



СПРАВОЧНИК
ЗАВЕДУЮЩЕГО КДЛ

«АКТИОН» МЦФЭР

Бактериологические исследования

Практическое пособие



СОДЕРЖАНИЕ

Бактериологическая диагностика стафилококковых инфекций Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И.	2
Микробиота респираторного тракта при инфекциях верхних и нижних дыхательных путей у различных категорий пациентов Наумкина Е.В., Матущенко Е.В., Матущенко А.И., Калитина И.И., Абросимова О.А., Пядочкина Т.В.	10
Лабораторная диагностика чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам Домотенко Л.В., Шепелин А.П.	24
Перспективы использования метода микроскопии в работе врача- бактериолога Захарова Ю.А., Артемчик С.В.	33
Исследование видового состава микрофлоры кишечника у детей в возрасте до трех лет Касьян И.А., Абдрашитова А.С., Билько Е.А., Касьян Ж.А., Ситмбетов Д.А., Казанцев А.В.	47
Особенности микробиологической диагностики инфекций нижних дыхательных путей у больных муковисцидозом Поликарпова С.В., Жилина С.В., Пивкина Н.В., Тимофеева О.Г.	53
Особенности микробиологической диагностики инфекций нижних дыхательных путей у больных муковисцидозом Поликарпова С.В., Жилина С.В., Пивкина Н.В., Тимофеева О.Г.	63
Реформирование практики бактериологических исследований: новый уровень микробиологической диагностики Тарасов Ю.И., Усачева С.Ю., Мозжухина Е.А.	71
Критерии оценки состава биоценоза просвета толстой кишки Точилина А.Г., Белова И.В., Соловьева И.В., Жирнов В.А., Иванова Т.П.	85
Бактериологическая диагностика дифтерийной инфекции Шепелин А.П.	110
Организационные аспекты деятельности лаборатории по вопросам этиологической диагностики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи Захарова Ю.А.	116
Алгоритм ускоренного бактериологического исследования с использованием хромогенных питательных сред Полухина Ю.А.	132

Бактериологическая диагностика стафилококковых инфекций

Анатолий Прокопьевич Шепелин

заместитель директора по научно-производственной работе, доктор биологических наук,

Ольга Вадимовна Полосенко

заведующая сектором микробиологических исследований, кандидат биологических наук,

Ирина Ивановна Марчихина

заведующая лабораторией микробиологических и физико-химических методов анализа

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Московская обл., п. Оболensk

В статье описаны особенности бактериологической диагностики стафилококковых инфекций, рассказано о различных питательных средах, используемых для выявления стафилококковой инфекции в целях своевременного и эффективного назначения антибактериальной терапии, определения бактерионосителей, установления факторов передачи инфекции.

Стафилококки сохраняют существенное значение в этиологической структуре гнойно-воспалительных заболеваний. Помимо золотистого стафилококка, важную роль в качестве возбудителей этих инфекций играют *S. epidermidis* и другие виды коагулазоотрицательных стафилококков. На коже здорового человека эпидермальный стафилококк обосновывается довольно часто, но никак себя не выдает. Причина заключается в его низком инфекционном потенциале. В отличие от своего «собрата», золотистого стафилококка, который отличается высокой агрессивностью и способен вызывать тяжелые гнойные патологии (в том числе поражение костей –

остеомиелит и головного мозга – менингит), эпидермальная разновидность вызывает такие заболевания, как эндокардит, конъюнктивит, инфекция ран и мочевыводящих путей. Специфическая симптоматика эпидермального стафилококка характеризуется триадой признаков: проявление общей интоксикации, развитие местных кожных очаговых поражений, изменения в работе различных органов и систем (почки, печень, сердце)[11].

Золотистый стафилококк (MRSA) обладает необыкновенным разнообразием факторов вирулентности, что позволяет ему выживать в экстремальных условиях в организме-хозяине. За последние 10 лет появились новые клоны MRSA, которые быстро распространились по континентам, что привело к разгулу некоторых необычно тяжелых заболеваний.

Изучение бактериальных факторов должно быть расширено до анализа, выходящего за рамки традиционного тестирования на вирулентность, включая колонизацию, устойчивость к условиям окружающей среды, в соответствии с эпидемиологическими данными [10].

Стафилококки хорошо растут как на простых, так и на селективных и неселективных питательных средах отечественного и зарубежного производства; образуют неодинаковые пигментированные и непигментированные колонии, иногда в зависимости от состава среды. Для выделения стафилококков обычно используют агаризованные среды: агар Частовича, агар Петровича, электролитно-солевой агар, стафилококкагар, среду Чемпена, маннит-солевой агар, маннит-солевой агар с добавлением желтка, молока, колумбийский агар с добавками колистина и налидиксовой кислоты (SNA), агар Фогеля – Джонсона (Vogel – Johnson Agar Medium) с добавлением теллурита калия, агар Baird – Parker с добавлением яичного желтка и теллурита калия и др. Эти среды ингибируют рост грамотрицательных, а также многих грамположительных бактерий и разработаны для дифференциации *S. aureus* и других представителей рода.

Выделение чистой культуры возбудителя на основных средах осуществляется с учетом его культуральных особенностей галофильности (хорошее развитие в присутствии избыточного содержания поваренной соли при одновременном угнетении прочей микрофлоры).



При использовании методики определения количества *S. aureus* с предварительным обогащением [1] применяют селективные бульоны: солевой, Жиолитти – Кантони с добавлением теллурита калия, лактозо-солевой с фенолротом и др. Для подтверждения принадлежности микроорганизмов, выросших на бульонах, к *S. aureus*, проводят пересев петлей на агаризованные среды для получения изолированных колоний.

Однако открытие других видов стафилококков, по своим культуральным и биохимическим свойствам схожих с *S. aureus*, делают такую идентификацию лишь ориентировочной.

Продолжительность инкубации на селективных средах составляет 24–48 ч при температуре 35–37 °С. Колонии всех описанных видов и подвидов могут быть различимы на триптиказо-соевом агаре, особенно при использовании для сравнения контрольных штаммов соответствующих таксонов. Пигментированные колонии *S. aureus* обычно имеют кремово-желтую, желтую, лимонно-желтую, желто-оранжевую или оранжевую окраску. У некоторых штаммов *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. lentus* колонии могут иметь слабо-фиолетовый, розоватый или коричневатый оттенок. Представители анаэробного вида *S. saccharolyticus* и подвида *S. aureus subsp. anaerobius* хорошо растут на триптиказо-соевом агаре в анаэробных и плохо – в аэробных условиях [4].

Культуральный метод с использованием различных питательных сред можно применять для лабораторной диагностики стафилококковых инфекций различного происхождения, а также при эпидемиологическом анализе различных эпидемических ситуаций, обусловленных этим возбудителем. Этот метод включают в себя использование накопительных и элективных питательных сред и создание условий культивирования для преимущественного накопления в культуре нужных форм микробов, способы получения чистых культур из отдельных колоний или клеток микроорганизмов [8].

При росте в жидких неселективных питательных средах стафилококки дают равномерное помутнение с последующим выпадением рыхлого осадка (рис. 1).

Для выращивания стафилококков при контроле микробной загрязненности нестерильных лекарственных средств

и других объектов, а также при проведении исследований в санитарной и клинической микробиологии используют питательную среду № 8 ГРМ. Сбалансированный состав среды обеспечивает питательные потребности для характерного роста *S. aureus* в виде диффузного помутнения среды через 21 ± 3 ч при температуре культивирования 33 ± 2 °С. Питательная среда высокочувствительна и обеспечивает рост стафилококков при посеве из разведения 10^{-8} (рис. 2).

Для выделения возбудителя стафилококковой инфекции исследуемый материал засевают на различные питательные среды: кровяной агар (для определения гемолиза), молочно-солевой, желточно-солевой агар (для выявления пигмента и лецитиназы), маннит-солевой агар (для определения ферментации маннита).

Выделенную с агаризованных питательных сред культуру, характерную для стафилококков, идентифицируют по видовым признакам. После инкубации у изолятов проверяют основные признаки (морфологию, тинкториальные свойства, пигмент, ферментацию маннита), факторы патогенности (наличие гемолиза, плазмокоагулирующей активности в реакции плазмокоагуляции) [3] с обязательным определением чувствительности к антибиотикам; в случае необходимости проводят фаготипирование. *S. aureus* отличается от других видов стафилококка по наличию золотистой пигментации колоний и положительных результатов тестов на коагулазу, сбраживание маннита и наличие дезоксирибонуклеазы [9].

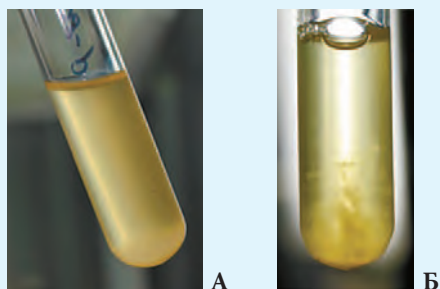


Рис. 1. Рост *S. aureus* в питательном бульоне: помутнение (А), выпадение осадка (Б)

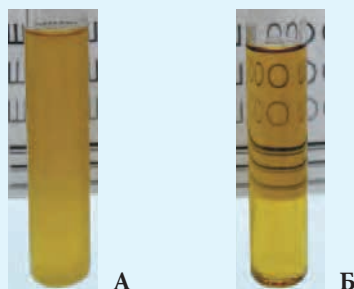


Рис. 2. Рост *S. aureus* ATCC 6538-P на среде № 8 ГРМ (А), контроль (незасеянная среда) (Б)

Ассортимент дифференциальных, элективных и накопительных сред, предложенных для выявления стафилококков, весьма значителен и продолжает расширяться.

Рост *S. aureus* на питательной среде для выделения стафилококков (стафилококкагар) представлен на рис. 3. Стафилококкагар полностью подавляет рост эшерихий через 48 ± 2 ч инкубации при температуре 37 ± 1 °С и синегнойной палочки, не влияя на рост стафилококков.

Для выделения стафилококков используют высокоселективную питательную среду – агар Фогель – Джонсона [5].

Приготовление агара Фогель – Джонсона предусматривает внесение 2%-ного раствора теллурита калия, который используют для подавления сопутствующей микрофлоры. Ферментирующие маннит стафилококки образуют на среде черные колонии (реакция восстановления теллурита до металлического теллура), окруженные желтой зоной (рис. 4), не ферментирующие маннит – черные колонии без пожелтения среды вокруг.

Золотисто-желтые колонии, окруженные желтыми зонами, на питательной среде № 10 ГРМ свидетельствуют о наличии *S. aureus* (рис. 5). Питательную среду используют для идентификации стафилококков при контроле микробной загрязненности нестерильных лекарственных средств по признаку ферментации маннита, а также при проведении исследований в санитарной и клинической микробиологии. В питательную среду возможно внесение желточной эмульсии для выявле-



Рис. 3. Рост *S. aureus* на стафилококкагаре



Рис. 4. Рост *S. aureus* на агаре Фогель – Джонсона



А

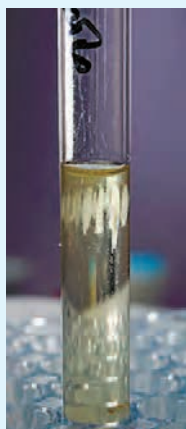


Б

Рис. 5. Рост *S. aureus* на питательной среде № 10-ГРМ (А); на питательной среде № 10-ГРМ с добавлением желтка (Б)



А



Б

Рис. 6. Рост *S. aureus* Wood-46 в тиогликолевой среде (А); *S. aureus* Виотко в тиогликолевой среде (Б)

ния лецитовителлазной реакции (образование радужного венчика) (рис. 5).

Одним из основных дифференциальных признаков стафилококков, имеющих медицинское значение, является способность к росту в анаэробных условиях на тиогликолевой среде [7]. Эта среда может применяться и для исследования материала, мало контаминированного стафилококками [12].

В тиогликолевой среде при росте тест-штамма *S. aureus* наблюдают образование отдельных

колоний (тяжей) через 24 ч инкубации с выраженной прозрачной зоной в верхней части столбика (рис. 6).

Изучение стафилококков показало, что основной признак патогенности (коагулазная реакция) может подвергаться изменчивости при воздействии различных факторов [6], поэтому были проведены исследования по ГОСТ Р 54674-2011 некоторых объектов на наличие золотистого стафилококка [2]. Для этого в качестве образца изучали пищевой продукт.

Использовали метод с предварительным обогащением [2] с применением солевого бульона, обеспечивающего рост стафилококков и ингибицию микробов-ассоциантов. В солевом

бульоне стафилококки растут со стабильным равномерным помутнением среды (рис. 7).

Через 24 ч инкубации при температуре 37 °С петлей проводили высев на поверхность агара Байрд – Паркера, маннит-солевого агара (питательная среда № 10-ГРМ с яичной эмульсией) и стафилококкагара. В мазке, окрашенном по Граму, обнаружены тетрады грамположительных кокков. Проба с каталазой положительная. Эти признаки позволяют отнести культуру к роду стафилококка. Посевы на агаризированных средах просматривали через 24 и 48 ч инкубации при температуре 37 °С. На рисунке 8 представлен высев после накопления в солевом бульоне на питательные среды для выявления стафилококка.

По предварительному анализу можно предположить, что в данном образце присутствует стафилококк, относящийся к группе коагулазоотрицательных, так как на среде № 10-ГРМ с желточной эмульсией отсутствует лецитиназный тест.

Для ускорения выдачи ответа белые колонии с желтоватым ореолом и розовые колонии с маннит-солевого агара пересеивали на питательный агар для дальнейшей идентификации микроорганизма при помощи масс-спектрометра Bruker Daltonik MALDI Biotyper.

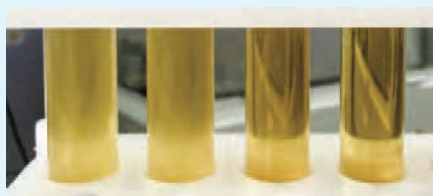
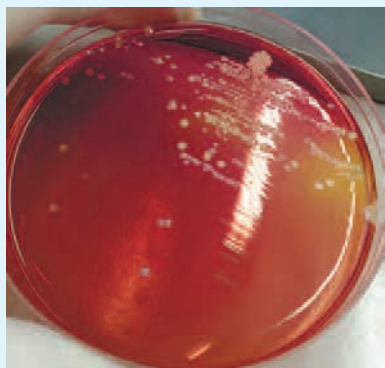
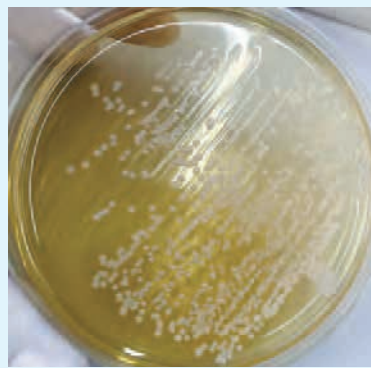


Рис. 7. Рост стафилококка в солевом бульоне



А



Б

Рис. 8. Маннит-солевой агар (питательная среда № 10-ГРМ с яичной эмульсией) (А), стафилококкагар (Б)

В процессе измерений по спектру константных белков микроорганизмов, в дальнейшем сравниваемому с базой данных, выделенные изоляты идентифицировали как *Staphylococcus saprophyticus ssp saprophyticus* DSM 20229T DSM и *Staphylococcus saprophyticus ssp saprophyticus* DSM 20038 DSM.

Таким образом, полный ассортимент питательных сред позволяет успешно решать задачи выявления стафилококковой инфекции для своевременного и эффективного назначения антибактериальной терапии, обнаружения бактерионосителей, установления факторов передачи инфекции.

Список использованной литературы

1. ГОСТ 30347-2016 «Молоко и молочная продукция. Методы определения *Staphylococcus aureus*».
2. ГОСТ Р 54674-2011 «Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Метод выявления и определения *Staphylococcus aureus*».
3. Методические указания. МУК 4.2.2942-11. Методы санитарно-бактериологических исследований объектов окружающей среды, воздуха и контроля стерильности в лечебных организациях.
4. Оппортунистические инфекции: клинко-эпидемиологические аспекты. Руководство по медицинской микробиологии. Книга III. Том 2 / Под ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Волиной, Е.П. Ковалевой. М.: Бином, 2014. С. 129.
5. Патент Питательная среда для селективного выявления патогенных маннитположительных стафилококков findpatent.ru/patent/262/2620965.html.
6. Смирнова А.М., Трояшкин А.А., Падерина Е.М. Микробиология и профилактика стафилококковых инфекций. М.: Медицина, 1977.
7. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 1982, 464 с.
8. Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И. и др. Питательные среды для выявления стафилококков в клинической и санитарной микробиологии. Биопрепараты. Оригинальные статьи. 2015. № 4. С. 39–43.
9. Franklin D., Lowy M.D. *Staphylococcus aureus* infections // N Engl J Med. 1998. Vol. 339. P. 520–532.
10. George Y. Liu. Molecular pathogenesis of *staphylococcus aureus* infection published in final edited form as: *Pediatr Res*. 2009. Vol. 65. P. 71R–77R.
11. ayzdorov.ru/lechenie_stafilokokk_epider.php.
12. vse-zabolevaniya.ru.



Микробиота респираторного тракта при инфекциях верхних и нижних дыхательных путей у различных категорий пациентов

Е.В. Наумкина

д-р мед. наук, проф. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет», заведующая лабораторией клинической микробиологии БУЗ Омской области «Городской клинический перинатальный центр»,

Е.В. Матущенко

канд. мед. наук, доц. кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии,

А.И. Матущенко

студент 6 курса лечебного факультета

ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет»,

И.И. Калитина

врач-бактериолог лаборатории клинической микробиологии,

О.А. Абросимова

врач-бактериолог лаборатории клинической микробиологии,

Т.В. Пядочкина

врач-бактериолог лаборатории клинической микробиологии

БУЗ Омской области «Городской клинический перинатальный центр»

Цель настоящего исследования – изучение микробиоты респираторного тракта при инфекциях верхних и нижних отделов дыхательных путей у различных категорий больных. В результате исследования выявлены существенные различия этиологической структуры инфекций дыхатель-

ных путей в зависимости от возраста пациента, локализации и тяжести патологического процесса. Установлена неоднородность антибиотикорезистентности обнаруженных штаммов *Streptococcus pneumoniae* у обследованных пациентов.

