнении образцов посторонней микрофлорой либо о внезапном изменении чувствительности или ростовых характеристик контрольного штамма. Если это происходит, следует получить свежий штамм из надежного источника.

Рис. 11. Карточка контроля качества выполнения тестов на определение антимикробной чувствительности

Контрольный диск: диск с ампициллином, 10 мкг.  
Контрольный штамм: *E.coli* ATCC 25922



ИМО 91083

---

## **Часть II**

**Основные питательные среды  
и реагенты для выделения  
и идентификации этиологических  
агентов заболеваний**

---

## Введение

С помощью нескольких основных диагностических препаратов лаборатория может внести важный вклад в оказание рациональной медицинской помощи больному, проведя точную этиологическую диагностику. Отсутствие возможностей для подтверждения диагноза оказывает обескураживающее действие на работников здравоохранения, которые не получают полного удовлетворения от выполнения своих профессиональных обязанностей.

В большинстве развивающихся стран работа бактериологических лабораторий осложняется в связи с нехваткой питательных сред и основных реагентов, импортирование которых стоит очень дорого. Однако число питательных сред и реагентов, которые следует закупать путем рационального отбора, можно свести к нескольким основным субстанциям, подобно тому, как производят отбор в отношении основных лекарственных средств. Кроме того, некоторые питательные среды и реагенты можно производить и готовить на месте. Применение этих двух подходов приведет к существенному уменьшению потребности в средах и реагентах иностранного производства, а также повысит обеспеченность лаборатории доступными готовыми материалами, необходимыми для оказания помощи больному и проведения эпидемиологических исследований.

Эта глава подготовлена с целью помочь руководителям лабораторий сосредоточить свои финансовые ресурсы для приобретения наиболее релевантных питательных сред и сопутствующих реагентов. Глава состоит из двух разделов, каждый из которых содержит ряд перечней.

## Установление приоритетов для патогенов, питательных сред и диагностических реагентов

Определенную подвижность структуре удалось придать, введя дифференцированную шкалу приоритетов для патогенов, питательных сред и реагентов:

- Категория 1 — высокий уровень приоритетности
- Категория 2 — средний уровень приоритетности
- Категория 3 — низкий уровень приоритетности

### Установление приоритетов для патогенов

Категории для патогенов устанавливаются на основе нескольких факторов, таких, как быстрота выделения, клиническая значимость, тяжесть течения болезни, эпидемический потенциал и соотношение показателя затраты — выгода при выделении и (или) идентификации. В качестве примера, касающегося последнего фактора, можно привести хламидиоз, хотя возбудитель заболевания считается очень важным патогеном, приоритет его низок, поскольку для его выявления не существует дешевой лабораторной техники. Такая категоризация не является абсолютной величиной и может быть различной в разных странах и лабораториях в зависимости от местных особенностей отдельных заболеваний, оснащенности лабораторий, финансовых возможностей.

### Установление приоритетов для питательных сред и реагентов

Уровень приоритетности питательных сред и реагентов обусловлен уровнем приоритетности патогенов, для выделения и идентификации которых они используются. Однако полного совпадения может и не быть: если среда или реагент используются очень широко, уровень их приоритетности может считаться более высоким, чем уровень приоритетности любого из патогенов, для выделения и идентификации которых их применяют.

*Категория 1.* Каждая лаборатория, где производят общие диагностические бактериологические исследования, должна быть укомплектована питательными средами и реагентами, отнесенными к высокому уровню приоритетности. В большинстве своем это среды и реагенты многоцелевого назначения, несложные для приготовления; обычно их немного.

*Категория 2.* Питательные среды и реагенты, отнесенные к среднему уровню приоритетности, — это дополнительные полезные материалы, позволяющие проводить более сложные и всесторонние лабораторные диагностические исследования, способствуя совершенствованию эпидемиологических исследований, хотя и не всегда необходимые для оказания немедленной помощи пациенту (к их числу относятся, например, группоспецифическая антисыворотка для менингококков).

*Категория 3.* Питательные среды и реагенты, отнесенные к низкому уровню приоритетности, — это вещества, редко используемые для диагностических тестов в отношении конкретных пациентов, однако они весьма полезны в учебных, исследовательских и специализированных справочных лабораториях. Эта категория объединяет среды и реагенты, которые либо слишком дороги для использования в повседневной работе, либо требу-

ются для выявления редко встречающихся или с трудом выявляемых микроорганизмов, в отношении которых показатель “затраты — эффективность” будет, вероятно, низок.

Ниже перечислены имеющие высокую значимость с точки зрения общественного здравоохранения патогенные микроорганизмы, а также питательные среды и диагностические реагенты, необходимые для выполнения наиболее распространенных бактериологических исследований; указаны также их категории по шкале приоритетов. Категоризацию следует проводить для каждой конкретной лаборатории с учетом местных условий.

## Кровь

Наиболее часто встречающиеся патогены

### Патогены высокого уровня приоритетности

Salmonella typhi и сальмонеллы других видов  
Другие грамотрицательные палочки  
Neisseria meningitidis  
Стрептококки (S.pyogenes, S.pneumoniae, зеленящие стрептококки)  
Staphylococcus aureus

### Патогены среднего уровня приоритетности

Haemophilus influenzae  
Bacteroides fragilis  
Pseudomonas aeruginosa

### Патогены низкого уровня приоритетности

Candida albicans и Cryptococcus neoformans  
Brucella  
Pseudomonas pseudomallei  
Другие неферментирующие микроорганизмы, кроме Pseudomonas aeruginosa

Питательные среды и диагностические реагенты

### Бульоны для культивирования крови

	<i>Категория приоритетности</i>
Триптиказо-соевый бульон может быть заменен другими обогащенными средами, например бульоном из сердечно-мозговой вытяжки	2
Возможно, но необязательно добавление полианетола сульфоната калия (ПСК) 0,25 г/л	
“Анаэробный” бульон для культивирования крови: тиогликолевый бульон, бульон Шедлера или анаэробный бульон Вилкинса—Халгрена	2

### Среды для выделения

Субкультивирование на кровяном агаре, шоколадном агаре, агаре Мак-Конки	1
---	---

**Среды и реагенты для идентификации**

Оксидазный реагент	1
Диск с оптохином, диск с бацитрацином	1
Реагент для определения $\beta$ -лактамазы	1
V и XV факторы	2
Агглютинирующая сыворотка для <i>Neisseria meningitidis</i> (поливалентная группа — специфическая А, В, С)	3
Антисыворотка типа В к <i>Haemophilus influenzae</i>	3
Коагулаза плазмы	1
Сальмонеллезная агглютинирующая антисыворотка	1

**Спинномозговая жидкость**

Наиболее часто встречающиеся патогены

**Патогены высокого уровня приоритетности**

*Neisseria meningitidis*  
*Streptococcus pneumoniae*  
*Haemophilus influenzae*  
 Грамотрицательные палочки  
*Mycobacterium tuberculosis*  
*Cryptococcus neoformans*

**Патогены среднего уровня приоритетности**

*Streptococcus agalactiae* (группа В)

**Патогены низкого уровня приоритетности**

*Listeria monocytogenes*

Питательные среды и диагностические реагенты

**Среды для выделения**

	<i>Категория приоритетности</i>
Кровяной агар (со столбиком стафилококка)	1
Шоколадный агар	1
Агар Мак-Конки	1
Декстрозный агар Сабуро	2
Среда Левенштейна—Йенсена	2

**Реагенты для идентификации**

Оксидазный реагент	1
Диск с оптохином	1
Реагент для определения $\beta$ -лактамазы	1
V и VX факторы	2
Агглютинирующая сыворотка для <i>Neisseria meningitidis</i> (поливалентная и группоспецифическая А, В, С)	3
Антисыворотка типа В к <i>Haemophilus influenzae</i>	3

## Тесты для экспресс-диагностики

Набор тестов для экспресс-диагностики  
менингококков

3

## Моча

### Наиболее часто встречающиеся патогены

Патогены высокого уровня приоритетности  
Escherichia coli  
Другие грамотрицательные палочки  
Энтерококки  
Staphylococcus saprophyticus

### Патогены среднего уровня приоритетности

Pseudomonas и другие неферментирующие палочки  
Другие стафилококки

### Патогены низкого уровня приоритетности

Candida albicans  
Mycobacterium tuberculosis

## Среды для выделения и диагностические реагенты

### Среды для выделения и количественных оценок

*Категория  
приоритетности*

Агар с бралацином (может быть заменен  
пурпурным лактозным агаром, агаром  
Мак-Конки без кристаллического фиолетового  
или агаром с эозин-метиленовым синим)

1

### Среды и реагенты для идентификации

Желчно-эскулиновый агар (для энтерококков) 2  
Диск с новобиоцином (5 мкг) для дифференциации  
коагулазо-отрицательных стафилококков 3  
Таблетка  $\beta$ -глюкуронидазы (РГИА) для  
идентификации E.coli 2  
Для грамотрицательных палочек:  
Агар Клиглера с железом 1  
Среда для определения подвижности,  
индолообразования и уреазной активности 1  
Реактив Ковача на индол 1  
Оксидазный реагент 1  
ONPG-тест 2  
Цитратный агар Симонса 2  
Цистин-декарбоксилазный бульон (Мюллера) 2  
Для стафилококков и энтерококков:  
Коагулаза плазмы 1  
Каталазный тест (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 1  
Оксидазный реагент 1  
Генератор для создания анаэробных условий 2

## Кал

Наиболее часто встречающиеся патогены

### Патогены высокого уровня приоритетности

*Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*

*Shigella*

*Vibrio cholerae*, серогруппа 01, нехолерные вибрионы, *Aeromonas*, *Plesiomonas*

### Патогены среднего уровня приоритетности

Не относящиеся к возбудителю брюшного тифа сальмонеллы и эдвардселлы

*Yersinia enterocolitica*

*Campylobacter jejuni*

*Clostridium difficile*

### Патогены низкого уровня приоритетности

*Escherichia coli* (энтеропатогенные, энтеротоксигенные, энтероинвазивные и энтерогеморрагические)

## Питательные среды и диагностические реагенты

### Транспортные среды

Категория  
приоритетности

Среда Кери—Блэр (для всех патогенов)

1

Забуференный глицерин в физиологическом растворе (кроме *Vibrio* и *Campylobacter*)

2

### Среды для обогащения

Селенитовый (F) бульон

2

Щелочная пептонная вода

2

### Среды для выделения

Агар Мак-Конки (с кристаллическим фиолетовым)

1

Дезоксихолат-цитратный агар (может быть заменен агаром шигелла-сальмонелла)

1

ТСBS-агар (тиосульфат-цитрат-желчно-солевой; может быть заменен

теллурит-таурохолат-желатиновым агаром

Монсура)

1

Среда для кампилобактера:

Колумбийский агар или любой кровяной агар в качестве основы с добавлением лизированной крови и антибиотиков

2

Селективная среда для *Clostridium difficile*

3

### Среды и реагенты для первичной идентификации

	<i>Категория приоритетности</i>
Агар Клиглера с железом (может быть заменен трехсахарным агаром с железом, но только для кишечных патогенов)	1
Среда для определения подвижности, индолообразования и уреазной активности (может быть заменена средой для теста на определение подвижности с добавлением пептонно-уреазного бульона)	1
Реактив Ковача на индол	1
Оксидазный реагент	1

### Среды и реагенты для специфической идентификации

#### Биохимическая активность

ONPG-тест (диск)	2
Лизин-декарбоксилазный бульон (основа -- бульон Мюллера)	2
Цитратный агар Симмонса	2
Пептонная вода с реактивом Андреде (или бульон с феноловым красным)	2
Ацетатный агар	3
ДНКазный агар	3
Вибриостатический компонент 0/129-диск	3

#### Серологические свойства: агглютинирующие антисыворотки

Salmonella:	поливалентная 0	1
S.typhi	против ОД (9,12), против Н:d, против V	1
S.typhimurium	против 0:4,5 (В), против Н:i	2
Shigella	поливалентная flexneri, sonnei, boydii, dysenteriae, специфическая против S.dysenteriae 1 (Shiga)	1
Vibrio	поливалентная 0:1	1
	специфическая против огава и против инаба	3

### Нижние дыхательные пути

Наиболее часто встречающиеся патогены

#### Патогены высокого уровня приоритетности

*Mycobacterium tuberculosis*  
*Streptococcus pneumoniae*  
*Haemophilus influenzae*  
*Staphylococcus aureus*  
*Klebsiella pneumoniae*

#### Патогены среднего уровня приоритета

Энтеробактерии  
*Candida albicans*  
*Branhamella catarrhalis*

Питательные среды и диагностические реагенты

**Среды для выделения:**

	<i>Категория приоритетности</i>
Кровяной агар	1
Шоколадный агар	1
Агар Мак-Конки	1
Среда Левенштейна—Йенсена	2
Декстрозный агар Сабуро	3
Селективный кровяной агар для <i>Haemophilus</i> (бацитрацин или ванкомицин)	3

**Реагенты для идентификации:**

Диск с оптохином	1
V и XV факторы	2
Коагулаза плазмы	1

**Верхние дыхательные пути**

Наиболее часто встречающиеся патогены

**Патогены высокого уровня приоритетности**

- Streptococcus pyogenes* (группа А) (глотка)
- Corynebacterium diphtheriae* (глотка и нос)
- Streptococcus pneumoniae* (уши и синусы)
- Haemophilus influenzae* (уши и синусы)

**Патогены среднего уровня приоритетности**

- Candida albicans* (ротоглотка)
- Staphylococcus aureus* (уши и синусы)
- Branhamella catarrhalis* (уши и синусы)

**Патогены низкого уровня приоритетности**

- Грамотрицательные палочки и *Pseudomonas* (уши)
- Neisseria meningitidis* (назофарингеальное носительство)

Питательные среды и диагностические реагенты

**Среды для выделения**

	<i>Категория приоритетности</i>
Кровяной агар (готовится на основе, содержащей свободные карбоксилгидратные радикалы)	1
Шоколадный агар	2
Коагулированная сыворотка или яичная среда Дорсе	2
Кровяной агар с теллуридом	2
Модифицированная среда Тайера—Мартена (для гонококков и менингококков)	3

### Реагенты для идентификации

Категория  
приоритетности

Диск с бацитрацином, диск с оптохином	1
Каталазный и коагулазный реагенты	1
Карбогидратная гидролизованная среда для <i>Neisseria</i>	2
V и XV факторы (диски или бумажные полоски)	2

### Наборы для экспресс-диагностики

Специальный набор для гемолитических стрептококков	3
--	---

### Исследование материала, полученного из мочеполовых путей, с целью обнаружения возбудителей, передаваемых половым путем

Наиболее часто встречающиеся патогены

#### Патогены высокого уровня приоритетности

<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
<i>Treponema pallidum</i> (микроскопия в темном поле)	

#### Патогены среднего уровня приоритетности

<i>Haemophilus ducreyi</i>	
<i>Gardnerella vaginalis</i> (микроскопия)	
<i>Candida albicans</i> (микроскопия)	
<i>Trichomonas vaginalis</i> (микроскопия)	

#### Патогены низкого уровня приоритетности

<i>Chlamydia trachomatis</i>	
------------------------------	--

### Питательные среды и диагностические реагенты

#### Транспортные среды

Транспортная среда Амьеса или Стюарта	1
---------------------------------------	---

#### Среды для изоляции

Модифицированная среда Тайера—Мартена или нью-йоркская среда	1
Агар Мюллера—Хинтона из лошадиной крови с шоколадной добавкой + ванкомицин + изовиталекс для <i>H. ducreyi</i>	3

#### Диагностические реагенты

Оксидазный реагент	1
Нитроцефин или другой $\beta$ -лактамазный реагент	1

## Гной и экссудаты

Наиболее часто встречающиеся патогены

### Патогены высокого уровня приоритетности

*Streptococcus pyogenes*  
*Staphylococcus aureus*

### Патогены среднего уровня приоритетности

Энтеробактерии  
*Pseudomonas* и другие неферментирующие бактерии  
*Clostridium perfringens*  
*Bacteroides* и другие строгие анаэробы  
Стрептококки (других видов)