Инфекции верхних и нижних дыхательных путей остаются одной из важнейших проблем современной медицины. Это связано с высоким уровнем заболеваемости детей и взрослого населения, нередкими осложнениями и значительным экономическим ущербом, причиняемым острыми респираторными заболеваниями.

Так, ежегодные экономические затраты на терапию инфекций дыхательных путей (исключая грипп) приближаются к 40 млрд долл., при этом прямые медицинские затраты (посещение врача, вызовы неотложной помощи, стоимость назначенного лечения) составляют 17 млрд долл., а не прямые (пропущенные дни учебы и рабочие дни) – 22,5 млрд долл. [12].

Представители нормальной микробиоты, в изобилии присутствующие на слизистых оболочках верхних дыхательных путей, среди которых в высоком проценте случаев встречаются и пневмотропные микроорганизмы, с одной стороны, осуществляют свою защитную функцию в отношении патогенов, с другой – при определенном стечении обстоятельств могут приобретать способность инициировать воспалительный процесс.

Распространенность и этиологическая структура инфекций дыхательных путей

Традиционно считается, что наиболее частыми этиологическими агентами острого тонзиллофарингита являются вирусы и стрептококки, а именно, β -гемолитический стрептококк группы А (*Streptococcus pyogenes*) – 15–30%, β -гемолитические стрептококки групп С и G (5–10%); в редких случаях встречается смешанная аэробноанаэробная микрофлора, другие бактериальные патогены – *Neisseria gonorrhoeae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Arcanobacterium haemolyticum* (ранее *Corynebacterium haemolyticum*), *Yersinia enterocolitica*, *Treponema pallidum*, *Chlamydomphila pneumoniae*,

Mycoplasma pneumoniae [9, 14]. В 30% случаев этиологию острого тонзиллофарингита установить не удастся.

Считается, что большинство случаев острых респираторных заболеваний, острого бронхита и ларинготрахеита вызвано вирусами и не требует назначения антибиотиков.

Однако в последнее время появляется все больше информации о роли бактериальных возбудителей, прежде всего атипичных патогенов (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*), а также *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* в этиологии подобных инфекций, особенно у лиц молодого возраста без сопутствующей патологии [10, 13] и у детей.

к сведению

Первое место по распространенности в мире среди болезней органов дыхания человека занимает хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), которая становится одной из основных причин нетрудоспособности, инвалидности, значительно снижает качество жизни пациентов и занимает 4-е место среди причин смерти в промышленно развитых странах. В США ХОБЛ страдает около 14 млн человек, в Великобритании – 900 тыс. человек, в России – 11 млн (хотя в соответствии с официальной статистикой – около 1 млн) [2, 3]. Вторая по распространенности болезнь органов дыхания – бронхиальная астма (БА), в патогенезе которой основная роль принадлежит аллергическому статусу макроорганизма. Одним из важных факторов обострений БА и ХОБЛ являются инфекционные агенты.

Бактериальная этиология имеет место примерно в половине всех ХОБЛ, причем наиболее частые возбудители случаев обострений – *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. pneumoniae* и *C. pneumoniae* [18].

Серьезную медико-социальную проблему для многих стран мира представляет также внебольничная пневмония (ВП). Известно, что ежегодно общее число больных в 5 европейских странах (Великобритания, Франция, Италия, Германия, Испания) превышает 3 млн человек. В России, согласно официальной статистике, среди лиц старше 18 лет регистри-

руют до 440 тыс. случаев ВП в год. Однако даже эти данные не отражают истинной картины заболеваемости пневмониями, которая, по расчетам специалистов, достигает 14–15%, а общее число больных ежегодно превышает 1,5 млн человек. Летальность при данном поражении дыхательных путей у пациентов с тяжелой сопутствующей патологией достигает 15–30%.

Из многочисленных микроорганизмов, колонизирующих верхние дыхательные пути, лишь некоторые, обладающие повышенной вирулентностью, способны при попадании в нижние дыхательные пути вызывать воспалительную реакцию [5].

По результатам проспективного клинико-микробиологического исследования по изучению этиологической структуры бактериальных возбудителей ВП у взрослых пациентов в различных стационарах Смоленска наиболее частыми бактериальными возбудителями ВП среди лиц с установленным этиологическим диагнозом были *M. pneumoniae*, *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, однако их удельный вес, также как и значимость более редко выявляемых энтеробактерий, существенно варьировал среди пациентов с различной степенью тяжести заболевания в отдельных ЛПУ, участвовавших в исследовании [4].

Нозокомиальная пневмония (НП) – одно из наиболее часто встречаемых в стационаре инфекционных заболеваний и самое распространенное у больных отделений реанимации и интенсивной терапии. По данным Роспотребнадзора, НП в России ежегодно переносят до 8% пациентов, или 2 млн больных [6].

Основной механизм инфицирования при НП – аспирация содержимого ротоглотки. Колонизация ротоглотки *Streptococcus pneumoniae*, анаэробами, реже *Haemophilus influenzae* характерна для многих здоровых людей. Между тем колонизация ротоглотки грамотрицательными бактериями, и прежде всего *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter spp.*, в норме встречается крайне редко. Вероятность орофарингеальной колонизации *P. aeruginosa* и энтеробактериями возрастает по мере увеличения длительности пребывания в стационаре и (или) степени тяжести заболевания. Риск развития НП у пациентов с колонизацией верхних дыха-

тельных путей ГОБ возрастает почти в 10 раз по сравнению с больными без заселения ротоглотки данными микроорганизмами [11, 14].

Наиболее часто НП вызывают аэробные грамотрицательные микроорганизмы, такие как *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter spp.* Достаточно часто выделяются грамположительные бактерии, включая метициллинрезистентные штаммы *Staphylococcus aureus* (MRSA).

Роль *Legionella pneumophila* более значима у пациентов с иммунодефицитными состояниями, в частности, после трансплантации органов. У пациентов без иммунодефицитов НП, вызванные вирусами и грибами, встречаются крайне редко.

Патология дыхательной системы – одна из основных причин высокой заболеваемости и смертности новорожденных детей (уязвимой группы пациентов из-за незрелости дыхательной системы). По данным А.И. Алиевой и соавт. [1], при исследовании этиологической структуры пневмоний у новорожденных чаще всего выделяли грамотрицательные микроорганизмы (92%), среди которых преобладали *Pseudomonas aeruginosa* (39%), *Escherichia coli* (28%) и *Klebsiella pneumoniae* (26%). Грамположительные возбудители были представлены стафилококками, среди которых чаще других выявляли *Staphylococcus epidermidis*, обладающий гемолитическими свойствами (36%). При тяжелом течении пневмоний основным возбудителем была *Stenotrophomonas maltophilia*.

Таким образом, спектр бактериальных возбудителей инфекций дыхательных путей характеризуется преобладанием пневмотропных микроорганизмов и варьирует в зависимости от формы и локализации инфекции, возрастной категории пациентов; также может иметь региональные и локальные особенности в зависимости от типа стационара и отделения. В связи с этим представляет интерес изучение эпидемиологических и клинико-микробиологических особенностей данной патологии с учетом региональной специфики для определения стратегии и тактики применения антибактериальных препаратов стартовой эмпирической и последующей этиотропной терапии.

Исследование этиологии инфекций верхних и нижних дыхательных путей

Для изучения микробиоты респираторного тракта при инфекциях верхних и нижних отделов дыхательных путей у различных категорий больных были проанализированы результаты бактериологического исследования отделяемого верхних дыхательных путей при инфекциях данного локуса у 2062 взрослых пациентов, обследованных на амбулаторном этапе оказания медицинской помощи; 493 образцов мокроты (трахеобронхиальных смывов) у взрослых с инфекциями нижних отделов дыхательных путей, обследованных в профильном отделении стационара; 58 образцов трахеобронхиальных смывов пациентов отделения реанимации, находящихся на искусственной вентиляции легких; 475 образцов трахеобронхиальных смывов новорожденных отделения реанимации 2-го этапа выхаживания.

Отбор и доставка проб в лабораторию проводились в соответствии с действующими нормативными документами [7]. Материал из зева при инфекциях верхних дыхательных путей забирали натошак стерильным ватным тампоном и доставляли в лабораторию в транспортной среде Эймса в течение 2 ч. Пробы мокроты и трахеобронхиальных смывов забирали в стерильные пластиковые емкости.

Посев материала проводили в каждом случае на оптимальный для выделения пневмотропных микроорганизмов набор питательных сред (5% кровяной агар, шоколадный агар, желточно-солевой агар, среда Эндо, среда Сабуро) количественным методом, инкубацию проводили в термостате при 37 °С и CO₂ инкубаторе (кровяной и шоколадный агар). Образцы мокроты окрашивали по Граму с последующей микроскопией для оценки качества образца и определения преобладающего морфотипа бактерий.

Культурально исследовали только те образцы мокроты, в которых в результате просмотра не менее 10 полей зрения при малом увеличении микроскопа было выявлено более 25 полиморфноядерных лейкоцитов и менее 10 эпителиальных клеток. Доля репрезентативных образцов составила 63,2%.

к сведению

Идентификацию выделенных культур проводили с использованием наиболее рационального в каждом случае набора методов (классические тесты, хромогенные среды, иммуносерологические методы, масс-спектрометрия Maldi-Toff). Антибиотикорезистентность определяли диско-диффузионным методом (EUCAST 2016, анализатор Adagio), при необходимости – с помощью E-тестов.

При исследовании содержимого носоглотки у амбулаторных пациентов клинически значимые микроорганизмы были выделены в 61% случаев, среди них наиболее часто – *Staphylococcus aureus* (45,2%), *Haemophilus spp.* (25,1%), *Streptococcus pneumoniae* (21,7%), *Candida spp.* (5,8%), *Streptococcus pyogenes* (2,1%). В остальных случаях были выделены представители резидентной микрофлоры данного локуса – зеленыящие стрептококки, коагулазонегативные стафилококки, нейссерии, а также энтерококки, представители энтеробактерий и неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы (НФГОМ) в концентрациях, не имеющих клинического значения (рис. 1).

У пациентов пульмонологического отделения с инфекциями нижних отделов дыхательных путей спектр бактериальных возбудителей выглядел следующим образом: наиболее часто были выделены *Candida spp.* (33,5%), *Streptococcus pneumoniae* (16%), *Haemophilus influenzae* (5,1%), *Klebsiella pneumoniae* (4,6%). Среди выделенных штаммов дрожжеподобных грибов рода *Candida* доминировали *Candida albicans* (82,9%), встречались и другие виды: *C. glabrata* (6,3%), *C. krusei* (4,2%), *C. tropicalis* (4,2%), *C. parapsilosis* (2,1%). Реже выделялись: золотистый стафилококк, энтеробактерии других видов (кроме *K. pneumoniae*), неферментирующие грамотрицательные микроорганизмы (НФГОМ), зеленыящие стрептококки, энтерококки (рис. 2). Данный спектр возбудителей был характерен лишь для тех образцов, для которых на этапе предварительной микроскопии подтверждалась корректность забора биоматериала.

Иначе выглядел спектр возбудителей, выделенных из трахеобронхиальных смывов пациентов отделения реанимации, находящихся на искусственной вентиляции легких – на 1-е место здесь вышли НФГОМ (25,3%), в основном *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* и *Pseudomonas aeruginosa*; предста-

вители семейства *Enterobacteriaceae* (22,8%), среди которых доминировала *Klebsiella pneumoniae*; далее следовали *Staphylococcus aureus* (8,86%) и *Candida spp.* (6,3%). *Streptococcus pneumoniae* же выделялся лишь в единичных случаях (1,3%) (рис. 3).

Совершенно иначе выглядела этиологическая структура возбудителей инфекций нижних дыхательных путей у но-

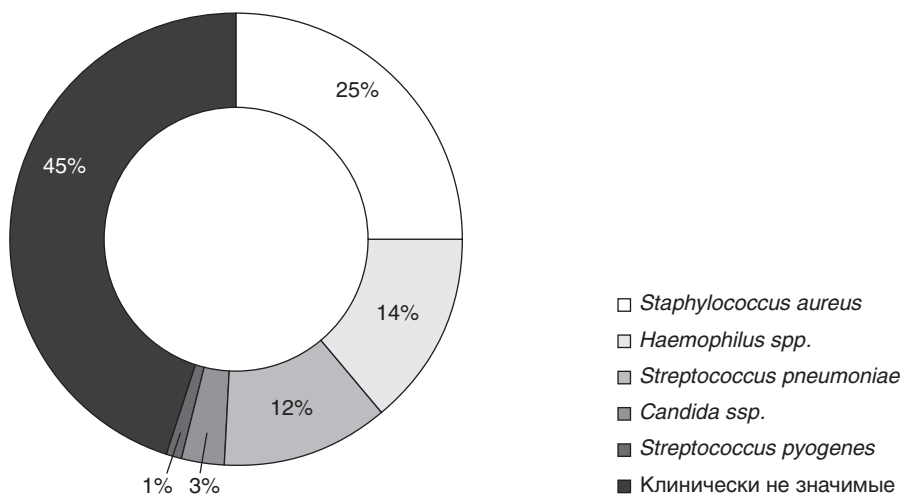


Рис. 1. Спектр микроорганизмов, выделенных из зева у амбулаторных пациентов

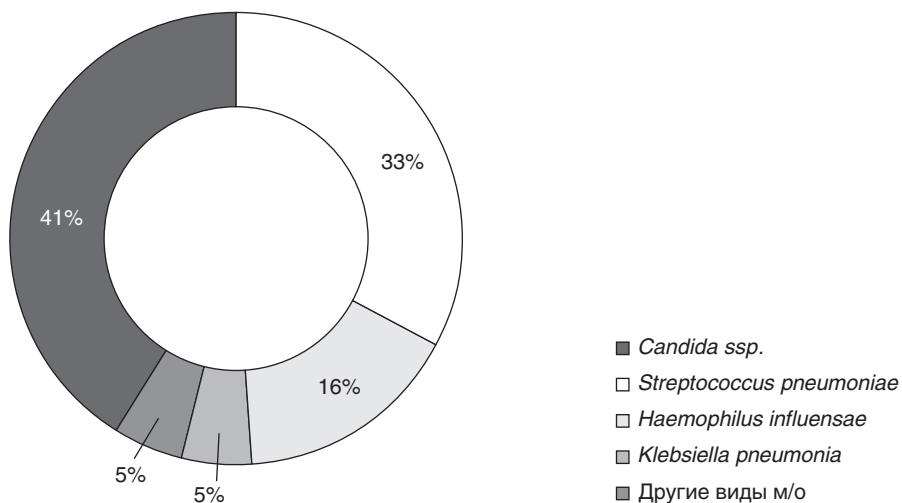


Рис. 2. Спектр микроорганизмов, выделенных из мокроты госпитализированных взрослых пациентов

ворожденных 2-го этапа выхаживания (пациентов отделения реанимации). Здесь доминировали коагулазонегативные стафилококки (29,6%), в основном *Staphylococcus epidermidis* (48,4%), *Staphylococcus haemolyticus* (22,1%), *Staphylococcus warneri* (14,7%) и *Staphylococcus hominis* (11,6%). Далее следовали НФГОМ (10,3%), энтеробактерии (8,6%, в основном *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*), *Candida spp.* (5,9%) и *Streptococcus pneumoniae* (5,1%). Значительно реже выделя-

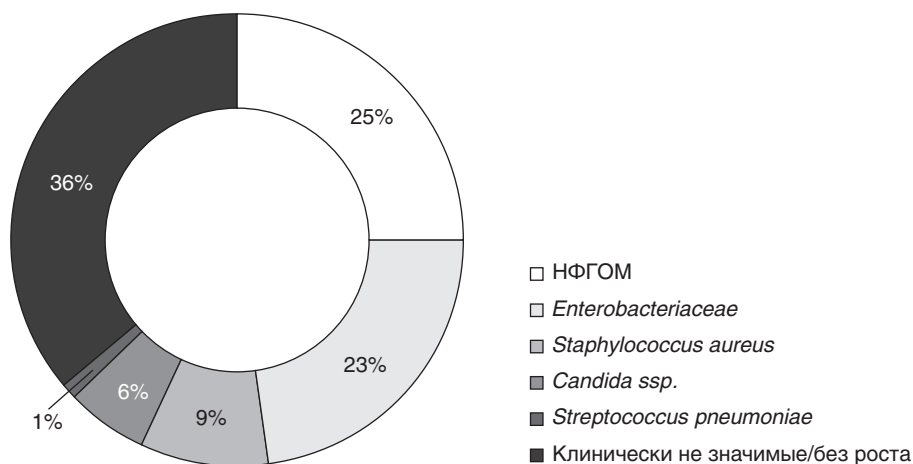


Рис. 3. Спектр микроорганизмов, выделенных из трахеобронхиальных смывов пациентов реанимационного отделения

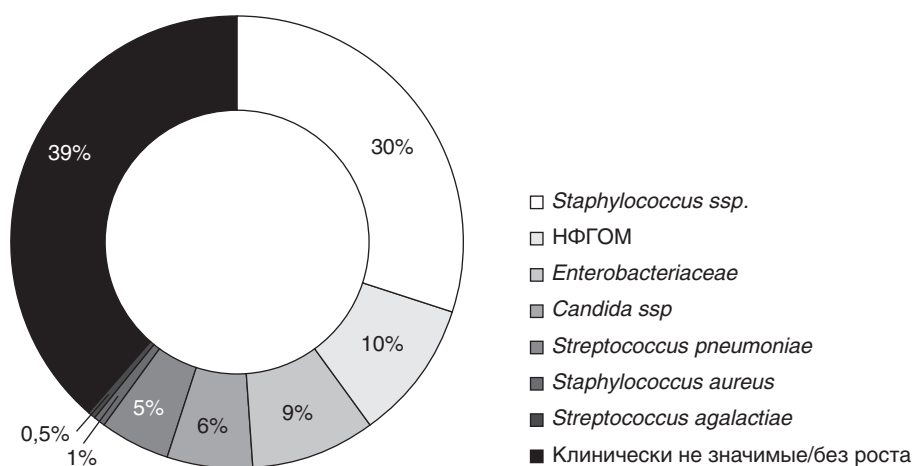


Рис. 4. Спектр микроорганизмов, выделенных из трахеобронхиальных смывов новорожденных отделения реанимации

лись *Staphylococcus aureus* (1,4%), *Streptococcus agalactiae* (0,5%) и другие виды микроорганизмов (рис. 4).

Антибиотикорезистентность *Streptococcus pneumoniae*

В настоящем исследовании были выявлены также различия в распространенности антибиотикорезистентности возбудителей у обследованных категорий больных. Особый интерес представляют данные об антибиотикорезистентности основного патогена для данного биотопа – *S. pneumoniae*.

После широкого внедрения в клиническую практику бензилпенициллина в 1944 году терапия пневмококковых инфекций традиционно основывалась на высокой активности препарата вследствие универсальной чувствительности пневмококков к нему [8]. Однако уже в середине 60-х годов в США впервые в мире из мокроты пациента с пневмонией был выделен пенициллинорезистентный пневмококк (ПРП). Позже резистентные штаммы, в том числе не только по отношению к β -лактамам антибиотикам, распространились по всему миру. В последние 10 лет скорость и уровень распространения ПРП в некоторых странах носит эпидемический характер. В целом по странам Европы чувствительность пневмококка к пенициллину составляет около 80%, а к макролидам – меньше 90% [19, 20]. В странах Азии регистрируемая частота ПРП варьирует от 20,3% в Китае до 71,5% в Корее [15, 17]. К макролидам отмечена крайне низкая чувствительность. Например, в Китае резистентность к последним составляет 75,4% [17], Корею – 87,6 [15], Японии – 77,9% [16].

С целью мониторинга антибиотикорезистентности клинических штаммов пневмококка в России проводились проспективные многоцентровые микробиологические исследования ПеГАС-I (фаза «А» (1999–2000), фаза «Б» (2001–2003)), ПеГАС-II (2004–2005) и ПеГАС-III (2006–2009), позволившие выявить тенденции и уровни резистентности данного возбудителя к основным группам антибактериальных препаратов [6]. Известно также, что фенотипы антибиотикорезистентности пневмококков имеют различия в зависимости от локализации инфекции. Так, частота выделения резистентных к тетрациклину пневмококков при острых синуситах достоверно выше ($p = 0,026$), чем при пневмониях.

Таким образом, существенным дополнением к данным многоцентровых исследований для определения региональной стратегии эмпирической антимикробной терапии может стать анализ локальных данных о резистентности ведущего возбудителя бактериальных инфекций дыхательных путей к антибактериальным препаратам у различных категорий пациентов.

к сведению

Результаты нашего анализа полученных данных (рис. 5.) показывают, что среди штаммов пневмококка, выделенных из отделяемого верхних дыхательных путей у амбулаторных пациентов, частота резистентности к бензилпенициллину и цефалоспорином находится на уровне 13%. Устойчивость к 14–15-членным макролидам составила 21,8%, фторхинолонам – 3,8%, доксициклину – 6,2%. Штаммы, выделенные из мокроты и трахеобронхиальных смывов госпитализированных пациентов, были устойчивы к бензилпенициллину и цефалоспорином в среднем в 29% случаев, макролидам – в 42,5% случаев, фторхинолонам – 13,3%, доксициклину – 10,2%. Значимо более высокая резистентность также была выявлена у штаммов, колонизировавших дыхательные пути новорожденных пациентов отделения реанимации – около 38% штаммов оказались устойчивы к бензилпенициллину и цефалоспорином, к макролидам – 28,7%, к фторхинолонам – 7,7% и к доксициклину – 2,8%. При этом во всех случаях сохранялась 100% чувствительность к карбапенемам.

Результаты исследований позволяют полагать, что в этиологической структуре возбудителей инфекций дыхательных путей имеются существенные различия в зависимости от возраста пациента, а также локализации и тяжести патологического процесса. В микробиоте носоглотки при инфекциях верхних отделов дыхательных путей доминируют *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus spp.* и *Streptococcus pneumoniae*, несколько реже выделяются дрожжеподобные грибы рода *Candida* и *Streptococcus pyogenes*. В изученной группе госпитализированных пациентов с инфекциями нижнего отдела дыхательных путей наиболее часто были выделены *Candida spp.*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus*

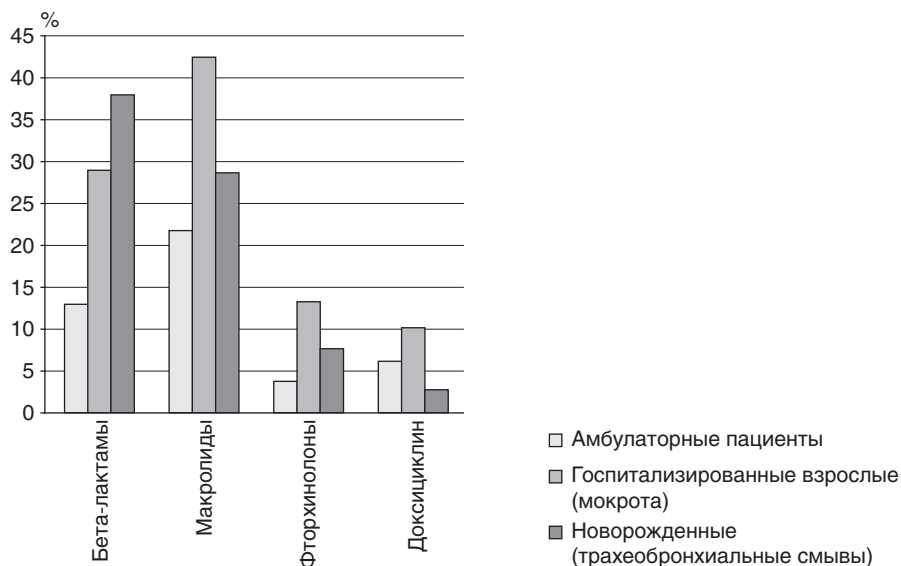


Рис. 5. Резистентность *Streptococcus pneumoniae* к антибактериальным препаратам, %

influenzae и *Klebsiella pneumoniae*. При обследовании взрослых пациентов отделения реанимации установлено, что они чаще всего инфицированы грамотрицательными микроорганизмами семейства *Enterobacteriaceae* и НФГОМ, у новорожденных же обычно встречались коагулазонегативные стафилококки, реже – НФГОМ, энтеробактерии, дрожжеподобные грибы рода *Candida* и *Streptococcus pneumoniae*.

При существенных различиях микробиологической картины у обследованных категорий пациентов во всех группах с различной частотой выявлен *Streptococcus pneumoniae*. Выделенные штаммы пневмококка неоднородны по антибиотикорезистентности у обследованных категорий пациентов. Наибольший уровень резистентности к β -лактамным антибиотикам отмечен у штаммов, колонизирующих дыхательные пути новорожденных отделения реанимации; к макролидам и фторхинолонам – у штаммов, выделенных из мокроты и трахеобронхиальных смывов взрослых госпитализированных пациентов.

Полученные результаты отражают локальные особенности микрофлоры респираторного тракта при инфекциях дыхательных путей, дают материал для эпидемиологи-

ческого анализа и определения стратегии эмпирической антимикробной терапии при различных формах инфекций дыхательных путей.

Список использованной литературы

1. Алиева А.И., Касумова А.М., Абсерханова Д.У. Пневмонии новорожденных: особенности этиологии, диагностики и лечения // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2014. № 5. С. 1427–1429.
2. Дронова О.И. Хроническая обструктивная болезнь легких // Русский медицинский журнал. 2007. № 18. С. 13–39.
3. Козлов Р.С. Пути оптимизации мониторинга, профилактики и фармакотерапии пневмококковых инфекций. Автореф. дис. на соиск. учен. степ. д-ра мед. наук (14.0025 и 03.00.07)). Смоленск, 2004. 46 с.
4. Рачина С.А., Козлов Р.С., Шаль Е.П. и др. Структура бактериальных возбудителей внебольничной пневмонии в многопрофильных стационарах Смоленска // Пульмонология. 2011. № 1. С. 5–18.
5. Чучалин А.Г., Синкопальников А.И., Козлов Р.С. и др. Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. М.: Атмосфера., 2010. 106 с.
6. Чучалин А.Г., Гельфанд Б.Р. Нозокомиальная пневмония у взрослых (Национальные рекомендации) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2009. № 2. С. 100–142.
7. Методические указания. МУ 4.2.2039-05. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории.
8. Austrian R. Pneumococcus: the first one hundred years // Rev Infect Dis. 1981. Vol. 3. P. 183–189.
9. Bisno A.L. Pharyngitis. In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., editors. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6th ed. Philadelphia: Churhill Livingstone. 2005. P. 752–758.
10. Blasi F. Atypical pathogens and respiratory tract infections // Eur Respir J. 2004. Vol. 24. P. 171–181.

11. *Craven D.E. et al.* Risk factors for pneumonia and fatality in patients receiving continuous mechanical ventilation // *Am Rev Respir Dis.* 1986. Vol. 133. P. 792–796.
12. *Fendrick A.M., Monto A.S., Nightengale B. et al.* The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States // *Arch Intern Med.* 2003. Vol. 163. P. 487–494
13. *Gonzales R., Sande M.A.* Uncomplicated acute bronchitis // *Ann Intern Med.* 2001. Vol. 135. P. 839–40.
14. *Holzappel L., Chervet S., Madinier G. et al.* Influence of long-term oro- or nasotracheal intubation on nosocomial maxillary sinusitis and pneumonia: results of a prospective, randomized, clinical trial // *Crit. Care Med.* 1993. Vol. 21. P. 1132–1138.
15. *Inoue M., Lee N.Y., Hong S.W. et al.* PROTEKT 1999–2000: a multicenter study of the antibiotic susceptibility of respiratory tract pathogens in Hong Kong, Japan and South Korea // *Int J Antimicrob Agents.* 2004. Vol. 23. P. 44–51.
16. *Inoue M., Kohno S., Kaku M. et al.* PROTEKT 1999–2000: a multicentre study of the antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens in Japan // *Int J Infect Dis.* 2005. Vol. 9 (1). P. 27–36.
17. *Liu Y.N., Chen M.J., Zhao T.M. et al.* A multicentre study on the pathogenic in 665 adult patients with community-acquired pneumonia in cities of China // *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 2006. Vol. 29. P. 3–8.
18. *Murphy T.F., Sethi S.* Chronic obstructive pulmonary disease: role of bacteria and guide to antibacterial selection in the older patient // *Drugs Aging.* 2002. Vol. 19. P. 761–775.
19. *Melo-Cristiano J.L., Santos M., Ramirez M.* The Viriato study: update of antimicrobial susceptibility data of bacterial pathogens from community-acquired respiratory tract infections in Portugal in 2003 and 2004 // *Rev Port Pneumol.* 2006. Vol. 12. P. 9–30.
20. *Morrissey I., Robbins M., Viljoen L. et al.* Antimicrobial susceptibility of community-acquired respiratory tract pathogens in the UK during 2002/3 determined locally and centrally by BSAC methods // *J Antimicrob Chemother.* 2005. Vol. 55. P. 200–208.



Лабораторная диагностика чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам

Л.В. Домотенко

канд. хим. наук, зав. лабораторией разработки питательных сред,

А.П. Шепелин

д-р биол. наук, зам. директора по научно-производственной деятельности

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, пос. Оболенск, Московская область

Статья анализирует ситуацию с резистентностью микроорганизмов к антимикробным препаратам в мире и в нашей стране, а также меры противодействия. Показано, что один из возможных путей – улучшение лабораторной диагностики. Для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам в соответствии с требованиями современных нормативных документов в нашей стране созданы все условия и есть необходимые отечественные препараты. Переход к современной методологии с использованием стандартизированной среды Мюллера – Хинтон позволит получать достоверные и сопоставимые результаты, необходимые как для оптимального лечения пациентов, так и для сбора и анализа данных по мониторингу за появлением и распространением резистентности возбудителей инфекций к антимикробным препаратам.

Ситуация с резистентностью к антимикробным препаратам

Устойчивость патогенных и условно патогенных микроорганизмов – возбудителей инфекционных болезней к антимикробным препаратам, включая антибиотики, вызывает серьезную оза-

боченность общественного здравоохранения во всем мире, в т. ч. в России. Резистентность возникла даже к карбапенемам – самым эффективным препаратам для лечения инфекций, вызываемых устойчивыми анаэробами и энтеробактериями.

Крупным достижением прошлого века было открытие Александром Флемингом в 1928 г. пенициллина, а затем других антибиотиков, которые предотвратили смерть миллионов людей от бактериальных инфекций. Однако возбудители эволюционировали и развили устойчивость к антибиотикам. В течение десятилетий ученым удавалось разрабатывать новые препараты и, по крайней мере на шаг, опережать изменяющихся возбудителей.

С увеличением масштабов применения антибиотиков в медицинской практике нарастало число устойчивых штаммов микроорганизмов. В то же время разработка антибиотиков с новыми механизмами действия практически прекратилась. Если в середине прошлого века клиницисты сталкивались с единичными случаями инфекций, вызванных устойчивыми формами микроорганизмов, то сегодня врачи наблюдают угрожающий рост антибиотикорезистентности возбудителей инфекционных болезней. Ситуация осложняется тем, что появляются микроорганизмы, устойчивые ко всем или нескольким антибиотикам, которые врачи обычно используют для лечения инфекций. Их обозначают популярным термином «супермикроб» или «супербактерия» (superbug – англ.). Научная литература использует понятие «бактерии с множественной лекарственной устойчивостью».

Сегодня нет точных данных о масштабах антибиотикорезистентности и ее последствиях. Регулярный эпидемиологический надзор за антибиотикорезистентностью в большинстве стран часто основывается на результатах исследования образцов, взятых у пациентов с тяжелыми инфекциями, в частности с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи [3].

Зачастую врачи списывают внутрибольничные инфекции, не поддающиеся лечению антибиотиками, на хронические заболевания [7].

к сведению

Научные статьи описывают некоторые случаи антибиотикорезистентности. Например, в Танзании лечение 70%

младенцев с сепсисом оказалось неуспешным из-за развития резистентности к препаратам, рекомендованным ВОЗ [9]. В исследовании Американского центра по контролю и профилактике заболеваний показано, что только инфекции, вызываемые устойчивыми к метициллину *Staphylococcus aureus* (MRSA-инфекции), ежегодно приводят к 19 тыс. смертей [6]. По оценкам ВОЗ, вероятность смерти больного, инфицированного метициллин-резистентным золотистым стафилококком, на 64% выше, чем пациента с нерезистентным штаммом *S. aureus*.

Как минимум в 10 странах (Австралия, Австрия, Канада, Франция, Япония, Норвегия, Словения, Южная Африка, Швеция и Великобритания) зафиксированы случаи неэффективности лечения гонореи препаратами «последней надежды» – цефалоспорины III поколения. Препаратом «последней надежды» при лечении опасных для жизни инфекций, вызываемых *Enterobacteriaceae*, является колистин. Однако в нескольких странах и регионах наблюдаются случаи устойчивости к колистину, что делает инфекции неизлечимыми.

По оценкам Американского центра по контролю и профилактике заболеваний, в США каждый год 2 млн человек заражаются бактериями, которые устойчивы к одному или нескольким антибиотикам, предназначенным для лечения этих инфекций. По крайней мере, 23 тыс. человек ежегодно умирают от инфекций, вызванных антибиотикорезистентными бактериями.

По результатам масштабного исследования ситуации с резистентностью к антимикробным препаратам, проведенного британским экономистом Джимом О'Нилом, только в Европе и США каждый год до 50 тыс. жизней уносят инфекции, вызванные возбудителями, устойчивыми к лекарственной терапии. Доклад прогнозирует, что к 2050 году это число возрастет до 10 млн смертей в год [4, 8].

Устойчивость к антимикробным препаратам – многогранная проблема, касающаяся всего общества и определяемая множеством взаимосвязанных факторов. Отдельные изолированные усилия малоэффективны. Для борьбы с развитием и распространением устойчивости к антимикробным препаратам необходимы согласованные действия.

В мае 2015 года 68-я Всемирная ассамблея здравоохранения приняла Глобальный план действий по борьбе с резистентностью к антимикробным препаратам, в котором выразила единодушное мнение, что резистентность представляет угрозу здоровью человека. Одна из пяти стратегических целей Глобального плана действий – упрочить доказательную базу посредством укрепления глобального мониторинга и исследований.

По инициативе ВОЗ создана Глобальная система эпидемиологического надзора за устойчивостью к антимикробным препаратам (GLASS), в которую вошли или находятся в процессе присоединения 43 страны. Цель – поддержать стандартизированный подход к сбору, анализу и обмену данными об устойчивости к антимикробным препаратам. На первых этапах система GLASS сосредоточит внимание на бактериальных патогенах у людей. Система GLASS будет собирать, анализировать и проверять сопоставимые и проверенные данные по антибиотикорезистентности со странами и партнерами в целях информирования о процессе принятия решений, осуществления местных, национальных и региональных действий и предоставления доказательств для вмешательства и адвокации.

Россия включилась в Центрально-Азиатскую и Восточноевропейскую сеть эпидемиологического надзора за устойчивостью к антимикробным препаратам (CAESAR), созданную Европейским региональным бюро ВОЗ с целью стандартизации сбора данных для обеспечения сопоставимости информации. Для анализа и визуализации данных по всей стране разработана система мониторинга антибиотикорезистентности – AMRmap. В систему включена информация об антибиотикорезистентности из 52 городов Российской Федерации с 1997 по 2016 год, которая доступна на сайте map.antibiotic.ru.

Высшей формой признания проблемы резистентности явилось проведение по инициативе ВОЗ специальной сессии по антибиотикорезистентности в рамках 71-й сессии Генеральной ассамблеи ООН в сентябре 2016 года, целью которой были наращивание усилий мирового сообщества и активизация многосекторальной деятельности на национальном уровне.

Список устойчивых к антибиотикам бактерий, разработанный ВОЗ

Глобальную кампанию по борьбе с устойчивостью к антимикробным препаратам координирует ВОЗ. В феврале 2017 года ВОЗ впервые опубликовала список бактерий, резистентных к лекарственным средствам, представляющих наибольшую угрозу здоровью человека, для борьбы с которыми крайне необходимы новые антибиотики [5]. Бактерии разделены на три группы по уровню приоритетности создания и производства новых антибиотиков.

1-я группа – критический уровень приоритетности:

- ~ *Acinetobacter baumannii*, устойчивые к карбапенемам;
- ~ *Pseudomonas aeruginosa*, устойчивые к карбапенемам;
- ~ *Enterobacteriaceae*, включая *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Proteus spp.*, и *Providencia spp.*, *Morganella spp.*, устойчивые к карбапенемам, вырабатывающие β -лактамазы расширенного спектра действия.