### Патогены низкого уровня приоритетности

*Bacillus anthracis*  
*Mycobacterium tuberculosis*, *Mulcerans* и др.  
*Pasteurella multocida*

## Питательные среды и диагностические реагенты

### Среды для выделения

	<i>Категория приоритетности</i>
Кровяной агар	1
Агар Мак-Конки	1
Маннито-солевой агар	2
Тиогликолевый бульон (с индикатором) (может быть заменен средой из вареного мяса)	2
Триптиказо-соевый бульон	1

### Среды и реагенты для идентификации

Коагулазная плазма	1
Каталазный реагент (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1
Оксидазный реагент	1
Генератор для создания анаэробных условий	2

## Перечень рекомендуемых питательных сред и диагностических реагентов для лабораторий среднего звена

### Питательные среды

<i>Рекомендуемая</i>	<i>Альтернативная</i>	<i>Категория приоритетности</i>
Ацетатный агар		3
Пептонная вода с реактивом Андрее	Бульон с феноловым красным	2

**УСТАНОВЛЕНИЕ ПРИОРИТЕТОВ ДЛЯ ПАТОГЕНОВ, ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ РЕАГЕНТОВ**

<i>Рекомендуемая</i>	<i>Альтернативная</i>	<i>Категория приоритетности</i>
Желчно-эскулиновый агар		1
Кровяной агар (см. триптиказо-соевый агар)	Колумбийский агар	1
Бролациновый агар	Пурпурный лактозный агар	1
Декарбоксилазный бульон (Мюллера)		2
ДНКазный агар		3
Агар Клиглера с железом		1
Коагулированная сыворотка Леффлера	Янчная среда Дорсе	1
Среда Левенштейна—Йенсена		1
Агар Мак-Конки (с кристаллическим фиолетовым)		1
Маннито-солевой агар		2
Среда для определения подвижности, индолообразования и уреазной активности	Среда для определения подвижности + уреазный бульон + пептонная (триптонная) вода	1
Агар Мюллера—Хинтона		1
Декстрозный агар Сабуро		1
Дезоксихолат-цитратный агар	Агар сальмонелла-шигелла	1
Селснитовый (F) бульон		2
Цитратный агар Симмонса		2
Триптиказо-соевый агар		1
Триптиказо-соевый бульон	Бульон из сердечно-мозговой вытяжки	1
Тиогликолевая среда (с индикатором)	Бульон Шедлера, анаэробный бульон Вилкинса—Чалгрена, среда из вареного мяса	2
TCBS (Тиосульфат-цитрат-желточно-солевой агар)	Теллурит-тауро-холат-желатинный агар (среда Монсура)	1
Транспортная среда (Амьес)	Транспортная среда (Стюарта или Кери—Блэр)	1

**Ингибиторы или антибиотики для использования в средах или в качестве реагентов**

	<i>Категория приоритетности</i>
Бацитрацин (для выделения <i>Haemophilus</i> spp.)	3
Антибиотики-добавки для культивирования <i>Campylobacter</i>	2
Хлорамфенкол (для выделения грибов)	1
Раствор теллурита (для выделения <i>Corynebacterium diphtheriae</i> )	2
Ванкомицины (для выделения <i>Haemophilus ducreyi</i> или <i>H. influenzae</i> )	3
Антибиотики-добавки для культивирования гонококков: ванкомицин, колистин, нистатин (триметоприм): ВКН (ВКНТ)	1

Антибиотики-добавки в селективный агар для  
выделения *Clostridium difficile* 3

### Обогащители для питательных сред

Изовиталекс (поливитекс, витокс, добавка В,  
добавка VХ, добавка СVA) 2  
Полианетол-сульфонат калия 3

### Диагностические диски, таблетки или бумажные полоски

$\beta$ -глюкуронидаза 2  
Бацитрацин 1  
Новобиоцин (5 мкг) 3  
ONPG 1  
Оптохин 1  
Оксидаза 1  
V, XV ростовые факторы 2  
Вибриостатический компонент 0/129 3  
Диск с нитроцефним (цефиназ) или реагент 1

### Диагностические наборы

Набор для ускоренной идентификации  
менингококков 3  
Набор для серологического типирования  
гемолитических стрептококков 3

### Прочие диагностические реагенты

Сульфат бария, стандарт (для метода  
Керби—Бауэра) 1  
Забуференный раствор глицерина в  
физиологическом растворе (для транспортной  
среды для проб кала) 2  
Реагенты для окраски по Граму 1  
Пероксидаза (для определения каталазы) 1  
Индийские чернила (для обнаружения капсул) 2  
Реактив Ковача (на индол) 1  
Оксидазный реагент (диметил-р-фенилсидиамин) 1  
Плазма (для определения коагулазной активности и  
пробирочного теста на наличие микробного  
роста) 1  
Реактивы для окраски по Цилю—Нильсену 1  
Карбогидрат: глюкоза, лактоза, мальтоза, маннит,  
сахароза 2  
Аминокислоты: лизин (для определения  
дегидролазной активности) 2  
Генератор для создания анаэробных условий 2

## Диски для определения чувствительности

### Антибиотики, включенные в качестве основных препаратов в перечень ВОЗ 1990 г.

Ампициллин  
Хлорамфеникол  
Ко-тримоксазол (сульфаметоксазол-триметоприм)  
Эритромицин  
Гентамицин  
Нитрофурантоин  
Оксациллин  
Бензилпенициллин  
Пиперациллин  
Сульфонамид  
Тетрациклин (или доксициклин)  
Триметоприм

### Антибиотики резерва

Амикацин  
Цефтриаксон  
Цефуроксим  
Цефалотин  
Ципрофлоксацин или другие флоквинолоны  
Клиндамицин  
Налидиксовая кислота  
Тобрамицин

### Диагностические антисыворотки

		<i>Категория приоритетности</i>
Сальмонелла:	поливалентная O	1
	специфическая O-групповая : 9,12 (D) и Vi	1
	специфическая O-групповая : 4,5 (B)	2
	специфическая H:d,i	2
Шигелла:	поливалентная flexneri, поливалентная boydii, поливалентная dysenteriae, sonnei	
	специфическая: Shigella dysenteriae 1 (Шига)	1
Vibrio cholerae	поливалентная O:1	1
	специфическая: огава, инаба	3
Neisseria meningitidis	поливалентная и группоспецифическая A,B,C	3
Haemophilus influenzae	тип b	3

---

## Рекомендуемая литература

- August, M.J. et al. Quality control and quality assurance practices in clinical microbiology, *Cumitech*, 3A: 1-14 (1990).
- Blazevic, D.J. et al. Practical quality control procedures for the clinical microbiology laboratory. *Cumitech*, 3: 1-12 (1976).
- Cheesbrough, M. *Medical laboratory manual for tropical countries Vol. II: Microbiology*, London, Tropical Health Technology/Butterworths, 1989.
- Collins, C.H., Lyne, P.M. *Microbiological methods*, 5th ed. London, Butterworths, 1985.
- Gillies, R.P., Paul, J. *Bacteriology illustrated*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1983.
- Howard, B.J. et al. *Clinical and pathogenic microbiology*. St. Louis, C.V. Mosby, 1987.
- Koneman, E.W. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 3rd ed. Philadelphia, Lippincott, 1988.
- Lenette, H. et al., ed. *Manual of clinical microbiology*, 4th ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1985.
- Millers, J.M. *Quality control in microbiology*. Atlanta G.A. Centers for Diseases Control, 1987.
- Miller, J.M. Wentworth, B.B. *Methods for quality control in diagnostic microbiology*. Washington DC, American Public Health Association, 1985.
- Montefiore, D.G. et al. *Tropical microbiology*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1984.
- Stokes, E.J., Ridgeway, G.L. Quality control. In: *Clinical bacteriology*, 6th ed. London, Edward Arnold, 1987.
- Turk, D.C. et al. *A short textbook of medical microbiology*. London, Hodder and Stoughton, 1983.