2-я группа – высокий уровень приоритетности:

- ~ *Enterococcus faecium*, устойчивые к ванкомицину;
- ~ *Staphylococcus aureus*, устойчивые к метициллину, умеренно чувствительные или устойчивые к ванкомицину;
- ~ *Helicobacter pylori*, устойчивые к кларитромицину;
- ~ *Campylobacter spp.*, устойчивые к фторхинолонам;
- ~ *Salmonellae*, устойчивые к фторхинолонам;
- ~ *Neisseria gonorrhoeae*, устойчивые к цефалоспорином, фторхинолонам.

3-я группа – средний уровень приоритетности:

- ~ *Streptococcus pneumoniae*, нечувствительные к пенициллину;
- ~ *Haemophilus influenzae*, устойчивые к ампициллину;
- ~ *Shigella spp.*, устойчивые к фторхинолонам.

Возбудители туберкулеза, устойчивость которых к традиционным методам лечения в последние годы возрастает, не вошли в список, поскольку являются объектом внимания других специальных программ.

При внесении возбудителей в список ВОЗ применяла критерии: летальность от вызываемых ими инфекций; наличие или отсутствие необходимости длительной госпитали-

зации для лечения инфекций; частота случаев устойчивости к существующим антибиотикам в медицинской практике; легкость передачи инфекции среди животных, от животных к человеку и от человека к человеку; возможность профилактики (например, пищевая гигиена и вакцинация); число вариантов лечения, остающихся в распоряжении врача.

Цель публикации списка – стимулировать фундаментальные исследования и передовые разработки в области создания новых антибиотиков за счет инвестиций со стороны организаций с госфинансированием и частного сектора.

Национальный план по борьбе с устойчивостью микроорганизмов к действию лекарственных препаратов

Активизация в области научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ жизненно необходима, однако сама по себе не решает проблему. Для борьбы с устойчивостью к антибиотикам необходимо повышать информированность о проблеме лекарственной устойчивости и улучшать эпидемиологический надзор за резистентными микроорганизмами. Эти и другие направления борьбы вошли в проект «Стратегии предупреждения и преодоления устойчивости микроорганизмов и вредных организмов растений к лекарственным препаратам, химическим и биологическим средствам на период до 2030 года и дальнейшую перспективу», который разработал Минздрав России. Ожидается, что документ будет утвержден в 2017 году. Решение создать стратегию борьбы с распространением антибиотикорезистентности Минздрав принял после возвращения Министра Вероники Скворцовой с 71-й сессии Генеральной ассамблеи ООН. На сессии страны-члены ООН договорились о разработке национальных планов противодействия антибиотикорезистентности. В основе российской стратегии лежат пять направлений в соответствии с рекомендациями ВОЗ: повышение информированности о проблеме устойчивости микроорганизмов к антибиотикам; улучшение эпидемиологического надзора за резистентными микроорганизмами; создание новых препаратов; создание финансовой основы, чтобы исследования проводились постоянно; улучшение диагностики и внедрение обязательных ла-

бораторных исследований, направленных на выявление антибиотикорезистентности в медорганизациях.

Есть несколько методов выявления резистентности микроорганизмов. Наиболее распространенный – диско-диффузионный [1].

Диско-диффузионный метод выявления чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам

Диско-диффузионный метод является одним из старейших и остается наиболее используемым методом оценки чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам в обычных бактериологических лабораториях. Метод подходит для исследования большинства бактериальных патогенов, в т. ч. наиболее распространенных бактерий со сложными питательными потребностями. Метод универсален для широкого круга антимикробных препаратов и не требует специального оборудования.

Для получения достоверных результатов необходимо следовать методике, описанной в нормативных документах. До 2014 года единственным документом, регламентирующим процедуру тестирования, были «Методические указания по определению чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам» МУК 4.2.1890-04, которые базируются на требованиях стандарта M100 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute – Институт клинических и лабораторных стандартов, США). В соответствии с требованиями МУК 4.2.1890-04 для тестирования чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом можно использовать любую среду данного назначения, разрешенную к применению на территории РФ. Для микроорганизмов с обычными питательными потребностями это АГВ, питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, агар Мюллера – Хинтон, изосенситест и др. Для микроорганизмов со сложными питательными потребностями рекомендованы две среды: специальная среда *Haemophilus Test Medium* для тестирования *H. influenzae*, а для остальных (*Streptococcus pneumoniae*, стрептококки групп А, В, С, G и др.) – агар Мюллера – Хинтон с добавлением 5% бараньей крови.

В 2014 году утверждены клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам». Рекомендации ориентированы на методологию в оценке чувствительности и интерпретации результатов, которую предложил Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST), и являются переводом документов EUCAST. В соответствии с рекомендациями для анализа чувствительности микроорганизмов с обычными питательными потребностями можно использовать только одну питательную среду – агар Мюллера – Хинтон. Для тестирования микроорганизмов со сложными питательными потребностями рекомендована единая среда для *Streptococcus spp.*, *Haemophilus influenzae* и др. – агар Мюллера – Хинтон с добавлением 5% дефибринированной лошадиной крови и 20 мг/л β -никотинамидадениндинуклеотида (β -НАД).

Три года после утверждения клинических рекомендаций стали переходными. Многие лаборатории начали внедрять в практику их требования. Но еще много лабораторий работают по МУК 4.2.1890-04. Ряд технических трудностей, в основном вызванных сложностью приобретения агара Мюллера – Хинтон надежных фирм-производителей в период экономического кризиса и отсутствием на рынке доступной лошадиной крови, ограничивал использование нового нормативного документа.

Теперь ситуация меняется. Стала доступна дефибринированная лошадиная кровь отечественного и импортного производства. Государственным научным центром прикладной микробиологии и биотехнологии разработана технология производства агара Мюллера – Хинтон II [2]. Питательная среда прошла клинические испытания и зарегистрирована в установленном порядке в Росздравнадзоре как медицинское изделие.

Проблема устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам – многоплановая, ее нужно решать комплексно. Если оснастить микробиологические лаборатории высококачественными препаратами для тестирования чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам, можно получать достоверные и сопоставимые результаты. С одной стороны, это поможет оптимально лечить

пациентов, а с другой – собирать и анализировать данные для мониторинга появления и распространения резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам.

Список использованной литературы

1. Решедько Г.К., Стецюк О.У. Особенности определения чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2001. № 4. С. 348–354.
2. Шепелин А.П., Морозова Т.П., Косилова И.С. и др. Оценка качества питательных сред для определения чувствительности к антибактериальным препаратам // Дезинфекция. Антисептика. 2013. № 1. С. 43–48.
3. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. WHO. apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf.
4. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. The Review on Antimicrobial Resistance Chaired by Jim O'Neill. December 2014. amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf
5. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1.
6. Klevens R.M., Morrison M.A., Nadle J. et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States // JAMA. 2007. Vol. 15. P. 1763–1771. PubMed PMID: 17940231.
7. Swedish work on containment of antibiotic resistance. Tools, methods and experiences. Stockholm: Public Health Agency of Sweden. 2014. PP. 16–17, 121–128. ISBN 978-91-7603-011-0. www.folkhalsomyndigheten.se/contentassets/dae82c7afd424a57b57ec81818793346/swedish-work-on-containment-of-antibiotic-resistance.pdf
8. Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. The review on antimicrobial resistance. Chaired by Jim O'Neill. May 2016. amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf.
9. Zaidi A.K., Huskins W.C., Thaver D. et al. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries // Lancet. 2005. Vol. 365. P. 1175–1188.

Перспективы использования метода микроскопии в работе врача-бактериолога

Ю.А. Захарова

д-р мед. наук, зав. клинико-диагностической лабораторией
ФГБУЗ «Пермский клинический центр ФМБА России», доцент кафедры
эпидемиологии ФГБОУ ВО «Пермский государственный медицинский
университет им. академика Е.А. Вагнера» Минздрава России,

С.В. Артемчик

врач-бактериолог ГБУЗ ПК «Пермская краевая клиническая
инфекционная больница», г. Пермь

Статья посвящена актуальным вопросам использования метода микроскопии при исследовании биологических материалов в бактериологических лабораториях. Представлены качественные и количественные критерии оценки визуализации объектов исследования, определены наиболее адаптированные к этому методу биологические материалы. Обозначены перспективы развития метода микроскопии как одного из направлений работы врача-бактериолога. Авторы полагают, что данный метод и его комбинированный вариант позволяют улучшить качество лабораторной диагностики при существенном сокращении материальных затрат и рабочего времени.

Основная цель микроскопического метода исследования в бактериологической лаборатории традиционно заключается в обнаружении и изучении микроорганизмов. Метод световой микроскопии и его варианты (темнопольная и фазово-контрастная микроскопия) позволяют наблюдать объекты размером от 0,2 мкм [4]; также в медицинской микробиологии используют люминесцентную и электронную микроскопию.

Использование микроскопического метода в бактериологии

С помощью световой микроскопии методом «висячей», или «раздавленной», капли в неокрашенном препарате можно изучить размер, форму и подвижность микробных клеток. Тинкториальные свойства бактерий, грибов и простейших изучают при их вступлении в реакцию с красителями. Задача окраски микроорганизмов в бактериологии – определение микробного пейзажа и чистоты выделенной культуры, а также изучение морфологических особенностей тестируемых микроорганизмов.

Традиционно используют несколько способов окраски. Широко распространенный метод окраски по Граму, кроме морфологии, позволяет идентифицировать грамположительные и грамотрицательные бактерии по особенности строения клеточной стенки. На результаты окрашивания могут оказать существенное влияние рН и состав среды, возраст изучаемой бактериальной культуры.

Грамположительные микроорганизмы могут окрашиваться отрицательно при потере жизнеспособности, активном росте, неравноценном делении и «линьке» стареющих культур (молочнокислые и коринеформные бактерии).

к сведению

Метод окраски по Цилю – Нильсену применим для выявления кислотоустойчивых бактерий, метод Ожешки – для окраски спор в микробных клетках. Окраска по Романовскому – Гимзе позволяет выявить особенности морфологии бактериальных и соматических клеток, обнаружить внутриклеточные включения и микроорганизмы, плохо окрашиваемые по Граму. Из прочих многочисленных методов окраски заслуживает внимания простой и доступный метод Леффлера (метиленовым синим).

Люминесцентная микроскопия, при которой флуорохромные красители связываются со специфическими структурами клетки, и иммунофлуоресцентный метод, при котором меченные флуорохромами антитела связываются с антигенами (АГ) микроорганизмов, получил широкое распространение в конце прошлого века. Его постепенно вы-

теснили более современные методы индикации АГ и ДНК патогенов: иммунохемилюминесцентный, иммунохроматографический и полимеразная цепная реакция.

Электронная микроскопия является приоритетом крупных научно-исследовательских учреждений и референс-центров в силу сложности технологии и дорогостоящего оборудования.

Метод микроскопического исследования активно используют специалисты клинико-диагностической службы, он вошел в основной раздел 1 – «Химико-микроскопическое исследование биологических жидкостей» [13].

В работе микробиологов метод микроскопии до сих пор остается вспомогательным. В большей степени это связано с устоявшимся мнением специалистов о его низкой информативности при дополнительных затратах рабочего времени.

Аргументы следующие. В образцах, имеющих собственную микрофлору, ввиду ее многообразия сложно дифференцировать патогены от резидентной микрофлоры. Не всегда применим количественный критерий – скопления различных микроорганизмов в разных участках мазка могут располагаться неравномерно, и в разных мазках из одного образца могут преобладать различные типы бактериальных клеток. Исходя из этих положений, практические врачи-бактериологи обычно указывают, что микроскопию материала из нестерильных локусов проводить нецелесообразно.

В преобладающем большинстве бактериологических лабораторий в настоящее время не проводят микроскопию мокроты, хотя это регламентировано нормативным документом [15].

к сведению

Парадоксальность проблемы еще и в том, что чем выше уровень квалификации бактериолога и материально-техническое оснащение микробиологической лаборатории, тем меньше врач прибегает к использованию микроскопического метода в своей работе. Исключение составляет анаэробная микрофлора, где метод до сих пор не потерял свою актуальность.

В представленной статье мы постараемся показать преимущества и целесообразность использования этого быстрого, относительно дешевого и доступного метода лабораторной диагностики.

Микроскопия позволяет учесть численность микроорганизмов в исходном биологическом материале [8] в зависимости от визуализированных в поле зрения бактериальных структур (табл. 1).

Таблица 1

**Количество микроорганизмов в 1 г (1 мл)
исследуемого материала в зависимости от содержания микробных тел
в 1 и 10 полях зрения микроскопа (окуляр 7, объектив 90)**

Количество микроорганизмов в исследуемом материале, КОЕ/г, КОЕ/мл	Количество микроорганизмов в 1 поле зрения микроскопа	Количество микроорганизмов в 10 полях зрения микроскопа
10^5	0–1	1–5
10^6	1–5	10–20
10^7	10–20	120–180
10^8	100–180	Не поддается подсчету

При применении микроскопии в исходном материале можно регистрировать морфотипы, определять видовое обилие или однообразие микрофлоры, визуализировать споровые формы бактерий (что невозможно при применении культуральных методов), анализировать численность микробной популяции в серии исследований (в динамике инфекционного процесса).

Микроскопическое исследование позволяет дать оценку качеству доставленного образца – это важно в решении вопроса о целесообразности его дальнейшего исследования.

Актуальность использования метода микроскопии в бактериологии мы обоснуем на конкретных примерах исследования целого ряда биоматериалов с учетом литературных данных и наших собственных наблюдений.

Важно отметить, что биологический материал, помещенный в транспортные питательные среды, как и собранный на сухой тампон, по нашему мнению, для микроскопии не пригоден. Поэтому речь пойдет лишь о микроскопии биологических жидкостей.

Микроскопия отдельных видов биологического материала

Бактериоскопия мокроты – обязательная технологическая процедура при работе с этим материалом; она регламентирована основным нормативным документом [15]. Метод преимущественно используют при диагностике пневмонии, хронической обструктивной болезни легких, муковисцидоза, острого и хронического бронхита, бронхиальной астмы.

Микроскопию мокроты, как и других биологических материалов, проводят с использованием стерильных предметных стекол (с целью исключения контаминации пробы). Предпочтительно отбирать гнойные комочки. В работе используют бактериологические петли диаметром 2–5 мм или специальные приспособления-иглы с утолщенными концами [1].

В соответствии с задачами микробиологического исследования микроскопия мокроты может носить ориентировочный характер или быть нацелена на выявление конкретных объектов, для чего применяют специальные методы подготовки и окраски препарата.

Ориентировочная микроскопия мокроты позволит объективно оценить качество присланного на исследование образца. Например, мокрота пригодна для исследования, если в ходе микроскопии с иммерсией (окуляр $\times 8$ или $\times 10$, объектив $\times 90$ или $\times 100$) обнаруживают более 25 сегментоядерных лейкоцитов и не более 10 эпителиальных клеток в поле зрения при просмотре как минимум 20 полей зрения мазка [11]. Однако существует ряд положений для возможного пересмотра данных рекомендаций:

- ~ клеточные и неклеточные элементы в мокроте распределяются неравномерно [7];
- ~ в начальных стадиях развития пневмонии концентрация возбудителя в зоне поражения высокая, однако мокрота еще не откашливается;
- ~ большое количество нейтрофилов в мокроте при пневмонии появляется в стадии серого опеченения (4–6-й день болезни).

Поскольку нейтрофилы всегда содержатся в мокроте, посев материала для дальнейшего исследования можно рекомендовать при небольшом количестве нейтрофилов. Иначе будет отбракована правильно собранная мокрота (негнойного характера) или за мокроту принят материал из ротоглотки (из-

за большого количества эпителиальных клеток). Абсолютный признак мокроты – наличие альвеолярных макрофагов. Обнаружение цилиндрического реснитчатого эпителия (обычно такие эпителиальные клетки располагаются пластами или скоплениями различных размеров) также говорит о принадлежности материала к респираторному тракту.

Критерием для выбраковки следует считать количество эпителиальных клеток более 10 в поле зрения при просмотре 10–20 полей зрения.

к сведению

При ориентировочной микроскопии мокроты используют простые методы окраски ядерными (основными) красителями – метиленовым синим, основным фуксином, азур-эозином (по Романовскому – Гимзе), по Цилю – Нильсену. Любой из перечисленных способов окраски позволит дифференцировать нейтрофилы, клетки плоского эпителия, цилиндрический эпителий, а также морфологию микробных клеток. Из перечисленных способов наиболее просты: окраска метиленовым синим или основным фуксином. Окраску по Цилю – Нильсену можно применять в случае совмещения ориентировочной микроскопии и поиска кислотоустойчивых микроорганизмов (КУМ). Окраска по Романовскому – Гимзе позволит детально изучить клеточные структуры образца, однако эта методика наиболее длительная и в отношении микробиологической значимости не имеет преимуществ.

Предпочтение отдают методу окраски по Граму, который нацеливает бактериолога на определенные группы микроорганизмов, таким образом оперативно влияя на выбор клиницистом антимикробных препаратов. Однако даже при четко выверенной методике окраски не всегда можно с уверенностью охарактеризовать тинкториальные свойства микроорганизмов. Возможные причины:

- ~ различные партии красителей, срок их приготовления и хранения;
- ~ изменчивость свойств микроорганизма под влиянием факторов внутренней и внешней среды (антибиотики, антисептики, дезинфектанты);
- ~ артефакты, затрудняющие микроскопию.

Иногда по морфологическим характеристикам и взаиморасположению микробных клеток можно сразу сделать пред-

положение об их родовой (видовой) принадлежности, что особо актуально при работе с биологическим материалом от пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ). Однако следует помнить, что под воздействием ряда факторов морфологические характеристики микробных клеток могут меняться.

К специальным методам относят окраски:

- ~ по Цию – Нильсену и флуорохромными красителями для выявления КУМ [14];
- ~ по методу Бурри или в его модификации по Бурри – Гинсу выявление капсулы [8].

Также применяют метод Нейфельда, или феномен набухания капсулы, для диагностики и серотипирования пневмококка [8]; реакцию иммунофлуоресценции (РИФ) для диагностики трудно культивируемых микроорганизмов и вирусов [11].