# Предметный указатель

- Аборт септический 63  
Абсцессы (см. также Гной)  
этиологические агенты 70—71  
ягодичные 75  
печени (амебный) 75  
легких 43—44  
взятие материала и транспортировка 69, 73, 84  
подкожные 70  
определение чувствительности 80—82  
туберкулезные, холодные 74
- Агар  
ацетатный 117, 120  
бролациновый 38, 116, 120  
кровяной  
для культивирования спинномозговой жидкости 30, 31  
для анаэробных бактерий 84  
селективный для *Haemophilus influenzae* 30, 47, 117  
выполнение тестов 12  
категория приоритетности 113, 118, 120  
гнойный экссудат 77, 78  
для краткосрочного хранения культур 17  
для культивирования мокроты 46  
для культивирования *Streptococcus ruodenes* 54, 55  
с теллуридом селективным 57, 118  
со столбиком *Staphylococcus aureus* 30, 31, 115  
шоколадный 46  
для субкультивирования крови 26  
для культивирования спинномозговой жидкости 30, 31  
для культивирования гонококков 60  
выполнение тестов 12  
категория приоритетности 114, 115, 118, 119  
для кратковременного хранения культур 17  
колумбийский 46, 117, 120  
цистин-триптиказный 16  
дезоксихолат-цитратный 10, 12, 42, 117, 120  
ДНКазный 117, 120  
Клигlera с железом 12, 57, 80, 116, 117, 120  
Мак-Конки  
для культивирования спинномозговой жидкости 30, 31  
категория приоритетности 114, 115, 117, 119  
гнойный экссудат 77  
для культивирования мокроты 17  
для культивирования хала 6, 10, 42  
с кристаллическим фиолетовым 12, 38, 117, 120  
без кристаллического фиолетового 116  
Маннито-солевой 12, 46, 77, 79, 119, 120  
Монура 117, 120  
Мюллера—Хинтона 12, 77, 95, 107, 120  
обогащение для культивирования  
*Haemophilus ducreyi* 68, 119  
с 5 % бараньей кровью 42  
Пурпурный лактозный агар 38, 116, 120  
Сабура с декстрозой 30, 46, 47, 77, 114, 118, 120  
сальмонелла — шигелла 10, 12, 117, 121  
Симмонса цитратный 12, 116, 117, 120  
Тайера — Мартена 12  
модифицированный 60, 118, 119  
тиосульфат-цитрат-желчно-солевой (TCSC) 12, 42, 116, 120  
трехсахарный с железом 13, 116  
триптиказо-соевый 17, 20  
Вилкинса — Чалгрена анаэробный 85  
ксилоза-лизин-дезоксихолатный 42  
щелочной желчно-солевой 42  
желчно-эскулиновый 12, 56, 116, 121
- Acinetobacter* 26, 48, 52, 59  
*Acinetobacter calcoaceticus* 12  
биотип *Wolffi* 13  
*Actinomyces* 78, 81  
*Actinomyces israelii* 74  
Актиномикозы 72, 76  
Аэробные бактерии, облигатные 83  
*Aeromonas* 116  
Американская коллекция типов культур (ATCC) 14  
Амикалин 93, 97, 103, 104, 123  
Аминокислоты 122  
Аминогликозиды 85, 96  
Амоксициллин 95  
Ампициллин 93, 94, 96, 103, 104, 122  
Анаэробы 82—87, 120  
определение антимикробной чувствительности 87  
бактериология 82—87  
среды для культивирования 85  
факультативные 82  
идентификация 86—87  
инкубация 83  
методика посева и выделения 85  
в ранах 72  
облигатные 82  
фарингеальные 52, 53  
взятие материала и транспортировка 84  
хранение культур 16  
вагинальные 61, 64, 65
- Анаэробная бактериемия 27  
Анаэробная емкость 8, 84  
Анаэробная смешанная флора 5, 76, 77, 78  
Прибор для создания анаэробных условий 84  
Аноректальные образцы 59, 63
- Антибиотики  
терапия 23  
основные 122  
используемые в питательных средах или как реагенты 121  
резерва 123
- Антикоагулянт 24  
Антигены диагностические, контроль качества 13
- Антисыворотка  
для агглютинации 118  
при внешней оценке качества 19  
при контроле качества 13  
рекомендованные 123
- Аргинин (дегидролаза) 12  
Артриты 77  
Автоклав 8
- Бациллы (микроорганизмы) 26  
*Bacillus anthracis* 72, 76, 78, 119  
идентификация 80  
Бацилляции 47, 120—121  
Бактериемия 23, 82  
анаэробная 27  
причины 23, 26—27  
смешанная 27  
транзиторная 23
- Бактериурия  
выбор методов исследования 36

- значение 39  
*Bacteroides* 76, 82, 119  
*Bacteroides fragilis* 13, 14, 27, 72, 83, 113  
 чувствительность к антибиотикам 87  
 идентификация 86  
*Bacteroides melaninogenicus* 43—44  
 Бензилпенициллин 57, 93, 94, 96, 103, 104, 122  
 Беременность, генитальные инфекции 63  
 Бешенство 70, 72  
 Биопсийный материал (биоптом) 70  
 Бленнорея новорожденных 63, 64  
*Blastomycetes dermatitidis* 75  
 Болезнь легионеров 43  
*Borrelia vincentii* 53  
 Ботулизм, раневая инфекция 70—71, 82  
*Branhamella* 53  
*Branhamella catarrhalis* 11, 43, 46, 52  
 определение чувствительности к антибиотикам 48  
 идентификация 47  
 категория приоритетности 117, 118  
 Бронхит  
 острый 43  
 хронический 43  
 Бронхопневмония 44  
 Бульонная культура, анаэробная 84, 85, 113  
*Brucella* 17, 18, 27, 113  
 гемокультура 25  
*Brucella abortus* 25  
 Бруцеллез 19, 25  
 Бульон  
 для культивирования крови 24, 113  
 анаэробный 113  
 из сердечно-мозговой вытяжки 113, 121  
 Мюллера  
 цистин-декарбоксилазный 115  
 декарбоксилазный основной 121  
 лизин-декарбоксилазный 116  
 с малонатом 12  
 нитратный 12  
 для определения реакции с фенолом красным 116, 121  
 Шадлера 113, 121  
 селенитовый (F) бульон 12, 116, 121  
 тетратионатный 12  
 тиогликолевый 27, 76, 84, 86  
 постановка теста 14  
 категория приоритетности 113, 119, 121  
 триптиказо-соевый 17, 121  
 Вилкинса — Чалгрена 113, 121  
 Воспаление надгортанника 52  
 Высушивание при замораживании 15  
 Вирус  
 герпеса человека 58, 59, 63, 65  
 иммунодефицита человека 19, 58  
 папилломы человека 58  
 Воспалительные заболевания тазовых органов 63  
 Внешняя оценка качества 5, 17—19  
 культуры 18  
 организация 18, 19  
 цели 18  
 учет результатов и сообщение о полученных результатах 19  
 сыворотка 19  
 Воспроизводимость результатов 2, 6  
 Воспаление мочеочника 34  
 Вагинит 61—64  
 неспецифический (бактериальный) 61—63  
 Вагинит 61, 62—64  
 Кольпит, бактериальный (неспецифический вагинит) 61, 62, 63—64  
 Ванкомицин 68, 121  
 Ванкомицин, колистин, нистатин (VCN) 60, 121  
 Ванкомицин, колистин, нистатин, триметоприм (VCNT) 60, 121  
 Венепункция 24  
 Вибрион 12, 41, 42  
 агглютинирующая антисыворотка 117  
 нехолерные 116  
*Vibrio cholerae* 13, 17, 115, 123  
*Vibrio parahaemolyticus* 18  
 Вибриостатический компонент 0/129, диск 116, 122  
 Винцента ангина 53  
 Vitox 46, 123  
 Выделения из половых путей, пробы материала 63  
 взятие и транспортировка 63  
 культивирование 64—65  
 прямое исследование и интерпретация 63, 64  
 категория приоритетности патогенов, питательных сред и реагентов 118, 119  
 Грибы — этиологические агенты гнойного экссудата 74, 75, 76  
*Gardnerella vaginalis* 58, 61, 64, 65, 118  
 Газовая гангрена 71, 75, 78, 82, 85  
 Гастроэнтерит сальмонеллезный 92  
 Гентамицин 93, 95, 96, 103, 104, 122  
 Глюкоза 122  
 определение ферментации 57  
 в спинномозговой жидкости 29  
 $\beta$ -глюкуронидаза (PGIA), тест 13, 39—40  
 Глицерин, для длительного хранения микроорганизмов 15  
 Грамотрицательные кокки  
 в пробах спинномозговой жидкости 31, 33  
 в пробах мокроты 46  
 Грамотрицательные палочки  
 в культуре крови 25, 113  
 в пробах спинномозговой жидкости 31, 114  
 в гнойном экссудате 75  
 в пробах мокроты 45, 46  
 в верхних дыхательных путях 52, 118  
 в пробах мочи 114, 115  
 Грамположительные кокки  
 в пробах спинномозговой жидкости 30, 31  
 а глотке  
 в гнойном экссудате  
 в пробах мокроты  
 Грамположительные палочки  
 в пробах спинномозговой жидкости 25, 33  
 в гнойном экссудате 75  
 Гранулема, мицетома 74, 75  
 Гранулема паховая 65, 66, 67  
 $\beta$ -гемолиз  
*Corynebacterium diphtheriae* 57  
 стрептококки 53, 55  
*Haemophilus* 17, 52, 53, 121  
*Haemophilus ducreyi* 58, 65, 66, 118, 121  
 культивирование и идентификация 67, 68  
 селективная среда 68, 119  
*Haemophilus influenzae* 1, 27, 120  
 определение чувствительности к антибиотикам 33, 47, 48, 92  
 идентификация 47  
 менингит 28, 30  
 выполнение тестов 12, 14  
 пневмония 43, 44, 46  
 категория приоритетности 113, 114, 117  
 гнойный экссудат 76  
 селективный кровяной агар 30, 47, 117  
 тип b 11, 28  
 тип b, антисыворотка 113, 114, 123