На основании морфологических и тинкториальных свойств бактериальных структур, обнаруженных в мокроте, ориентировочно их можно отнести к наиболее встречаемым в этом материале родам (видам) микроорганизмов [9, 10, 19–21]:

- ~ *Streptococcus pneumoniae* визуализируют как грамположительные ланцетовидные диплококки. На окрашенном фоне препарата можно увидеть неокрашенные участки общей капсулы вокруг попарно расположенных кокков;
- ~ *Haemophilus spp.* мелкие полиморфные грамотрицательные палочки в виде скоплений, могут представлять овальные, сферические, палочковидные клетки;
- ~ *Staphylococcus spp.* располагаются как многочисленные скопления грамположительных кокков;
- ~ *Micrococcus spp.* – равномерно располагающиеся в препарате тетрады крупных грамположительных кокков;
- ~ *Corynebacterium spp.* – грамвариабельные палочки, расположенные под углом друг к другу, часто имеют неравномерное зернистое окрашивание;
- ~ *Streptococcus spp.* – цепочки грамположительных кокков различной длины;
- ~ *Neisseria spp.* – скопления полиморфных грамотрицательных диплококков;
- ~ *Klebsiella spp.* и др. – грубые грамотрицательные палочки с закругленными концами, часто окруженные капсулой в виде светлого ореола;

- ~ *Escherichia spp.* – крупные грамотрицательные палочки;
- ~ *Pseudomonas spp.* – тонкие изящные грамотрицательные палочки;
- ~ *Acinetobacter spp.* – короткие грамотрицательные палочки, иногда в форме коккобактерий;
- ~ *Candida spp.* – крупные овальные или вытянутые сигарообразные почкующиеся клетки, в т. ч. формирующие псевдомицелий;
- ~ *Cryptococcus spp.* – почкующиеся клетки с характерным и относительно широким участком неокрашенной капсулы.

Несмотря на ориентировочный характер микроскопии мокроты, существует группа патогенов, для которых этот способ обнаружения имеет решающее значение. К таким патогенам вследствие сложности культивирования отнесены возбудители актиномикоза, аспергиллеза, пенициллиноза, кокцидиоза, гистоплазмоза, пневмоцистной пневмонии.

к сведению

При микроскопии в препарате мокроты также могут быть обнаружены элементы паразитов (личинки *Strongiloides stercoralis*, *Ascaris lumbricoides*, яйца *Paragonimus westermanii*, крючья *Echinococcus granulosus*). Специалисты-микробиологи, как правило, не владеют навыками распознавания паразитарных объектов (общеклинический анализ мокроты проводят в клинко-диагностической лаборатории), однако знание об их существовании как потенциального источника внутрилабораторного заражения (*Strongiloides stercoralis*, *Echinococcus granulosus*) будет способствовать строгому выполнению санитарно-противоэпидемического режима [16]. При обнаружении объектов, подозрительных на элементы паразитов, необходимо отправить препарат на консультацию в паразитологический или клинический отдел лаборатории.

Необходимо помнить, что плесневые грибы, в том числе *Aspergillus spp.* и *Penicillium spp.*, – обитатели внешней среды; следовательно, при микроскопии обнаружение подозрительных элементов диктует необходимость исключения контаминации.

При выписке результата в ответе указывают описательную формулировку, например: «при микроскопии мокроты обнаружен несептированный мицелий предположительно

плесневых грибов», «при микроскопии материала обнаружены конидиеносцы (элементы) плесневых грибов».

Микроскопию мочи рекомендуют проводить пациентам ОРИТ урологического профиля с целью подтверждения бактериурии, а также оценки грамположительной или грамотрицательной принадлежности микрофлоры, что является определяющим при назначении антимикробных препаратов.

Присланный для бактериологического исследования образец мочи после посева на питательные среды подвергают центрифугированию при 1500 об/мин в течение 3–5 мин. Микроскопическому исследованию подлежит осадок мочи, из которого после удаления надосадочной жидкости готовят препарат для микроскопии. После высушивания и фиксации мазка в стандартном режиме предпочтение отдают методу окраски по Граму.

В ответе указывают форму обнаруженных в препарате структур: кокки, палочки, коккобактерии – и их принадлежность к окраске по Граму: грамположительные, грамотрицательные.

В зависимости от профиля обслуживаемых подразделений чаще в образцах мочи у пациентов ОРИТ при микроскопии можно визуализировать представителей *Enterobacteriaceae* sp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp. (*Stenotrophomonas* spp.), *Acinetobacter* spp., *Candida* spp. Кроме перечисленных выше микроорганизмов, в моче у детей ОРИТ также обнаруживают *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus* spp.

Микрофлора полости рта – поликомпонентна, она насчитывает не менее 400 видов бактерий. Достаточное количество публикаций свидетельствует о том, что культуральным методом можно выявить лишь от 3 до 5% их числа [2]. Микроскопия слюны, по мнению авторов, актуальна у пациентов с гингивитом [17]. Установлено, что при использовании подсчета числа бактерий в слюне метод световой микроскопии с использованием универсальных клеточных красителей и слайд-планшетов позволит установить изменения в микробном пейзаже. Так, у пациентов с патологией полости рта общее содержание бактерий в слюне почти в 10 раз выше, чем у здоровых ($0,9 \times 10^7$ против $2,9 \times 10^6$) с существенным преобладанием (в 30 раз) грамотрицательных видов, что служит неблагоприятным фактором и показателем дисбиоза [5]. При этом у больных гингивитом

соотношение грамположительных и грамотрицательных форм составляет 1 : 4 и свидетельствует о существенном увеличении в организме пациента числа условно-патогенных бактерий, обладающих высоким повреждающим потенциалом благодаря присутствию эндотоксина (липополисахарида).

При микроскопии стерильного материала (ликвор, пунтаты, экссудаты и пр.) обнаружение микробных структур станет начальным этапом выявления и идентификации возбудителя [15]. При этом обычно инфекцию вызывает один возбудитель, реже – ассоциация.

Для микроскопии, как и в случае с мочой, используют материал, присланный для бактериологического исследования. Исключение составляет кровь, которую доставляют в транспортной среде (для первичной микроскопии такой образец не пригоден). Мазки готовят из остатков пробы после посева на питательные среды. Метод окраски – по Граму.

Отдельно должны быть рассмотрены случаи, когда при первичной микроскопии биологических материалов обнаруживают микроорганизмы, но не получают их рост на питательных средах. Возможные причины:

- ~ нарушение сроков доставки или условий транспортировки материала (охлаждение, перегревание);
- ~ низкое качество транспортных систем;
- ~ влияние антимикробной терапии;
- ~ низкое качество питательных сред для первичного посева;
- ~ биологические особенности микроорганизмов (трудно культивируемые, некультивируемые формы).

Метод микроскопии содержимого толстой кишки, по мнению ученых, привлекателен при изучении такого явления, как способ существования микроорганизмов в кишечной биопленке [6], и может быть использован у пациентов проктологического профиля. При этом сама биопроба не является непосредственным объектом исследования. Сначала из нее формируют вторичную субстанцию (ВС), которая существенно отличается по своему составу и агрегатному состоянию от исходного вещества. Преобразование исходного вещества в ВС представляет собой выполнение ряда специфических для лабораторного анализа последовательных операций: пе-

ремешивание, дозирование, фракционирование, химическую трансформацию, изменение агрегатного состояния. Заключительная операция состоит в приготовлении мазков-препаратов из двух фракций ВС: надосадочной жидкости и осадка по методу Виноградского – Шульгиной – Бреда. Метод позволяет осуществить количественный учет микрофлоры [3]. Изучение морфологических свойств бактерий в препарате предусматривает использование нескольких вариантов окрашивания.

Система окраски по Граму дает возможность отдельно учитывать количество морфотипов грамотрицательных бактерий. Среди них могут быть идентифицированы палочки, вибрионы, изогнутые, извитые, риккетсиоподобные, кокковидные, округлые одиночно расположенные клетки (типа вейлонелл), кокковидные формы, а также некоторые грибы, в первую очередь *Candida*. Грамположительные бактерии, определяемые в препарате, могут быть отнесены к морфотипам кокков (стафилококков, стрептококков, диплококков), палочек (изогнутых бактерий, бацилл, в т. ч. клостридий, бифидобактерий, актиномицетов, нокардиоподобных, коринеформных и др.) или грибов.

По методу Шеффера – Фултона анализируют споровые формы. По завершении процесса окрашивания с использованием водного раствора малахитового зеленого и сафранина эндоспоры приобретают ярко-зеленый цвет, а вегетативные клетки – красный (красно-коричневый).

Окраска по способу Омлянского позволит обнаружить микроорганизмы с метакроматическими волютиновыми гранулами (зернами), образуемыми за счет накопления полифосфатов. У бактерий, включая актиномицеты, гранулы волютина локализованы в цитоплазме, у дрожжей и грибов, в т. ч. дрожжевых, – в вакуолях. Волютина, как правило, больше в молодых клетках. Метод основан на плохой растворимости волютина в растворах кислот. При правильном окрашивании зерна волютина имеют красный цвет и хорошо видны на фоне синей цитоплазмы.

Способ выявления кислотоустойчивости по Цилю – Нильсену используют при обнаружении некоторых видов актиномицет. Это свойство связано с особенностями химического состава клеточной оболочки, главным образом с наличием миколовых кислот.

Комбинированный вариант микроскопического и культурального метода исследования

Перспективна и заслуживает внимания специалистов комбинация микроскопии и культурального метода, которая позволит по сравнению с традиционной микроскопией получить жизнеспособные формы бактерий, по сравнению с культуральными методами – существенно сократить сроки и стоимость анализа.

Мы разработали метод, позволяющий визуализировать изогнутые палочки, морфологически сходные с *Helicobacter pylori*, выращенные на модифицированной агаризованной полужидкой питательной среде для контроля стерильности (СКС) [18]. После помещения в СКС биоптата слизистой оболочки желудка и последующей инкубации при температуре 35 °С в течение 48 ч в случае видимого роста микрофлоры (формирование тяжей вдоль столбика агаризованной среды, придонный рост) из питательного субстрата на стекле готовили препарат для микроскопии и окрашивали по Граму. Чувствительность теста при обследовании 102 пациентов с гастродуоденальной патологией составила 100%, специфичность – 88,9%. Результаты оценки специфичности и чувствительности определения антител методом ИФА в этой же группе пациентов составили 52,5 и 82,3% соответственно, данные цитологического исследования – 57,5 и 79%, иммунохроматографического теста для обнаружения антигена НР в кале – 50 и 100%, уреазного экспресс-теста – 85 и 84%.

Комбинированный метод «подращивания» и микроскопии нашел широкое применение в диагностике трихомонадной инфекции [12]. Вагинальный секрет, отделяемое уретры или мочу в определенной пропорции помещают в готовую жидкую питательную среду, трихомонадный бульон с селективными добавками и индикатором (пропись селективных добавок зависит от фирмы-производителя). После инкубации в стандартном режиме (35 °С в течение 48 ч) при наличии осадка в бульоне и изменении его цвета проводят микроскопию осадочной жидкости (без окрашивания) с целью обнаружения ядерных форм с вакуолизированной цитоплазмой и жгутиками, морфологически сходными с трихомонадами.

Компьютерные технологии, активно используемые в микроскопии, отвечают современным требованиям науки и доказательной медицины. Объективная регистрация изображения, возможность его программного анализа, архивирование резуль-

татов, обеспечение возможностей телемедицины, получение новой информации делают компьютерную микроскопию (в т. ч. микроскопию биоматериала) актуальной темой, заслуживающей внимания специалистов в области клинической микробиологии.

Метод световой микроскопии и его комбинация с культуральным методом, вне всякого сомнения, должен найти свою достойную нишу в бактериологии. Развитие передовых технологий позволит сократить рабочее время специалистов-бактериологов за счет автоматизации рутинных процессов, что приведет к активному внедрению в современный технологический бактериологический поток этого возрождающегося перспективного направления.

Список использованной литературы

1. Боронина Л.Г., Саматова Е.В., Блинова С.М. и др. Этиологическая значимость микроскопического исследования мокроты у детей с острой и хронической бронхолегочной патологией // Вестник Уральской медицинской академической науки. 2011. № 3. С. 84–88.
2. Данилевский Н.Ф., Борисенко А.В. Заболевания пародонта. Киев: Здоровье. 2000. 461 с.
3. Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. М.: МГУ, 1976. С. 63–70; 129–135.
4. Золотарев А.Г., Пименов Е.В., Дервишов Д.А. Световая микроскопия микроорганизмов. М.: ООО «Агровет», 2013. 288 с.
5. Левицкий А.П., Анищукова О.И., Гончарук С.В. и др. Результаты бактериоскопии слюны у больных гингивитом // Вестник стоматологии. 2011. № 3. С. 32–34.
6. Лягина А.И., Корнева Т.К. Прямая бактериоскопия субстратов как экспресс-метод идентификации микрофлоры у проктологических больных // Колопроктология. 2005. № 3. С. 8–11.
7. Миронова И.И., Долгов В.В., Романова Л.А. Атлас. Общеклинические исследования: моча, кал, ликвор, мокрота. М.: Триада, 2012. 420 с.
8. Методические рекомендации. МР 4.2.0114-16 «Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии».
9. Методические указания. МУК 4.2.1887-04 «Лабораторная диагностика менингококковой инфекции и гнойных бактериальных менингитов».
10. Методические указания. МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

11. Методические указания. МУК 4.2.3115-13 «Лабораторная диагностика внебольничных пневмоний».
12. Приказ Минздрава Республики Беларусь от 20.05.2009 № 484 «Об утверждении инструкции по лабораторной диагностике трихомонадной инфекции».
13. Приказ Минздрава России от 21.02.2000 № 64 «Об утверждении номенклатуры клинических лабораторных исследований».
14. Приказ Минздрава России от 21.03.2003 № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации».
15. Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».
16. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней (с дополнениями)».
17. Ханс-Петер Мюллер. Пародонтология / Под ред. А.М. Поитун. Львов: ГалДент, 2004. 256 с.
18. Циммерман Я.С., Захарова Ю.А., Ведерников В.Е. Сравнительная оценка диагностических тестов определения *Helicobacter pylori* и спектр мукозной микрофлоры желудка при гастрите и язвенной болезни // Клиническая медицина. 2013. № 4. С. 42–48.
19. Baron E. J., Miller J.M., Weinstein M.P. et al. A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 Recommendations by the infectious diseases society of America (IDSA) and the American society for microbiology (ASM) // Clin. Infect. diseases. 2013. Vol. 57. P. 22–121.
20. European manual of clinical microbiology – 1st edition / editors G. Cornaglia, R. Courcoul, J.L. Herrmann, G. Kahlmeter et al. 2012. 461 p.
21. Manual of clinical microbiology – 11th edition / editors J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, K.C. Carroll et al. 2015. 2900 p.

Исследование видового состава микрофлоры кишечника у детей в возрасте до трех лет

И.А. Касьян

научный сотрудник,

А.С. Абдрашитова

канд. биол. наук, научный сотрудник,

Е.А. Билько

канд. биол. наук, научный сотрудник,

Ж.А. Касьян

младший научный сотрудник,

Д.А. Ситмбетов

канд. мед. наук, младший научный сотрудник,

А.В. Казанцев

младший научный сотрудник

ФеКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Саратов

*Выполнено исследование видового состава микрофлоры кишечника детей в возрасте до 3 лет. Проведена идентификация выделенных культур микроорганизмов и изучено их распределение в зависимости от возраста ребенка. Выявлено снижение количества облигатной микрофлоры (бифидо- и лактобактерий) более чем в 99% случаев. Определены наиболее часто встречающиеся условно-патогенные микроорганизмы: *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus*, гемолитические *E. coli*, а также их ассоциации.*

В последние годы отмечено повышение интереса к изучению микрофлоры кишечника человека, особенно у детей раннего возраста.

Доказана роль кишечной микрофлоры, приобретенной на ранних этапах жизни, в становлении и развитии иммунной системы ребенка, поддержании ее активности и системной стимуляции иммунитета [3].

к сведению

Кроме того, кишечная микрофлора – крайне важный симбионт для роста и развития организма; она выполняет ряд функций, которые определяют общее физиологическое состояние человека: осуществляет неспецифическую защиту от бактерий, вызывающих кишечные инфекции, сдерживает их рост и препятствует проникновению условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) в другие органы, участвует в процессах метаболизма белков, жиров, углеводов, газов, водно-электролитном обмене, синтезе витаминов и ферментов. Имеются сведения о роли бифидобактерий в снижении риска канцерогенеза и формировании нормальной структуры слизистой оболочки кишечника [2, 3].

Формирование микрофлоры кишечника у человека начинается с момента прохождения новорожденного из стерильных внутриутробных условий через родовые пути, где осуществляется первичная микробная контаминация микрофлорой влагалища матери.

Следующие несколько дней после рождения характеризуются наиболее активным заселением кишечника ребенка микроорганизмами из окружающей среды. Их видовой состав полностью зависит от окружения ребенка, а также факторов внешней среды.

В более позднем периоде (от первых месяцев до года) происходит стабилизация состава кишечной флоры детей и приближение количественных показателей к нормам взрослых [1, 4].

Однако существует множество причин, неблагоприятных для становления нормального микробиоценоза кишечника ребенка. Родоразрешение при помощи кесарева сечения, отсутствие молока у матери или позднее прикладывание к груди, назначение лекарственных препаратов младенцу в первые дни жизни и другие факторы способствуют нарушению процесса заселения кишечника облигатными микробами (бифидо-, лактобактериями и бактероидами) и увеличивают

вероятность колонизации кишечника УПМ, их преобладанию над первыми [2, 3].

Таким образом, учитывая влияние микробиоценоза кишечника на общее состояние организма человека, нами был проведен анализ состава микрофлоры кишечника детей до 3 лет с различными заболеваниями, проживающих на территории Саратовской области.

Материалом для анализа служили образцы фекалий, полученные после естественной дефекации, собранные в стерильный контейнер и доставленные на исследование не позднее 2 ч после отбора. Всего было исследовано 1294 пробы, полученные от детей в возрасте от 1 нед. до 3 лет (табл. 1). В исследование были включены пациенты с различными симптомами и заболеваниями: дерматиты, нарушение сна, повышенная возбудимость, диспептические расстройства, метеоризм и др.