- Haemophilus parainfluenzae* 11, 14  
 Гепатит 19, 58  
 Генитальный герпес 65  
 Гетерорезистентность 81, 94  
*Histoplasma capsulatum*, var *duboisii* 75  
 Генератор для создания анаэробных условий культивирования 84, 117, 121, 122  
 Глотка, нормальная микрофлора 52  
 Гнойный экссудат (см. также Экссудат) 69—81  
 Гной  
   творожистый 74  
   клетки 75  
   цвет 74  
   консистенция 74  
   культивирование 76, 78  
   идентификация патогенов 77—81  
   легочный абсцесс 43—45  
   микроскопическое исследование 74—76  
   запах 74  
   категория приоритетности патогенов, питательных сред и реагентов 119—121  
   взятие проб и транспортировка 73  
   определение чувствительности 80—81  
 Гарантия качества 3—19  
   типы 3—5  
  
 Диагностические наборы 114, 118, 122  
 Диарея 92  
 Дифтерия 53—55  
 Дифтероиды 26—52  
 Диски  
   с бацитрацином 14, 55, 76, 113, 118, 122  
   с антибиотиками 15, 95, 96  
   содержание активное действующего вещества 96, 105  
   рекомендуемые 122, 123  
   трафарет для размещения 105  
   с оптохином 30, 47  
   постановка теста 14  
   категория приоритетности 113, 114, 117, 118, 122  
   с теллуридом 14  
 Декарбоксилаза 12  
 Дезинфекция участка кожи при венепункции 24  
 Доксициклин 123  
 Дренажная жидкость, взятие и транспортировка 73—74  
 Диаметр зоны задержки роста интерпретация 102, 103, 104  
   размеры для контрольных штаммов 85  
   отношение к МИК (минимальной ингибирующей концентрации) 89—91  
 Дренаж пазух, свищей 73, 74  
 Добавки  
   CBVA 122  
   VX 46, 122  
 Дрожжи 52, 75, 76  
*Yersinia enterocolitica* 12, 13, 18, 42, 116  
  
 Желудочный сок 48  
 Желатиназа 12  
 Забуференный раствор глицерина в физиологическом растворе 116, 122  
 Запах, гнойный экссудат 74  
  
*Calymmatobacterium granulomatis* 58, 65  
 CAMP-тест 30, 55  
   модифицированный 85—87  
*Campylobacter* 42  
   среда 116  
*Campylobacter jejuni* 10, 82, 116  
*Candida*  
   инфекции нижних дыхательных путей 46  
   рогоглотка 52, 53  
   гнойный экссудат 68, 75  
  
*Candida albicans* 13, 14, 25  
   инфекции нижних дыхательных путей 47, 48  
   ротовой полости 53  
   категория приоритетности 113, 115, 117, 118  
   вагиниты 61, 64, 65  
 Кандидоз, ротовая полость 53  
 Казеин 74  
 Каталаза 14  
 Клиндамицин 93, 96, 103, 104, 122  
*Clostridium* 24, 26, 63, 82  
*Clostridium botulinum* 82  
*Clostridium difficile* 116  
   селективная среда 116, 122  
*Clostridium perfringens* 13, 27, 119  
   идентификация 75, 85, 86  
   раневая инфекция 71, 82  
*Clostridium tetani* 82  
 Ключевые клетки 61, 62—64  
 Ко-тримоксазол 93, 94, 96, 122  
   диски 55  
   интерпретация размеров зоны 101, 103, 104  
   исследование агара Мюллера—Хинтона 95  
 Коагулирование, определение 55  
 Коагулаза плазмы  
   постановка теста  
   категория приоритетности 113, 115, 117, 118, 121, 122  
 Коагулазо-положительные стафилококки 77—79  
 Конъюнктивы пробы 62—64  
 Конъюнктивит гонококковый  
  
 Импетиго 70, 78  
 Индийские чернила 29, 122  
 Инфекции дыхательных путей 1  
   нижних 43—51  
   наиболее распространенные 43—45  
   категория приоритетности патогенов, питательных сред и реагентов 117  
   верхних 52—57  
   категория приоритетности патогенов, питательных сред и реагентов 117—119  
 Инфекции, передаваемые половым путем 1, 58, 68  
   категория приоритетности патогенов, питательных сред и реагентов 118—120  
 Инфекции мочевых путей 34, 78  
   определение чувствительности к антибиотикам 40  
   культивирование 36—40  
   диагностика 39  
   тесты для идентификации 39—40  
   интерпретация результатов в зависимости от количества выросших колоний 39  
   скрининговый тест 36  
 Изо-виталекс 46, 60, 68, 122  
  
*Corynebacterium diphteriae* 18, 53, 117, 120  
   носители 54  
   культивирование и идентификация 57  
   биотип *mitis*  
 Кровь 23—27  
   взятие 23, 24  
   антикоагулянт 24  
   количество 24  
   дезинфекция кожи 24  
   время 23  
   флаконы для культивирования 24, 25  
   культивирование 24, 27  
   антибиотикограмма 26  
   контаминанты 26  
   ложноположительный результат 24  
   время инкубации 25  
   среды 24, 25

- категория приоритетности патогенов, питательных сред и реагентов 113  
 субкультивирование 25—26  
**Стуртососкус** 5  
*Стуртососкус neoformans* 27, 28, 29, 30, 113, 114  
**Культура**  
 внешняя оценка качества 18  
 запас 15  
 хранение 14—16  
**Комплекс веретенообразных бактерий и спирохет** 53  
*Klebsiella* 18, 26, 52, 75  
*Klebsiella pneumoniae* 12, 13, 14, 44, 117  
 Ковача реактив на индол 115, 116, 122  
**Контроль качества внутренний** 7—17  
 определение чувствительности к антибиотикам 14, 37—108  
 питательные среды 8—13  
 диагностические антигены и антисыворотки 13—15  
 поддержание (в жизнеспособном состоянии) и использование имеющихся культур 15—17  
 методики 7—8  
 требования 7  
 окраска и реагенты 11  
 использование справочных лабораторий 17  
**Краснуха** 19  
**Кожа**  
 дезинфекция 24  
 материал, полученный при хирургическом вмешательстве 70  
**Калия гидроксид** 75  
**Лаборатории**  
 диагностические 1  
 среднего звена (рекомендуемые питательные среды и реагенты) 120—123  
 справочные 17  
**Царапины инфицированные**  
 $\beta$ -лактамазопродуцирующие патогены (см. также Отдельные патогены) 1  
 определение антимикробной чувствительности 94, 102  
 $\beta$ -лактамаза, определение 61  
 реагент 113, 114, 119  
**Лактобактерии вагинальные** 61, 64  
**Лактоза** 122  
*Legionella pneumophila* 43  
**Лейкоциты**  
 в спинномозговой жидкости 28, 29  
 в цервикальных и вагинальных мазках  
 в образцах отделяемого из уретры 60  
 в моче 36, 39  
*Listeria monocytogenes* 27, 28 33, 63, 114  
**Леффлера коаггулинирующая сыворотка** 56, 118, 120  
**Лимфатические узлы**  
 пунктирование 70  
 дренажный материал 73  
**Лимфогранулема, вызванная хламидиями** 65, 67  
**Лиофилизация** 15  
**Лизин** 12, 122  
**Мальтоза** 56, 122  
**Маннит** 122  
 Маннита ферментация, определение 47, 79  
**Руководство по организации работы лаборатории** 7  
 "Медузы голова" 80  
**Менингит** 28  
 бактериальный  
 возбудители 29—30  
 обнаружение в спинномозговой жидкости 29—30  
 грибовый  
 возбудители 29—30  
 обнаружение в спинномозговой жидкости  
 набор для экспресс-диагностики 114  
 туберкулезный 29, 30  
 вирусный (асептический) 29  
**Метиловый красный (Фогеса—Проскауэра реакция)** 12  
**Метициллин-устойчивость** 94, 104  
**Микроаэрофильные микроорганизмы** 82  
**Микробиологические тесты:**  
 клиническая значимость 4  
 эффективность 6—7  
 критерии качества 4—7  
 качество интерпретации полученных результатов 3  
 достоверность 2, 4—6  
 воспроизводимость 2, 6  
*Micrococcus* 82  
**Микроскоп** 8  
**Микроскопия**  
 спинномозговой жидкости 29—30  
 экссудата 74—77  
 мокроты 45—47  
 образцов кала  
 тампона (мазка) с материалом из глотки 54  
 мочи 36  
 образцов материала из мочевого тракта 36  
**Минеральное масло для длительного сохранения микроорганизмов** 15  
**Минимальная ингибирующая концентрация (МИК)** 88—90  
**Миноциклин** 94  
**Mobiluncus** 59  
**Мицетома** 74—76  
**Микобактерия**  
 атипичная (не туберкулезная) 75—77, 119  
 деконтаминация 48—50, 76  
 непатогенная 51  
**Методы**  
 бумажных полосок, культивирование мочи 36—40  
 разведения 88  
 преципитации 55  
 Керби—Бауэра модифицированный (диск-диффузионный) 14, 81, 88, 93, 108  
 прямой и непрямой 102  
 интерпретация размера зоны 102—104  
 контроль качества 14, 106—108  
 реагенты 95—97  
 технические факторы, влияющие на размер зоны 102—106  
 трафарет для раскладывания дисков 105  
*Mycobacterium bovis* 51  
*Mycobacterium fortuitum-chelonae* 75—77  
*Mycobacterium marinum* 76  
*Mycobacterium tuberculosis* (туберкулезная палочка) 14, 28, 43  
 культивирование 48—51  
 альтернативный метод концентрации 50  
 метод концентрирования (деконтаминация) 48—50  
 интерпретация 50—51  
 меры безопасности 51  
 категория приоритетности 114, 115, 117, 119  
 гнойный экссудат 70, 75  
*Mycobacterium ulcerans* 76, 119  
*Mycoplasma hominis* 59  
*Mycoplasma pneumoniae* 43  
**Мокрота**  
 взятие материала 44—46  
 культивирование 46—48  
 идентификация патогенов 46—48  
 макроскопическое исследование 46

- микроскопическое исследование 46—47  
*Mycobacterium tuberculosis* 44, 48—51  
 гнойная 34  
 меры безопасности 51  
 определение чувствительности 48—49  
 окраска по Цилю—Нильсену 6, 44  
 Методика определения чувствительности 6, 88—108  
 анаэробов 86  
 культуры крови 26  
 выбор препаратов 93—96  
 термины и понятия 90  
 прямое и не прямое определение чувствительности 102  
 индикаторы 90—92  
 инфекции нижних дыхательных путей 47—49  
 менингит 33  
*Neisseria gonorrhoeae* 61  
 NEO-SENSITABS метод 88  
 принципы 88—91  
 гнойный экссудат 80—81  
 контроль качества 14, 105, 108  
 инфекция верхних дыхательных путей 57  
 инфекция мочевых путей 40  
 Материал для исследования из уретры  
 взятие материала и транспортировка 59, 63  
 исследование 60  
 категория приоритетности патогенов, патологических сред и реагенты 118—120  
 Надежность 2, 4—6  
*Naegleria fowleri* 29  
 Налидиксовая кислота 93, 96, 102, 103, 123  
 Носовой тампон, здоровое носительство 53—55  
 Назофарингит 52  
 Национальная коллекция типов культур микроорганизмов (NCTC) 15  
*Neisseria*  
 безуглеродная среда 118  
 непатогенные виды 52  
 хранение культур 16, 17  
*Neisseria gonorrhoeae* (гонококк) 12, 13, 68, 118  
 добавление антибиотиков 60, 121  
 определение антимикробной чувствительности 61, 92  
 взятие и транспортировка проб 59, 63  
 конъюнктивит 63—64  
 культивирование 60—64  
 прямое исследование 60  
 генитальные язвы 67  
 идентификация 61  
 инфекция у женщин 62, 63, 64  
 фарингит 53  
 кратковременное хранение культуры 17  
 уретриты у мужчин 60  
 фарингит 65  
*Neisseria meningitidis* (менингококк) 12, 13, 17, 28  
 агглютинирующая сыворотка 113, 114, 122  
 определение чувствительности 92  
 бактериемия 27  
 носительство 54, 118  
 идентификация 33  
 категория приоритетности 113, 114  
 экспресс-диагностика  
 кратковременное хранение культуры 17  
 Новорожденных  
 менингит 28  
 заболевания, передаваемые половым путем 63  
 Нитрофуран 93, 95, 96, 103, 104, 122  
*Nocardia asteroides* 77—83  
 Норфлоксацин 93—96  
 Нозокомиальная (внутрибольничная) раневая инфекция 71  
 Новобиоцин 79, 115, 122  
 Носители инфекций верхних дыхательных путей  
 Нарушение иммунитета 28  
 Определение утилизации углеводов  
 Определение декарбоксилазы 122  
 Окраска  
 по Гимзе 67  
 по Граму  
 спинномозговой жидкости 29—31  
 экссудата 75  
 мокроты 45—47  
 глоточного тампона 54  
 мочи 37  
 проб из мочеполовых путей 60, 64  
 реагенты 14, 122  
 контроль качества 11, 14  
 по Цилю—Нильсену (кислотоустойчивых бактерий) 122  
 спинномозговой жидкости 29  
 гнойного экссудата 75—77  
 контроль качества 13, 14  
 специфичность 6  
 мокроты 6, 44  
 Оборудование  
 запись температурного режима  
 контроль качества 7, 8  
 Определение снижения эстеразонитратного показателя лейкоцитов с помощью бумажного теста 36  
 ONPG-(О-нитрофенил- $\beta$ -D-галактопиранозид) тест 14, 115, 116, 122  
 Ожог 70—73  
 Определение чувствительности к антибиотикам с помощью таблиц NEO-SENSITABS 30  
 Определение интенсивной терапии 44  
 Определение редукции нитратов 57, 80  
 Орнитин 12  
 Остеит (воспаление кости) 76  
 Отит 6, 52  
 Сухожаровой шкаф 8  
 Оксациллин 94, 96, 122  
 интерпретация размера зоны 103, 104  
 чувствительность пневмококков 33, 47, 48  
 чувствительность стафилококков 88, 93  
 Оксидазный реагент  
 постановка теста 14  
 категория приоритетности 113, 114, 115, 116, 119, 120, 122  
 Окисление/ферментация (OF) декстрозы 12  
 "Окислительно-восстановительная" индикаторная бумажная полоска 83  
 Определение ферментации сахарозы 57  
 Определение стерильности, готовая среда для культивирования 10  
 Пелтоновая вода с реактивом Андраде 57, 116, 120  
 Пролежни 70—73  
 Пробы материала из замкнутых полостей 62—64  
 Пробы из половых путей женщин 61—66  
 Пробы из генитальных язв  
 взятие материала 65, 66  
 культивирование 67, 68  
 прямое исследование 66, 67  
*Paragonimus* 75  
 Паразиты 75  
*Pasteurella multocida* 71, 78, 79, 80, 81, 120  
 Патогены, категория приоритетности 112—121  
 Пенициллины (см. также специфические агенты) 101  
 $\beta$ -лактамазостойчивость