Таблица 1

Количество проб, исследованных у детей разных возрастных групп

Всего исследованных проб	Возраст детей, лет		
	0–1	1–2	2–3
1294	867	291	136

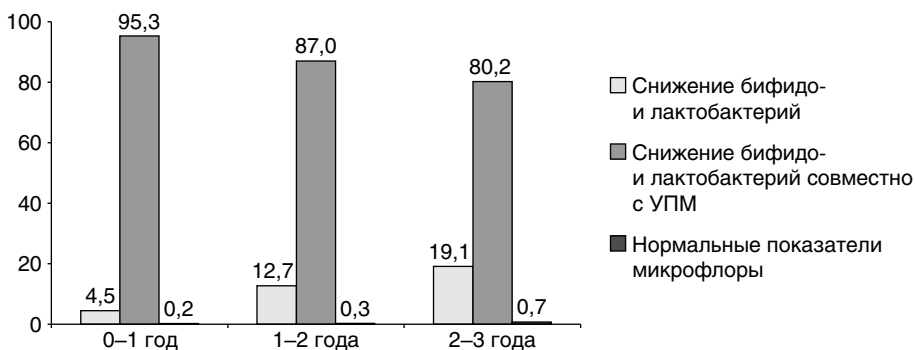
Для бактериологического анализа использовали готовые питательные и дифференциально-диагностические среды, зарегистрированные в установленном порядке и прошедшие внутрилабораторный контроль качества. Изолированные культуры микроорганизмов идентифицировали по широкому спектру свойств: тинкториальные свойства в окрашенных мазках, биохимические свойства с использованием микротест-систем API (BioMerieux, Франция) и автоматизированных микробиологических систем – Vitek 2 Compact, Biomic V3. Кроме того, идентификацию осуществляли методом масс-спектрометрии на автоматическом анализаторе MALDI Biotyper (Bruker, Германия).

Степень микробиологических нарушений содержимого толстой кишки определяли согласно действующему отраслевому стандарту «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» [5].

В результате анализа полученных данных было установлено, что более чем в 99% случаев у обследованных детей всех

возрастных групп наблюдалось снижение содержания бифидо- и лактобактерий (в 99,8% случаев у детей в возрасте от 0 до 1 года, в 99,7% – от 1 года до 2 лет и в 99,3% – от 2 до 3 лет). При этом более чем у 80% обследованных наряду со снижением количества облигатных микроорганизмов было выявлено увеличение количества условно-патогенной микрофлоры. Отсутствие изменений качественного и количественного состава микрофлоры отмечено менее чем в 1% случаев общего числа обследованных вне зависимости от возраста.

Как показало исследование, количественные изменения состава кишечной микрофлоры отличаются в разных возрастных группах детей. Так, у детей от 0 до 1 года снижение количества лакто- и бифидобактерий без выявления УПМ отмечали в 4,5%, в возрастной группе от 1 года до 2 лет – в 12,7%, у детей от 2 до 3 лет – в 19,1% случаев. Снижение содержания лакто- и бифидобактерий в ассоциации с УПМ в возрастной группе от 0 до 1 года отмечено в 95,3% случаев, у детей в возрасте от 1 года до 2 лет – в 87%, в возрасте от 2 до 3 лет – в 80,2%. В старшей возрастной группе выявлено незначительное увеличение числа детей, у которых качественный и количественный состав микрофлоры соответствовал нормальным показателям: от 0,2 и 0,3% для возрастных групп от 0 до 1 года и от 1 года до 2 лет соответственно до 0,7% – для детей от 2 до 3 лет (рисунок).



Выявленные нарушения количественного состава микрофлоры кишечника у детей в зависимости от возраста пациентов в процентах от числа обследованных

На следующем этапе исследования мы оценили качественный состав микрофлоры кишечника детей разных возрастных групп (табл. 2).

Таблица 2

**Результаты исследования микрофлоры кишечника у детей до 3 лет,
% от общего числа проб**

Возрастные группы, лет	Снижение бифидо- и лактобактерий	Снижение количества бифидо- и лактобактерий с выявлением УПМ							Без нарушений состава микрофлоры
		<i>Klebsiella spp.</i> и <i>S. aureus</i>	Гемолитические <i>E. coli</i> и <i>S. aureus</i>	Гемолитические <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> <i>spp.</i> и <i>S. aureus</i>	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>S. aureus</i>	Гемолитические <i>E. coli</i>	Другие УПМ в сумме	
0–1	4,5	15,9	6,2	10,1	16,1	11,6	9,0	26,4	0,2
1–2	12,7	11,4	5,8	7,2	15,5	10,4	8,9	27,8	0,3
2–3	19,1	6,9	5,1	5,1	14,7	5,9	8,1	34,4	0,7

Установлено, что доминирующими УПМ, обнаруживаемыми у детей первого года жизни, являются клебсиеллы (как правило, *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*) и золотистый стафилококк (*S. aureus*). Причем названные бактерии были выделены у обследованных как в виде монокультур (в 16,1 и 11,6% случаев соответственно), так и в ассоциации (15,9%). Гемолитические *E. coli* выделялись реже (в 9% случаев) и, что характерно, часто совместно со *S. aureus* и *Klebsiella spp.* (10,1%). В 6,2% случаев отмечено совместное выделение только гемолитических *E. coli* и *S. aureus*.

Оценку достоверности изменения состава микрофлоры у детей различных возрастных групп проводили на основании критерия Стьюдента.

Анализ полученных данных показал, что у детей старших возрастных групп достоверно снижается частота обнаружения *S. aureus* ($p < 0,05$).

В группе детей в возрасте от 2 до 3 лет выявлено достоверное снижение в сравнении с детьми до года выделения ассоциаций *Klebsiella spp.* и *S. aureus* ($p < 0,05$), а также ассоциаций *Klebsiella spp.*, *S. aureus* и гемолитические *E. coli* ($p < 0,05$).

Однако, несмотря на уменьшение содержания условно-патогенных микроорганизмов, в старшей возрастной группе детей по сравнению с группой детей до 1 года отмечено достоверное увеличение случаев снижения содержания облигатной микрофлоры ($p < 0,05$).

Помимо вышеназванных бактерий во всех возрастных группах реже выявляли и других представителей семейства *Enterobacteriaceae*: микроорганизмы родов *Citrobacter* (*C. amalonaticus*, *C. braakii*, *C. farmeri*, *C. freundii*, *C. koseri*, *C. youngae*), *Proteus* (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. penneri*), *Morganella* (*Morganella morganii*), *Enterobacter* (*E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. kobei*, *E. ludwigii*), *Serratia* (*S. marcescens*, *S. odorifera*), *Raoultella* (*Raoultella ornithinolytica*), а также грибы рода *Candida* (чаще *C. albicans*). Данные микроорганизмы в сумме обнаружены в 26,4% случаев у детей в возрасте от 0 до 1 года, в 27,8% – от 1 до 2 лет и в 34,4% – от 2 до 3 лет. В среднем частота выявления каждого из 17 видов представителей семейства *Enterobacteriaceae* составила 1,5–2,0% от общего количества обнаруженных условно-патогенных энтеробактерий.

На основании проведенных микробиологических исследований установлено, что у обследованных детей в возрасте до 3 лет с различными заболеваниями нарушение микробиоценоза толстого кишечника выражено в снижении содержания количества облигатной микрофлоры (бифидо- и лактобактерий), в т. ч. на фоне выявления условно-патогенных микроорганизмов. Наиболее часто были выявлены *Klebsiella spp.*, гемолитические *E. coli*, *S. aureus* и их ассоциации.

Список использованной литературы

1. Алешкин В.А., Галимзянов Х.М., Афанасьев С.С., Караулов А.В. и др. Нарушения микробиоценозов у детей: многоцентровое исследование. Сообщение III. Микробиоценоз и дисбактериоз кишечника // Астраханский медицинский журнал. 2011. № 2. С. 124–128.
2. Джурубаяева С.В., Иноятова Ш.Ш. Патогенетические аспекты дисбиоза кишечника у детей // Современные инновации. 2016. № 3. С. 61–64.
3. Ильенко Л.И., Холодова И.Н. Дисбактериоз кишечника у детей // Лечебное дело. 2008. № 2. С. 3–13.
4. Сабельникова Е.А. Клинические аспекты дисбактериоза кишечника // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2011. № 3. С. 111–116.
5. ОСТ 91500.11.0004-2003. «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника».



Особенности микробиологической диагностики инфекций нижних дыхательных путей у больных муковисцидозом

С.В. Поликарпова

канд. мед. наук, заведующая бактериологической лабораторией,

С.В. Жилина

канд. мед. наук, врач-бактериолог,

Н.В. Пивкина

врач-бактериолог,

О.Г. Тимофеева

врач-бактериолог

ГБУЗ «Городская клиническая больница № 15 им. О.М. Филатова
Департамента здравоохранения города Москвы»

По результатам многолетних исследований, проводимых в бактериологической лаборатории ГКБ № 15 им. О.М. Филатова г. Москвы с 1995 года, сформулированы основные положения и выделены наиболее важные аспекты микробиологической диагностики легочных инфекций у больных муковисцидозом. Анализируя данные литературы, авторы подчеркивают значимость точной и своевременной идентификации ведущих патогенов и определения их чувствительности к антибактериальным препаратам для своевременного назначения адекватной антибактериальной терапии, надлежащего микробиологического мониторинга и профилактики эпидемического распространения возбудителей инфекций среди больных муковисцидозом.

Муковисцидоз (МВ) – частое моногенное заболевание, обусловленное мутацией гена трансмембранного регулятора МВ. Характеризуется поражением экзокринных желез, имеет тяжелое

течение и негативный прогноз [4]. Генетически обусловленная дегидратация бронхиального секрета провоцирует легочную обструкцию, на фоне которой развивается хроническая легочная инфекция. Поражение легких при МВ по-прежнему остается основной причиной смертности больных. С рождения больные МВ предрасположены к развитию бактериальной инфекции дыхательных путей. Прогноз заболевания в большой степени определяется течением хронической бронхолегочной инфекции и сопутствующим ей воспалительным процессом.

Одним из ведущих факторов, определяющих продолжительность жизни при МВ, является этиология хронической легочной инфекции [12, 13, 21].

к сведению

В раннем возрасте инфекцию наиболее часто вызывает *Staphylococcus aureus*, затем присоединяются *Haemophilus influenzae* и *Pseudomonas aeruginosa* [5]. Все большее клиническое значение приобретают неферментирующие глюкозу грамотрицательные бактерии (НГОб) *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* и др., а также нетуберкулезные *Mycobacterium* spp. [8]. У больных МВ часто выделяются *Candida* spp. Вирулентные свойства и патогенность *Aspergillus fumigatus* у больных МВ достоверно доказаны [19]. Обсуждается клиническое значение анаэробных бактерий [19].

Прогноз скорости дегенерации дыхательной функции у больных МВ также зависит от этиологии хронической легочной инфекции [16, 17, 20, 22]. Инфекция, обусловленная *B. cepacia*, является фактором неблагоприятного прогноза и увеличивает вероятность летального исхода. В настоящее время к виду *B. cepacia* принадлежат 20 различных геномных видов, которые объединены в группу *B. cepacia* complex [16, 19, 23].

Программа по увеличению продолжительности жизни больных МВ включает трансплантацию легких. Наличие инфекции *B. cepacia* до последнего времени было противопоказанием к трансплантации легких [20, 23].

Точная и своевременная идентификация возбудителей инфекции дыхательных путей и определение их чувствительности к антибактериальным препаратам играют ключевую роль в обеспечении своевременного начала лечения, надлежащего

микробиологического мониторинга и профилактики эпидемического распространения патогенов среди больных МВ [11, 12].

Микробиологическая диагностика инфекций нижних дыхательных путей

Микробиологическое исследование при инфекциях нижних дыхательных путей (ИНДП) у больных МВ имеет ряд принципиально важных особенностей. Бактериологический контроль должен проводиться регулярно, не реже 1 раза в 3 месяца, для раннего обнаружения начальной колонизации *P. aeruginosa* и *B. ceracia complex* [18].

Длительность инкубации первичного посева необходимо удлинять до 5–7 сут с ежедневным просмотром и изучением новых видов колоний из-за возможного наличия в отделяемом бронхиального секрета медленно растущих НГОБ.

Важным является использование селективных сред для выделения требовательных микробов или их специфических, связанных с МВ, морфологических разновидностей.

внимание!

Это особенно актуально для *B. ceracia complex*, а также для штаммов *S. aureus*, обладающих фенотипом мелких колоний.

Идентификация микроорганизмов с использованием готовых наборов реагентов может потребовать пролонгированного периода инкубации (до 48 ч). Готовые наборы реагентов для идентификации микроорганизмов представляют собой полистироловые планшеты (панели, карты) с сухими дифференцирующими средами или субстратами. Основаны на модифицированных классических методах, включающих в себя ферментацию, окисление, деградацию и гидролиз хромогенных или флуорогенных субстратов, нанесенных в реакционные лунки. Одновременно используются 2 метода идентификации – флуориметрический и колориметрический. Комбинация биохимических и ферментативных реакций в каждой лунке после жизнедеятельности микроорганизмов позволяет делать заключение о видовой специфичности анализируемого штамма микроорганизма.

Следует учитывать, что первичная идентификация *B. ceracia* complex, *Ralstonia spp.*, *Pandorea spp.* и *Cupriavidus spp.*, выполненная с использованием готовых наборов реагентов для биохимической идентификации микроорганизмов, должна быть подтверждена одним из следующих методов: масс-спектрометрией белков изучаемого штамма (MALDI-TOF MS) или обнаружением ДНК микроорганизма (полимеразная цепная реакция, ПЦР). Выбор метода определения чувствительности микроба к антибиотикам зависит от морфологических особенностей изолята. Например, для определения чувствительности слизистых разновидностей (мукоидных штаммов) *P. aeruginosa* рекомендуется использовать диско-диффузионный метод. Изучение чувствительности необходимо проводить для каждого морфотипа каждого вида микроорганизмов. Если у пациента предполагается применять ингаляционные формы антимикробных препаратов (АМП), требуется определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) в значениях, превышающих величины референтных концентраций, достижимых в плазме крови.

Предпочтение следует отдавать исследованию свободно отделяемой мокроты, в других случаях возможно исследовать мазок из глубоких отделов задней стенки глотки. Также допустимо исследовать индуцированную мокроту. Сбор бронхоальвеолярного лаважа применяется редко ввиду инвазивности процедуры бронхоскопии [18].

Учитывая наличие хронической бактериальной колонизации дыхательных путей, микроскопическое исследование образцов мокроты при МВ нецелесообразно.

внимание!

Однако при необходимости его выполняют общепринятым способом. Даже если респираторный образец плохого качества (более 25 эпителиальных клеток, менее 10 лейкоцитов), он в любом случае подлежит микробиологическому исследованию. Лицу, направившему биоматериал, сообщают о некачественном образце. Информирова об отсутствии роста, обязательно указывают на необходимость исследовать новый образец [19, 23].

Основным микробиологическим методом диагностики ИНДП при МВ является культуральный метод с использованием селективных и не-селективных питательных сред.

к сведению

Для общей оценки всей выросшей бактериальной микрофлоры рекомендуется посев на питательный агар с добавлением 5% крови (колумбийский, триптиказо-соевый агар или основу для кровяного агара). Для выделения *S. aureus*, *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* и других НГОБ, дрожжеподобных грибов, *H. influenzae* и прочих микроорганизмов выполняют посев на селективные питательные среды: желточно-солевой агар (манитол-солевой) для выделения *S. aureus*, для изоляции мельчайших колоний *S. aureus* рекомендуется проводить посев на агар Шедлера. Для представителей семейства *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* и других НГОБ следует использовать среду Эндо или Мак-Конки. Для изоляции бактерий группы *B. ceracia* complex необходим селективный агар для *B. ceracia*: *B. ceracia* агар (Oxoid), BCSA (BioMerieux) или *B. ceracia* селективный агар (Himedia). Для дрожжеподобных и плесневых грибов используют агар Сабуро, шоколадный агар и 5% кровяной агар с налидиксовой кислотой для *S. pneumonia* [18, 19, 23].

Применение **количественного метода** посева образцов бронхиального секрета может облегчить выделение различных видов микроорганизмов и отдельных морфотипов в пределах одного вида.

Мокроту гомогенизируют (муколитиком, стеклянными бусами, растиранием в ступке с кварцевым песком), готовят взвесь с физиологическим раствором, питательным бульоном, пептонной водой в соотношении 1 : 9, а затем делают серийные разведения до 10^{-5} .

Мазки из глубоких отделов задней стенки глотки суспендируют в 1 мл бульона (физиологического раствора), условно принимая за разведение 1 : 9, готовят серийные разведения [10]. В этом случае количественный результат будет ориентировочным [19].

Из разведения мокроты 10^{-2} по 20 мкл засевают на вышеперечисленные питательные среды. Посевы на шоколадном агаре и агаре Шедлера инкубируют в атмосфере с 5–10%

CO₂, остальные – в обычной атмосфере при 35–37 °С. Посевы просматривают ежедневно, продолжительность инкубации составляет не менее 5 дней. Посевы на агаре Сабуро инкубируют 7 дней при 30–35 °С. Просмотр – ежедневно.

Идентификация и определение чувствительности к антибиотикам

S. aureus

Типичные штаммы *S. aureus* при МВ изучают общепринятыми методами. Определяют пигмент, лецитиназу, плазмокоагулазу, ДНК-азу, хлопьеобразование, ферментацию и окисление маннита, фосфатазу. Атипичные штаммы характеризуются медленным ростом (48 ч), отсутствием гемолиза и характерного пигмента. Могут быть лецитиназа-отрицательными, не ферментировать маннит [12]. Для установления коагулазной активности рекомендуется использовать увеличенную посевную дозу. Характерным для МВ морфологическим типом является вариант малых колоний – *S. aureus* SCV (*S. aureus* small-colony variant) [17]. Для выделения атипичных штаммов SCV рекомендуют культивировать их на агаре Шедлера в CO₂ атмосфере в течение 48–72 ч. На других питательных средах эта форма *S. aureus* может не давать роста.

Чувствительность всех выделенных микроорганизмов к АМП рекомендуется определять в соответствии с клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (2015), которые основаны на критериях Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST) [7].

Чувствительность к АМП у типичных штаммов тестируют на агаре Мюллера – Хинтона. Для тестирования *S. aureus* SCV рекомендуется использовать колумбийский агар с добавлением 5% крови, поскольку субкультивирование культуры *S. aureus* SCV на агаре Мюллера – Хинтона не дает видимого роста.

Рекомендуемые АМП для определения чувствительности: гентамицин, рифампицин, цефтаролин, цефокситин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, триметаприм/сульфаме-

токсазол, ванкомицин, тигециклин, клиндамицин, эритромицин, тетрациклин.

В связи с ростом распространенности метициллин-резистентных *S. aureus* (MRSA) следует определять метициллин-чувствительность. Для всех MRSA рекомендуется определение лейкоцидина Пентона – Валентайна.

Этиологическую значимость *S. aureus* в мокроте, учитывая его комменсализм, оценивают, сопоставляя лабораторные данные с клиническими критериями (например, обострение хронической ИНДП).

В случае клинических признаков обострения нет нижнего порога количества КОЕ для определения этиологической значимости.

к сведению

P. aeruginosa

Наряду с характерными по морфологии колониями *P. aeruginosa* у пациентов с МВ выделяют и другие морфотипы: мукоидные колонии (мягкие, очень слизистые) и карликовые (SCV). Типичные колонии легко идентифицировать по первичным признакам: плоские, с зазубренными краями, металлическим блеском, пигментом и характерным цветочным запахом. Все штаммы имеют фермент цитохромоксидазу (оксидазоположительные), вырабатывают аргинин (аргинин-положительные). Изучение дополнительных биохимических свойств для идентификации не требуется. Использование готовых наборов реагентов для идентификации как в ручном режиме, так и для считывания в анализаторе представляется нецелесообразным [23]. Мукоидные морфотипы *P. aeruginosa* могут расти медленно (до 3–5 сут), быть малоподвижными и потерять способность вырабатывать пигмент. Все штаммы от больных МВ, в т. ч. штаммы с нормальным фенотипом, могут проявлять замедленную оксидазную реакцию. Присутствие мукоидных форм *P. aeruginosa* должно быть указано в клиническом лабораторном отчете.

Определение чувствительности к АМП необходимо проводить независимо от массивности роста даже для единичных колоний *P. aeruginosa*. Существование различных морфотипов *P. aeruginosa* диктует выбор метода определения чувствительности.

Для типичных штаммов *P. aeruginosa* возможно тестирование диско-диффузным методом, а также методом разведений (в варианте пороговых концентраций), с использованием готовых наборов реагентов для визуального и автоматизированного считывания. Для определения МПК возможно использование теста с градиентом концентраций антибиотика (Е-теста) и готовых наборов для определения МПК.

Готовые наборы реагентов для определения чувствительности к АМП представляют собой полистироловые планшеты (панели, карты), в лунки которых внесены растворы из лиофильно высушенных антибиотиков в бульоне в убывающих концентрациях. Анализ основан на определении бактериального роста при пограничных концентрациях антибиотика или на определении МПК. Использование наборов реагентов для автоматизированного считывания результатов определения чувствительности не подходит для мельчайших медленнорастущих и мукоидных вариантов колоний *P. aeruginosa*. Эти варианты колоний часто проявляют замедленный слабый и недостаточный рост через 24 ч инкубации, когда все анализаторы завершают процесс инкубации панелей с антибиотиками. Поэтому считывание становится невозможным либо осуществляется недостоверно.

Использование готовых наборов реагентов для определения чувствительности, которые возможно инкубировать более 24 ч при недостаточном росте через сутки, является более предпочтительным.

к сведению

Также на достоверность определения чувствительности влияет большое количество слизи (альгината, экзополисахарида) у мукоидных вариантов *P. aeruginosa*. Наличие слизи приводит к помутнению лунок с антибактериальными препаратами даже при отсутствии бактериального роста и, как следствие, недостоверным результатам определения чувствительности.

Следовательно, для мукоидных и мельчайших штаммов *P. aeruginosa* предпочтительными методами определения чувствительности к АМП являются диско-диффузионный и метод определения МПК в варианте Е-теста.

Рекомендуемые АМП для тестирования чувствительности *P. aeruginosa*: амикацин, гентамицин, нетилмицин, тобрамицин, имипенем, меропенем, цефтазидим, цефепим, цiproфлоксацин, левофлоксацин, тикарциллин/клавуланат, пиперациллин/тазобактам, азтреонам, колистин (полимиксин Е), полимиксин В.

B. cerasia complex

Инфицирование *B. cerasia* при МВ представляет особую опасность. Из-за резистентности к большинству АМП эрадикация возбудителя затруднена, и инфекция переходит из острой фазы в хроническую, что быстро приводит к значительным нарушениям функции легких. У больных МВ *B. cerasia* complex может вызвать т. н. *cerasia*-синдром – жизнеугрожающую некротизирующую пневмонию с септициемией.

При росте на питательных средах быстрорастущие микробы могут маскировать рост медленнорастущих, в частности *B. cerasia* complex.

Для увеличения шансов выделения при первичном посеве необходимо использовать селективные среды для *B. cerasia* complex, ингибирующие рост других микроорганизмов.

внимание!

Для изоляции *B. cerasia* complex при первичном посеве может потребоваться не менее 3 дней инкубации при 30–37 °С в обычной атмосфере. На 5% кровяном или селективном агаре колонии мелкие, мягкие, слегка выпуклые, изредка могут иметь мукоидную консистенцию. На среде Эндо (МакКонки) колонии мельче, гладкие или шероховатые.

Вследствие низкой специфичности селективной среды для *B. cerasia* все бактерии, выросшие на ней, должны быть идентифицированы. Виды *B. cerasia* complex фенотипически очень похожи, что делает их дифференциацию, даже при использовании расширенных панелей биохимических тестов, довольно трудновыполнимой задачей. Многие готовые наборы реагентов для идентификации не могут достоверно определить 20 видов и часто не различают их от таких близкородственных бактерий, как *B. gladioli* и *Ralstonia* spp. В наборах реагентов для идентификации культур за-

ложена возможность определять только группу *B. serasia complex*.

Идентификация до геномного уровня возможна методом определения масс-спектров белков изучаемого штамма, а также молекулярными методами. Однако применение различных методик на основе ПЦР все еще невозможно для практических лабораторий. Нет доступных ПЦР-систем для верификации этой группы бактерий.

Выбор методологии определения чувствительности к АМП у *B. serasia complex* затруднителен, т. к. только метод микроразведений в бульоне Мюллера – Хинтона обеспечивает получение воспроизводимых результатов [7].

к сведению

Метод градиентной диффузии и диско-диффузионный метод не дают воспроизводимых результатов. Поэтому в настоящее время по идеологии EUCAST, на которой базируются клинические рекомендации по определению чувствительности 2015 года, не представляется возможным рекомендовать определение чувствительности бактерий *B. serasia complex* с целью выбора АМП для терапии инфекций, вызванных данным возбудителем.

(Продолжение следует)

Особенности микробиологической диагностики инфекций нижних дыхательных путей у больных муковисцидозом*

С.В. Поликарпова

канд. мед. наук,
заведующая бактериологической лабораторией,

С.В. Жилина

канд. мед. наук,
врач-бактериолог,

Н.В. Пивкина

врач-бактериолог,

О.Г. Тимофеева

врач-бактериолог

ГБУЗ «Городская клиническая больница № 15
им. О.М. Филатова Департамента здравоохранения
города Москвы»

По результатам многолетних исследований, проводимых в бактериологической лаборатории ГКБ № 15 им. О.М. Филатова г. Москвы с 1995 года, сформулированы основные положения и выделены наиболее важные аспекты микробиологической диагностики легочных инфекций у больных муковисцидозом. Анализируя данные литературы, авторы подчеркивают значимость точной и своевременной идентификации ведущих патогенов и определения их чувствительности к антибактериальным препаратам для своевременного назначения адекватной антибактериальной терапии, надлежащего микробиологического мониторинга и профилактики эпидемического распространения возбудителей инфекций среди больных муковисцидозом.

* Окончание. Начало см. «Справочник заведующего КДЛ». 2017. № 1. С. 70–79.

Achromobacter spp.

Представители рода *Achromobacter spp.* способны к длительной персистенции у пациентов с МВ без ухудшения дыхательной функции (за исключением *A. ruhlandii*). Как правило, не происходит передачи штаммов *Achromobacter spp.* от пациента к пациенту.

Представители рода *Achromobacter* являются неспорообразующими мелкими грамотрицательными подвижными палочками. Хорошо растут на простых питательных средах (среда Эндо, МакКонки, 5% кровяной агар) при 30–37 °С в обычной атмосфере [23]. Некоторые штаммы могут расти на селективном агаре для *B. ceracia*. Инкубировать чашки необходимо не менее 48–72 ч, чтобы медленно растущие штаммы стали видимыми на плотных питательных средах. По морфологии колонии мелкие плоские или слегка выпуклые с гладкими краями.

Идентификация с применением готовых наборов реагентов для выявления биохимических свойств позволяет уверенно идентифицировать род *Achromobacter*, но не обеспечивает межвидовую идентификацию [23]. Хорошие результаты получены при использовании MALDI-TOF MS – база данных масс-спектров позволяет разделить *A. xylosoxidans*, *A. ruhlandii*, *A. spanius*.

В клинических рекомендациях 2015 года [7] приведены данные о природной устойчивости неферментирующих грамотрицательных бактерий, в т. ч. *A. xylosoxidans*. Данные о критериях интерпретации результатов определения чувствительности *A. xylosoxidans* не представлены. Штаммы *A. xylosoxidans* проявляют чувствительность только к имипенему, пиперациллину, тикарциллину/клавуланату, цефтазидиму и триметоприму/сульфаметаксазолу. Аминогликозиды, фторхинолоны не проявляют активности в отношении *A. xylosoxidans* [23].

В документах Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and laboratory standards institute, CLSI) даны критерии интерпретации значений МПК для НГОБ, на которые следует ориентироваться при определении чувствительности этих патогенов.

Предпочтительно проводить тестирование Е-тестами, т. к. готовые наборы реагентов для определения МПК не всегда можно использовать из-за слабого и недостаточного роста через 24 ч медленно растущих штаммов *A. xylosoxidans*.

S. maltophilia

У пациентов с МВ *S. maltophilia* вызывает инфекцию или колонизацию нижних дыхательных путей. Данные о роли *S. maltophilia* в снижении дыхательной функции при МВ противоречивы [23, 14].

S. maltophilia – прямые или слегка изогнутые неспорообразующие подвижные грамотрицательные палочки. Строгие аэробы, оптимальная температура роста – 30–35 °С. На кровяном агаре образуют небольшие сероватые, слегка слизистые колонии, на среде Эндо (МакКонки) цвет колоний – от светлорозового до темно-розового в зависимости от времени инкубации. У больных МВ может выделяться атипичный вариант – мелкие колонии с замедленным ростом. *S. maltophilia* относят к оксидаза-отрицательным бактериям, но по данным литературы около 20% штаммов проявляют положительную оксидазную реакцию [23]. Оксидаза-положительные *S. maltophilia* могут быть ошибочно идентифицированы как *B. cepacia*.

Как правило, штаммы *S. maltophilia* хорошо идентифицируются с помощью готовых наборов реагентов.

Серьезную проблему при лечении инфекций, вызванных *S. maltophilia*, представляет природная резистентность этого микроорганизма к антибиотикам, особенно к аминогликозидам и карбапенемам [9].

В настоящее время пограничные значения EUCAST установлены только для триметоприма/сульфаметоксазола, т. к. он является препаратом с наиболее подтвержденной клинической активностью [7].

Другие бактерии

Если при внебольничных пневмониях у пациентов без МВ наиболее частыми этиологическими патогенами являются *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *M. catarrhalis*, то при МВ они играют менее важную роль. Скрининг этих патогенов должен проводиться только в случае обильного роста (более 10⁷ КОЕ/мл). Аналогичный подход рекомендуется применять и к представителям семейства *Enterobacteriaceae*, которые редко выступают этиологическим фактором обострения бронхолегочного процесса при МВ, в частности у взрослых пациентов.

Все выделенные НГОБ должны быть определены до рода и вида с помощью фенотипических методов с использованием готовых наборов реагентов. При невозможности точной идентификации из-за отсутствия некоторых видов бактерий в базе данных наборов необходимо проводить идентификацию методом MALDI-TOF MS. Неточная идентификация выделенных микроорганизмов приводит к неэффективному лечению больных МВ, проблемам при ведении пациентов, ухудшению их психоэмоционального состояния и социальной адаптации.

В случаях идентификации *B. ceracia* complex или сходных с ними по фенотипическим признакам *Ralstonia spp.* и *Pandorea spp.* необходима повторная контрольная идентификация этих культур другими методами (методом определения масс-спектров белков либо определения ДНК) [19, 23].

Роль НГОБ в патогенезе ИНДП у больных МВ, за исключением *P. aeruginosa* и *B. ceracia* complex, не доказана. Пороговое значение для них не определено. В последнее время рассматривается вопрос о клиническом значении выделения представителей рода *Achromobacter* [12, 13, 23].

Дрожжеподобные и плесневые грибы

Микроскопия – быстрый и во многих случаях эффективный способ диагностики дрожжеподобных и плесневых грибов. При микроскопии принципиально важно дифференцировать дрожжевые и мицелиальные возбудители, а среди последних – *Aspergillus spp.* Необходимо помнить, что обязательным условием успешной диагностики является не только микроскопия, но и посев исследуемого биоматериала на среду Сабуро [18].

Грибы рода *Candida*, выявляемые при исследовании мокроты, следует расценивать как признак поверхностной колонизации слизистых оболочек. При интерпретации результатов лабораторных исследований надо помнить, что некоторые виды грибов могут с большей или меньшей вероятностью вызывать инвазивные микозы, чем другие возбудители того же рода. Например, *Aspergillus niger* отличается меньшей патогенностью и значительно реже вызывает аспергиллезную пневмонию, чем *Aspergillus fumigatus* [18, 19, 23]. Поэтому выявление их в мокроте скорее свидетельствует о колонизации, чем об инвазивном микозе легких.

Микобактерии

Из нетуберкулезных микобактерий при МВ наиболее часто встречаются *M. avium-intracellulare complex*, *M. chelonae* и *M. abscessus complex* [18, 19, 23]. Тестирование для выявления нетуберкулезных микобактерий у больных МВ при необходимости должно проводиться в специализированных лабораториях.

Выявленные за 15 лет исследований особенности микробного пейзажа нижних дыхательных путей у больных МВ, а также изученная чувствительность ведущих патогенов к АМП позволили выделить наиболее важные аспекты микробиологической диагностики при МВ.

1. Часто в микробиологических лабораториях не выделяют микробы, которые являются типичными патогенами при МВ (например *B. ceracia complex*, *A. xylosoxidans*), в частности из-за несоблюдения сроков инкубации посевов отделяемого дыхательных путей (до 5–7 сут). В большинстве случаев хроническая инфекция легких вызывается ассоциациями микробов. Менее прихотливые и быстрорастущие микроорганизмы могут камуфлировать рост более прихотливых и медленно растущих видов.

2. Недостаточное использование селективной среды для изоляции *B. ceracia complex* затрудняет детекцию данного патогена в случаях выделения из бронхиального секрета быстрорастущих микроорганизмов в ассоциации с *B. ceracia complex*.

3. Ошибки в диагностике бактериальной инфекции могут быть связаны с атипичными морфотипами патогенов при МВ (например, мукоидные формы *P. aeruginosa*, *S. aureus*, обладающий фенотипом мелких колоний SCV тип). Микроорганизмы одного вида могут демонстрировать несколько морфологических типов одновременно в рамках исследования одного биоматериала. Изменение биохимических свойств бактерий, утрата пигмента, потеря ими подвижности затрудняют рутинную идентификацию таких, казалось бы, простых для идентификации микроорганизмов, как *P. aeruginosa*.

4. Медленный рост многих представителей НГОБ не позволяет проводить идентификацию на автоматизированных микробиологических анализаторах. Программное обеспечение многих анализаторов не рассчитано на инкубацию панелей для идентификации в анализаторе более 24 ч [23].

5. Следует учитывать, что первичная идентификация *B. ceracia complex*, *Ralstonia spp.*, *Pandorea spp.*, *Cupriavidus*

spp., выполненная с использованием наборов реагентов для определения биохимических свойств микроорганизмов, в обязательном порядке должна быть подтверждена методом определения масс-спектров белков изучаемого штамма (MALDI-TOF MS).

6. Природная резистентность к нескольким группам антибактериальных препаратов и активное распространение штаммов с приобретенной резистентностью ставят перед микробиологами задачу определять чувствительность не только категориями «чувствительный – умеренно чувствительный – резистентный», но и МПК, особенно для ингаляционных форм АМП.

7. Выбор метода определения чувствительности микроба зависит от морфологических особенностей изолята. Определение чувствительности необходимо проводить для каждого морфотипа каждого вида выделенных микроорганизмов.

Проанализировав и обобщив многолетний опыт работы с биоматериалами больных МВ, мы подготовили материал для создания современного, научно обоснованного и практически ориентированного методического руководства для бактериологических лабораторий. Создана рабочая группа, объединившая как практических микробиологов, клиницистов, так и представителей организаций, ведущих научную и исследовательскую деятельность в области микробиологической диагностики МВ.

Методические указания позволят обеспечить надлежащее качество лабораторных исследований при ИНДП у больных МВ. Точная и своевременная идентификация ведущих патогенов и определение их чувствительности к антибактериальным препаратам обеспечат своевременное назначение адекватной антибактериальной терапии и профилактику эпидемического распространения возбудителей инфекций среди больных МВ [11, 12].

Список использованной литературы

1. Ашерова И.К., Капранов Н.И. Муковисцидоз – медико-социальная проблема. М., Ярославль: Печатный дом, 2013. 236 с.
2. Ашерова И.К., Капранов Н.И. Современные подходы к диагностике и лечению респираторных инфекций у больных муковисцидозом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014. Т. 16. № 2. С. 100–110.