- Neisseria gonorrhoeae*, устойчивость  
определение чувствительности 47, 80, 94,  
101
- Periosoccus* 27, 44
- Пептонная вода (индол) 12
- Periostreptococcus* 27, 44, 82  
идентификация 85
- Periostreptococcus magnum* 82
- Пробы материалов из брюшной полости 69
- pH, определение, приготовление питательных  
сред 10
- Пиперациллин 93, 96, 103, 104, 122
- Плазма 122
- Plesiomonas* 115
- Плевральной полости пункция 44, 70
- Плевральной полости содержимое 43, 44
- Плеврит 76
- Пневмония 43, 44  
острая долевая 44  
аспирационная 43  
первичная атипичная 43
- Поливитекс 46, 122
- Propionibacterium asnes* 24—27
- Простатит, хронический 34
- Протеин спинномозговой жидкости
- Proteus* 26, 75, 102  
уреазоотрицательные 18
- Proteus mirabilis* 11, 12, 14
- Псевдобактериемия 24
- Pseudomonas* 52, 59, 75  
нижние дыхательные пути 46, 47  
чувствительность к пиперациллину 102,  
103  
категория приоритетности 115, 118, 119
- Pseudomonas aeruginosa* 26, 70, 113  
определение чувствительности к антибио-  
тикам 93  
размеры диаметра зоны задержки роста  
96  
постановка тестов 12, 14  
пневмония 44  
стандартный штамм 11, 15, 107
- Pseudomonas ceracia* 18, 35
- Pseudomonas pseudomallei* 27, 113
- Пиелонефрит 31, 34
- Полианетол сульфонаг калия 24, 113, 123
- Пробы материала, полученные при хирурги-  
ческом вмешательстве 69, 70
- Пробы тканей из основания гнойников 70
- Пробы мочи 34—40  
взятие материала 34—36  
категория приоритетности патогенов, пи-  
тательных сред и реагентов 114—116  
методика 36—40
- Реагенты  
модифицированный метод Керби—Бауэра  
95—97  
постановка тестов 11—13  
категория приоритетности 112—121  
рекомендованные для лабораторий сред-  
него звена 120—123
- Ректальный тампон 41, 64
- Ревматизм 53
- Раствор гидроокиси калия 50
- Ротофарингеальный тампон  
взятие материала и пересылка 54  
культивирование 54—57  
от здоровых носителей 53—55  
идентификация 54—57  
микроскопия 54  
инфекции, передаваемые половым путем  
59, 64
- Раны 69—81  
ботулизм 70, 71, 82  
идентификация патогенов 78—81  
нозокомиальная инфекция 71  
пенетрирующие 70—72, 73
- послеоперационные 73  
взятие материала 83  
определение чувствительности 80—81
- Реагент для каталазного теста (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 115,  
118, 121, 123
- СПИД (синдром приобретенного иммунодефи-  
цита) 28, 58
- Сульфат бария стандартизованный 96, 122
- Спинномозговая жидкость, пробы 28—33  
взятие и транспортировка 28  
культивирование 30, 31  
идентификация патогенов 30—33  
макроскопическое исследование 28  
микроскопическое исследование 29—30  
категория приоритетности патогенов, пи-  
тательных сред и реагентов 114  
определение чувствительности 33
- Соотношение затраты — эффективность мик-  
робиологических исследований 2
- Сухожаровой шкаф 8
- Salmonella* 17, 58  
антисыворотка 113, 117, 123  
культивирование 42  
менингит 28  
не являющаяся возбудителем брюшного  
тифа 26, 92, 113, 116
- Salmonella paratyphi* (A) 18, 115
- Salmonella typhi* 6, 18, 26  
агглютинирующая антисыворотка 117  
определение чувствительности к антибио-  
тикам 92  
категория приоритетности 113, 116
- Salmonella typhimurium* 11, 12, 13, 117
- Скарлатинозная лихорадка 53
- Schistosoma* 75
- Септицемия 23
- Серологические тесты  
внешняя оценка качества 19  
контроль качества 11, 14
- Serratia* 24, 75
- Serratia marcescens* 11, 12, 13
- Shigella* 17, 18, 58, 116  
определение чувствительности к антимик-  
робным средствам 92  
антисыворотка 117, 123  
культивирование 41—42
- Shigella flexneri* 11, 12, 13
- Синусит 52
- Специфичность, микробиологическое опреде-  
ление 6—7
- Скорость, микробиологическое определение 2
- Стафилококки 13  
определение чувствительности к антибио-  
тикам 47, 81, 90, 93, 103, 104  
культура крови 25  
гетерорезистентность 81, 94  
идентификация 78, 79, 115  
 $\beta$ -лактамазопродуцирующие 81, 94, 102  
менингиты 28  
в глотке 53  
категория приоритетности 115  
в гнойном экссудате 75, 76, 77—79  
хранение культур 16  
в уретре 59
- Staphylococcus aureus* 6, 26, 52, 82  
определение чувствительности к антибио-  
тикам 81, 104  
носительство 54  
идентификация 47, 78, 79  
размеры диаметров зоны задержки роста  
96  
постановка тестов 12, 13  
пневмония 44, 46  
категория приоритетности 113, 117, 118,  
119  
в гнойном экссудате 76

- стандартный штамм 11, 14, 107  
 посев на кровяной агар 30, 31, 114  
 синдром токсического шока 63  
 раневая инфекция 71
- Staphylococcus epidermidis* 11, 52  
 культура крови 23, 24, 26  
 идентификация 79  
 постановка тестов 12, 13  
 в гнойном экссудате 78  
 определение чувствительности 81
- Staphylococcus mitis* 11, 13
- Staphylococcus saprophyticus* 78, 79, 115
- Стрептококки 19  
 культура крови 25  
 α-гемолитические 26, 47, 52, 113  
 β-гемолитические 53, 55  
 гемолитические, набор для идентификации 118, 122  
 культуры длительного хранения 16  
 категория приоритетности 113, 119  
 гнойный экссудат 75, 76, 81  
 культуры краткосрочного хранения 17
- Streptococcus agalactiae* 11, 14, 27, 114  
 идентификация 30, 55  
 неонатальная инфекция 28, 58, 62  
 обратный CAMP-тест 85—87
- Streptococcus pneumoniae* (пневмококки) 1, 11, 17, 52  
 определение чувствительности к антибиотикам 33, 47, 48, 103, 104  
 бактериемия 26  
 идентификация 47  
 менингит 28, 30, 33  
 постановка тестов 12, 13  
 пневмония 43, 44, 46  
 категория приоритетности 113, 114, 117
- Streptococcus pyogenes* 6, 11  
 чувствительность к антибиотикам 5, 92  
 бактериемия 26  
 носитель 54  
 культура 54—57  
 идентификация 54—57  
 постановка тестов 12, 13  
 категория приоритетности 113, 117, 119  
 фарингеальная инфекция 53
- Субкультура  
 слепая 26  
 крови 25
- Сахароза 122
- Сульфониламиды 93, 94, 96, 102, 103, 104, 122
- “Серные гранулы” 71, 74, 75
- Сифилис 15, 19, 65—68
- Столбняк 70—72, 82
- Среда  
 транспортная  
 Америкес 62, 119, 120  
 Кери—Блэр 41, 116, 120  
 Стюарта 63, 119, 120  
 питательная  
 свободная от углеводов 47—49  
 из вареного мяса 16, 17, 76, 83, 119, 120  
 анаэробная 83—85  
 для пробы крови 24, 25  
 для пробы спинномозговой жидкости 30, 31
- Corynebacterium diphtheriae* 57  
 сухие 10  
 обогащение 122  
 для дискотиффузионного метода 95  
 ингибиторы 121  
 постановка тестов 10—14  
 приготовление 10  
 категория приоритетности 112—121  
 гнойный экссудат 76, 78  
 контроль качества 10, 11
- рекомендуемые для лабораторий среднего звена 121  
 отбор 8  
 для проб мокроты 46  
 для проб кала 42  
 хранение 10
- Дорсе яичная 57, 118, 122
- Левенштейна—Йенсена  
 для определения подвижности, индолообразовани и уреазной активности 115, 116, 118  
 для определения подвижности + пептонная вода с мочевиной 116, 120  
 Нью-Йоркская 60, 119  
 уреазная 13
- Стандарт мутности 96
- Термостат 8
- Тампоны  
 аноректальные 59  
 определение чувствительности к антибиотикам 96  
 вагинальные/цервикальные 63  
 носовые 53—55  
 для гноя 72  
 ректальные 41, 64  
 уретральные 59
- Теллурида раствор 120
- Тесты  
 аглутинационный  
 для *Neisseria meningitidis* 33  
 для *Streptococcus pyogenes* 55  
 на бактериурию 38  
 каталазный 78  
 микробиологические  
 клиническая значимость 5  
 чувствительность 6  
 коагулазный 47, 79  
 слайд-тест 79  
 пробирочный тест 79  
 диффузный 89, 90  
 нитроцефиновый 61, 119, 121  
 постановка  
 питательные среды 10—14  
 реагенты 11, 13  
 штаммы 11, 13  
 серологические  
 внешняя оценка качества 19  
 контроль качества 10—15  
 уреазный 57, 80  
 Видала 7, 19
- Теллурид-тауролат желатин (ТТС) 42
- Температура  
 инкубация при определении чувствительности 104  
 запись температуры работающего оборудования 110
- Трафарет  
 диаметр зоны задержки роста 102, 103  
 расположение дисков с антибиотиками 105
- Тетрациклин 48, 93, 94, 96, 103, 104, 122
- Тиамфеникол 94
- Тобрамицин 93, 95, 96, 103, 104, 123
- Тонзиллит 52, 53
- Токсический шок, синдром 62
- Токсоплазма 19
- Treponema pallidum* 58, 65, 118  
 взятие материала 65—66  
 прямое исследование (микроскопия) 66—68
- Trichomonas vaginalis* 58, 59, 61, 62, 64, 118
- Триметоприм 93, 94, 96, 103, 104, 121
- Трипаносомоз африканский 29
- Туберкулез легочный 6, 43, 44, 48—51
- Туберкулезный “холодный” абсцесс 74
- Туберкулезный менингит 29, 30

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Тиф брюшной (см. также *Salmonella typhi*) 7, 19
- Тампоны для взятия материала из уретры 59
- Углеводы 122
- Укус  
 человека 71  
 животного 71, 79, 80  
*Fusobacterium* 53
- Устойчивость, определение 90
- Ureaplasma urealyticum* 58—59
- Уретрит  
 гонококковый 5  
 у мужчин 59—62  
 у женщин 63  
 негонококковый 59, 61
- Флаконы Кастанеда 25
- Факультативные анаэробные бактерии 82
- Образцы кала, взятие материала 41
- Фекальная суспензия в физиологическом растворе 42
- Fasciola* 75
- Фунгемия 23, 26—27
- Фарингит 47—51  
 бактериальные агенты 53—55  
 взятие и доставка образцов 54  
 культивирование и идентификация 54—57  
 гонококковый 53  
 микроскопия прямая 54  
 некротические изъязвления 53  
 определение чувствительности 57
- Фенилаланиндезаминаза 12
- Фосфат калия 50
- Фогеса—Проскауэра реакция 13
- Chlamydia trachomatis* 58, 118  
 взятие и транспортировка проб 62  
 инфекция у женщин 61, 63, 64  
 лимфогранулема 65  
 уретриты у мужчин 59
- Хлорамфеникол 93, 94, 96, 121, 122
- Haemophilus influenzae*, определение 33, 47, 48  
 интерпретация размера зоны 48, 103, 104
- Холодильник 8
- Хранение культур  
 в цистин-триптиканом агаре 15  
 при комнатной температуре 15
- Хранение культур 14—17  
 долгосрочное хранение 15—17  
 отбор и происхождение 14  
 краткосрочное хранение 17
- Хранение штаммов 11, 14, 107
- Хранение проб 41—42  
 посев на чашки с агаром 42  
 отбор 41  
 исследование 41—42  
 категория приоритетности патогенов, питательных сред и реагентов 117—118
- Царапины от животного 71, 79—81
- Цефалотин 93, 94, 96, 103, 104, 123
- Цефтриаксон 93, 94, 96, 103, 104, 123
- Цефуросим 93, 94, 96, 103, 104, 123
- Целлюлит (воспаление подкожной клетчатки) 77, 82
- Центрифуга 8
- Цефалоспорины 81, 88
- Ципрофлоксацин 93, 96, 123
- Citrobacter* 17, 28
- Citrobacter freundii* 12, 14
- Цистин 34
- Цитомегаловирус 58
- Цервициты 61, 62—64
- Чувствительность  
 определение понятия 90  
 средняя чувствительность 90  
 умеренная чувствительность 90
- Шанкр 63, 67
- Щелочная пептонная вода 41, 116
- Шок (в результате септицемии) 23
- Echinococcus* 75
- Edwardsiella* 116
- Эффективность микробиологических исследований 6—7
- Эмпиема 82, 83
- Энцефалит 28
- Enterobacter* 26
- Enterobacter agglomerans* 24
- Enterobacter cloacae* 11
- Энтеробактерии (см. также грамтрицательные палочки)  
 определение чувствительности к антибиотикам 47, 81, 93, 103, 104  
 инфекции нижних дыхательных путей 46, 47, 117  
 менингит 28, 30  
 в пробах материала из глотки 52  
 в гнойном экссудате 75, 119  
 хранение культур 16  
 в пробах из уретры 60  
 в пробах из влагалища 61
- Энтерококки 92, 115
- Enterococcus faecalis* 12, 26  
 определение чувствительности к антибиотикам 103, 104  
 выполнение теста 12, 13, 95  
 вариант *zymogenes* 54, 55  
 агар с эозин-метиленовым синим 115
- Эритромицин 48, 93, 95, 96, 122  
 интерпретация величины зоны 103, 104  
 фарингит 57
- Escherichia coli* 18, 42, 82, 116  
 бактериемия 26  
 диарея 5  
 $\beta$ -глюкуронидаза, определение 39—40, 113  
 $H_2S$ -положительные  
 диаметр зоны задержки роста, пределы 96  
 лактозоотрицательные 18  
 менингит 28  
 выполнение тестов 12, 13  
 в образцах из глотки  
 пневмония 44  
 гнойный экссудат 75  
 стандартный штамм 11, 15, 107  
 инфекции мочевыводящих путей 34, 39, 92, 114  
 раневая инфекция 71
- Экссудат 69—81  
 взятие и транспортировка 71—75  
 консистенция 74  
 культивирование 76—78  
 этиологические агенты 69—72  
 идентификация патогенов 78, 80  
 макроскопическая оценка 74  
 микроскопическое исследование 74—77  
 запах 74  
 категория приоритетности патогенов, питательных сред и реагентов 119—121  
 гной 69—81  
 пробы, отобранные при хирургических вмешательствах 70  
 определение чувствительности 80—81
- Ява  
 Бурули 76  
 пролежни 70, 73