3. Бойцов А.Г., Васильев О.Д. Неферментирующие бактерии // Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство / Под ред. В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. С. 380–381.
4. Капранов Н.И., Каширская Н.Ю. Муковисцидоз. М.: «Медпрактика-М», 2014. 672 с.
5. Капранов Н.И., Шабалова Л.А., Каширская Н.Ю. и др. Антибиотикотерапия при муковисцидозе у детей // Антибиотики и химиотерапия. 2001. Т. 46. № 2. С. 26–32.
6. Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых. Российское респираторное общество (РРО), Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ). 2014.
7. Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам: клинические рекомендации. 2015.
8. Красовский С.А., Черняк А.В., Никонова В.С. и др. Выживаемость больных муковисцидозом в Московском регионе за период 2003–2012 гг. Сборник тезисов XI национального конгресса «Муковисцидоз детей и взрослых. Взгляд в будущее». 2013. С. 53.
9. Поляк М.С. Антибиотикотерапия. Теория и практика. СПб, 2010. 424 с.
10. Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».
11. Скала Л.З., Нехорошева А.Г., Лукин И.Н. и др. Система регистрации и анализа в работе микробиологических лабораторий // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2000. № 5. С. 36–41.
12. Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р., Шагинян И.А. и др. Алгоритм микробиологической диагностики хронической инфекции легких у больных муковисцидозом // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014. Т. 16. № 4. С. 276–290.
13. Чернуха М.Ю., Шагинян И.А., Капранов Н.И. и др. Микробиология и эпидемиология хронической респираторной инфекции при муковисцидозе (консенсус) // Педиатр. 2016. Т. 7. № 1. С. 80–97.
14. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Неферментирующие грамотрицательные бактерии в этиологии внутрибольничных инфекций: клинические, микробиологические и эпидемиологические осо-

бенности // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2005. Т. 7. № 3. С. 271–285.

15. *Besier S., Smaczny C., von Mallinckrodt C. et al.* Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* smallcolony variants in cystic fibrosis lung disease // *J. Clin. Microbiol.* 2007. Vol. 45. P. 168–172.

16. Cystic fibrosis foundation patient registry: 2005. Annual data report to the center directors. Bethesda, MD: Cystic fibrosis foundation, 2006.

17. *Dodge J.A., Lewis P.A., Stanton M., Wilsher J.* Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947–2003 // *Eur. Respir.* 2007. Vol. 29. P. 522–526.

18. *Baron E.J., Miller J.M., Weinstein M.P. et al.* A guide to utilization of the microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2013 Recommendations by the infectiousdiseases society of America (IDSA) and the American society for microbiology (ASM) // *Clin. Infect. Dis.* 2013. Is. 57. P. 22–121 (downloaded from <http://cid.oxfordjournals.org/> at IDSA member on March 25, 2016).

19. European manual of clinical microbiology – 1st edition / editors Cornaglia G., Courcoul R., Herrmann J.-L., Kahlmeter G., Peigue – Lafeuille H., Vila J. 2012.

20. *Flume P.A., O'Sullivan B.P., Robinson K.A., et al.* Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health // *Am. J. Respir Crit. Care Med.* 2007. Vol. 176. P. 957–969.

21. *Hauser A.R., Jain M., Bar-Meir M., McColley S.A.* Microbes and outcomes in cystic fibrosis // *Clin. Microbiol. Rev.* 2011. Vol. 24. P. 1–70.

22. *Kosorok M.R., Zeng L., West S.E. et al.* Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition // *Pediatr. Pulmonol.* 2001. Vol. 32. P. 277–287.

23. Manual of clinical microbiology — 11th edition / editors in chief – James H. Jorgensen, Michael A. Pfaller; volume editors – Karen C. Carroll [and 4 others]. 2015.

24. *Tramper-Stranders G.A., vander Ent C.K., Molin S. et al.* Initial *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: characteristics of eradicated and persistent isolates // *Clin. Microbiol. Infect.* 2012. Vol. 18 (6). P. 567–574.



Реформирование практики бактериологических исследований: новый уровень микробиологической диагностики

Ю.И. Тарасов

д-р мед. наук, действительный член Российской академии
медико-технических наук, проф., главный врач,

С.Ю. Усачева

канд. мед. наук, ст. науч. сотр.,
врач-бактериолог – заведующая бактериологической лабораторией,

Е.А. Мозжухина

врач-бактериолог

ГБУЗ Нижегородской области «Клинический диагностический центр»

В статье представлен путь поэтапного развития лаборатории клинической микробиологии: техническое перевооружение «ручных» операционных процедур на разных этапах исследований, внедрение принципов стандартизации технологического процесса и оценки результатов, освоение инновационных экспресс-методов этиологической диагностики. Подчеркнута необходимость руководствоваться новыми научными взглядами на проблему антибиотикорезистентности микроорганизмов для обеспечения достоверности результатов микробиологических исследований. Представлен анализ наиболее интересных результатов микробиологических исследований при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, урогенитального тракта и мочевыводящих путей.

Роль и значение микробиологических исследований в практике здравоохранения трудно переоценить ввиду их особой актуальности для этиологической диагностики инфекционных заболеваний и большой социальной значимости для

оценки опасности их распространения среди населения. Хорошо известно, какой серьезной проблемой является антибиотикорезистентность микроорганизмов. Угроза распространения мультirezистентных штаммов носит глобальный характер. Ситуация с каждым годом становится все драматичнее из-за того, что антибиотикорезистентные вирулентные штаммы, формирующиеся обычно в госпитальной среде, теперь широко циркулируют во внебольничных условиях.

Микробиологические исследования входят в стандарты обследования больных с инфекционными заболеваниями различных нозологических форм с целью уточнения этиологического диагноза и определения тактики целенаправленных лечебных и профилактических мероприятий. Результаты микробиологических анализов являются основой мониторинга и прогноза эпидемиологической ситуации в конкретном регионе и в целом по стране. Данные о структуре резистентности возбудителей внебольничных и нозокомиальных инфекций используются в медицинской практике при эмпирическом назначении антибиотиков, а также для формирования больничных формуляров.

Более трех с половиной веков, начиная с открытия А. ван Левенгуком мира микробов, микробиология как наука развивалась интенсивно, а порой революционно. В то же время в России микробиологическая практика долгие десятилетия пребывала в неизменном состоянии. До настоящего дня большинство бактериологических лабораторий располагают минимально необходимым набором оборудования и технических средств. Микробиологические технологии остаются трудоемкими и подчас нестандартизованными. Методы работы с изолятами микроорганизмов, разработанные еще в XIX в. Робертом Кохом и его последователями, используются до настоящего времени почти в неизменном виде [13]. Чашки Петри с питательными средами, бактериологические петли и некоторые другие специальные инструменты являются визитной карточкой большинства микробиологических лабораторий в отечественном здравоохранении.

Несмотря на стремительное развитие, начиная с 1970–1980-х гг., современных методов индикации микроорганизмов на основе молекулярно-генетических, иммунологических, хроматографических исследований, в широкую

бактериологическую практику в системе государственного здравоохранения, к большому сожалению, эти методы до настоящего времени не вошли.

Прерогативой деятельности бактериологических лабораторий в ЛПУ является совершенствование классической культуральной диагностики. Традиционное микробиологическое исследование биологического материала остается по праву золотым стандартом этиологической диагностики инфекционно-воспалительных заболеваний, поскольку позволяет изучить биологическую активность возбудителей, оценить массивность микробного очага, определить чувствительность к антибактериальным препаратам и специфическим лечебным бактериофагам.

Современное здравоохранение ставит перед клинической микробиологией задачу выбора адекватной тактики антибиотикотерапии, при условии максимально быстрого ее назначения. Это диктует высокие требования к качеству лабораторных результатов. Решение столь актуальной проблемы лежит в плоскости стандартизации и автоматизации на всех этапах микробиологических исследований, что позволит исключить субъективные факторы, сократить время получения результата, снизить трудозатраты, получить корректные результаты [3, 10].

Значительный прогресс в клинической микробиологии наметился в конце 1990-х гг., когда на российском рынке начали появляться качественные сертифицированные расходные материалы, многочисленные приборы для осуществления всех операционных процедур на этапе пробоподготовки и культивирования микроорганизмов, автоматические и полуавтоматические анализаторы для биохимической идентификации широкого спектра возбудителей и определения их антибиотикочувствительности, автоматические системы для получения гемокультуры. Однако желанная автоматизация микробиологических технологий оказалась доступной лишь незначительному числу крупных лабораторий. Причина заключается в высокой стоимости оборудования и, что еще более важно, готовых сред и наборов реагентов. К тому же многие анализаторы относятся к оборудованию закрытого типа и заменить расходные средства производителя на другие невозможно. Понятно, что эксплуатация анализаторов

вместе с большими преимуществами влечет значительное удорожание исследований.

Реформирование бактериологических исследований

Нижегородский областной клинический диагностический центр не остался в стороне от прогрессивных течений в отечественном здравоохранении, и на протяжении последних 17 лет в лаборатории клинической микробиологии идет непрерывный процесс, направленный на стандартизацию исследований, внедрение современных методов и технологий, позволяющих, насколько возможно, перейти от ручной, трудоемкой лабораторной практики к рациональной логистике операционных процедур и новому дизайну исследовательской работы [11].

Реформирование бактериологических исследований происходило поэтапно, в плановом порядке, с учетом финансовых возможностей бюджетного учреждения. На начальном этапе в качестве приоритетных были поставлены следующие задачи:

- ~ переоснащение всех звеньев микробиологических исследований сертифицированными средствами отечественного и зарубежного производства;
- ~ обновление рутинного базового оборудования и приобретение оборудования, обеспечивающего малую автоматизацию технологического процесса (пипеточные дозаторы, вортексы, электронные весы, денситометры, диспенсоры, анаэростаты и т. д.), микроскопов с современной оптической системой.

Все микробиологические исследования проводятся в соответствии со стандартами, разработанными на основе последних официальных руководств [4, 5].

В целях полноценной этиологической диагностики различных заболеваний, в комплексе с культуральным анализом выполняются микроскопические исследования, определение специфических антител и инновационные диагностические экспресс-тесты. В лаборатории реализуется многоступенчатая система контроля качества.

Знаменательным этапом совершенствования микробиологических исследований явилось внедрение в практику метода масс-спектрометрии. Ввод в эксплуатацию в 2012 г.

высокотехнологичного оборудования последнего поколения – масс-спектрометра – открыл новую эру в лабораторной диагностике и позволил решить ключевые задачи: сократить сроки проведения анализов до 2–5 сут (вместо 4–7 сут и более, в зависимости от вида исследования), обеспечить практически 100% специфичность идентификации микроорганизмов и при этом значительно расширить границы возможностей общепринятых методов определения таксономической принадлежности выделенных микроорганизмов.

Конечной целью микробиологической диагностики является определение чувствительности этиологически значимых микроорганизмов, выделенных из биологического материала, к антибактериальным препаратам. Изучение чувствительности микробных агентов к антибиотикам позволяет выбрать тактику этиотропной терапии у конкретных пациентов и прогнозировать эффективность лечения при инфекционно-воспалительных заболеваниях.

Анализ данных, полученных в ходе рутинных исследований, позволяет оценить распространенность резистентности микроорганизмов к различным антибактериальным препаратам в отдельных стационарах и в конкретных регионах.

к сведению

Для изучения антибиотикорезистентности в практике нашей лаборатории используется наиболее распространенный диско-диффузионный метод Керби – Бауэра. До 2014 г. оценка антибиотикограммы и интерпретация результатов осуществлялась в свете рекомендаций Национального комитета по клиническим лабораторным стандартам США, что документально регламентировалось МУК 4.2.1890-04 [6]. В настоящее время наиболее обоснованным считается подход к оценке чувствительности и интерпретации результатов, предлагаемый Европейским комитетом по клиническим лабораторным стандартам (EUCAST), что заявлено в новом документе – Клинических рекомендациях, утвержденных в 2015 г. [7]. С 2014 г. постановка теста и оценка результатов производится нами в соответствии со стандартизованным EUCAST методом.

Учитывая высокие требования к условиям выполнения диско-диффузионного метода, обеспечивающие получение корректных результатов, рациональным явилось внедрение стандартизованного автоматического метода с помощью анализатора BIOMIC V3. Анализатор позволяет не только интерпретировать результат, но также дать экспертную оценку и провести клинико-эпидемиологический анализ полученных данных.

Известно, что заинтересованность специалистов в результатах своей деятельности является движущей силой ее совершенствования. Поэтому мы практикуем как проспективный, так и ретроспективный анализ всех направлений наших исследований. Основные виды диагностических исследований определяются преимущественно стандартами обследования пациентов разного профиля. Так, бактериологический анализ входит в алгоритм лабораторной диагностики при заболеваниях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), урогенитального тракта и мочевыводящих путей. Соответственно, исследования для выявления дисбактериоза кишечника, посевы мочи, отделяемого урогенитального тракта являются ведущими в структуре всех диагностических исследований.

Исследование состава флоры кишечника показано при многих заболеваниях ЖКТ (синдроме раздраженной кишки, неспецифическом язвенном колите и пр.), желчевыводящих путей, аллергических заболеваниях и выполняется в соответствии с действующим отраслевым стандартом [8]. В ходе исследования обычно оцениваются следующие основные показатели состояния микробиоты кишечника:

- ~ уровень содержания бифидобактерий как одних из основных анаэробных представителей облигатной микрофлоры;
- ~ уровень содержания популяции лактобацилл;
- ~ качественные и количественные характеристики популяций кишечной палочки и энтерококка;
- ~ количественное соотношение анаэробов с факультативно-анаэробными и строго аэробными микроорганизмами;
- ~ уровень колонизации условно-патогенными микроорганизмами;
- ~ количество спорообразующих анаэробов рода Клостридии.

В целях усовершенствования общепринятого подхода к технологии исследования и оценке результатов нами были принесены следующие дополнения: более углубленное изучение в составе микробиоты компонента клостридий; обнаружение (по показаниям) токсинов А и В *Clostridium difficile* (экспресс-тест); проведение в ряде случаев целенаправленного анализа на бактериоиды. Многолетний опыт работы показал, что качественный и количественный состав микрофлоры кишечника у наших пациентов отличается большим своеобразием и при интерпретации результатов часто возникают затруднения, т. к. рекомендованная отраслевым стандартом оценка тяжести микробиологических нарушений является весьма схематичной. Поэтому при обработке конкретных данных мы посчитали целесообразным частично пересмотреть градации по степеням тяжести микробиологических нарушений и учитывать, кроме I, II и III степени дисбактериоза, промежуточные состояния, обозначенные как I–II и II–III степень.

Анализ микробиоты у пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта

Некоторые результаты анализа наших исследований представлены ниже.

Подвергнуты анализу методом случайной выборки 1390 микробиологических карт пациентов с различными заболеваниями ЖКТ (синдром раздраженной кишки, неспецифический язвенный колит и пр.), обследование которых проведено по направлению врачей-гастроэнтерологов. Интересно отметить, что показатели состояния микробиоты у пациентов за последние 2 года оказались хуже в сравнении с предыдущим периодом наблюдения. Поэтому мы разделили результаты на 2 периода наблюдения: в 1-й период 2012–2013 гг. вошли результаты анализов 950 больных, во 2-й период 2014–2015 гг. – 440 больных. Возрастной состав обследованных включал лиц трудоспособного возраста (от 18 до 60 лет) – 62,6% и старше 60 лет – 37,4%.

Распределение результатов микробиологических исследований по степеням выраженности дисбактериоза представлено на рис. 1.

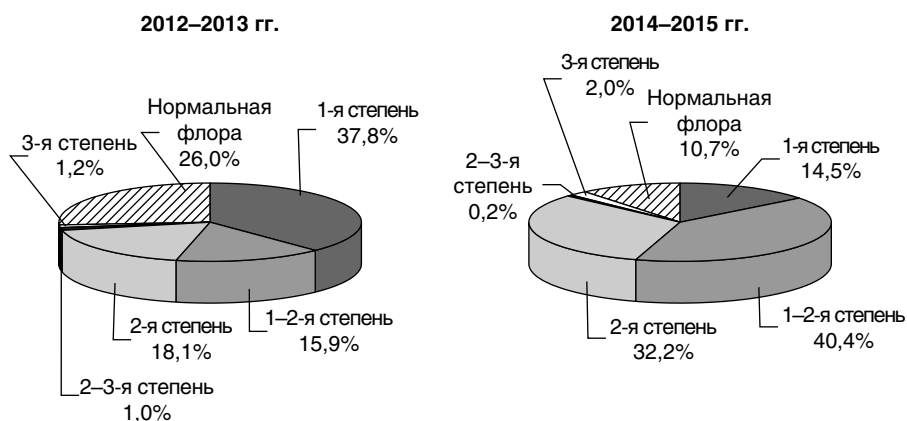


Рис. 1. Частота обнаружения дисбактериоза с дифференциацией по степени тяжести нарушений микробиоты кишечника у пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта (за два периода наблюдения – 2012–2013 и 2014–2015 годы)

Глубокие нарушения, соответствующие II, II–III и III степени дисбактериоза кишечника обнаружены в 20,0 (2012–2013 гг.) и 34,4% (2014–2015 гг.) случаев. Микроэкология этих пациентов характеризовалась прежде всего резким угнетением популяций бифидобактерий и лактобацилл, играющих ключевую роль в механизмах колонизационной резистентности, детоксикации и иммунной защиты. По нашим наблюдениям, в 2014–2015 гг. состояние нормоценоза кишечника у пациентов обнаруживалось в 2 раза реже, чем в предшествующий период (10,7 и 26,0% соответственно). Та же зависимость характерна для пациентов с начальными (I степенью) проявлениями нарушений микробиоты кишечника.

Следует отметить, что пациенты с I и I–II степенью дисбактериоза имеют хорошие перспективы при проведении грамотной корригирующей терапии с использованием наиболее физиологичных биопрепаратов, в частности бактериофагов, пребиотиков и пробиотиков.

Частота обнаружения отдельных микроорганизмов в составе микробиоценоза кишечника колебалась по годам в значительных пределах, например, виды рода *Enterobacter* встречались с частотой 7,0–16,0%, *Clostridium perfringens* – 8,0–14,0%. *Escherichia coli* с гемолитической активностью – 13,0–26,0%.

В количественном отношении основными представителями облигатной микрофлоры кишечника являются бак-

тероиды, играющие важную роль в процессе пищеварения, утилизации желчных кислот и липидном обмене. Однако ввиду трудности их культивирования на практике в схему исследования для выявления дисбактериоза эти анаэробные микроорганизмы обычно не включаются.

С целью определения уровня бактериоидов как индигенной фракции микробиоты кишечника нами были проведены исследования кала с применением техники анаэробного культивирования у 95 пациентов с синдромом раздраженной кишки и др. В результате выделены и идентифицированы разные виды бактериоидов, в т. ч. *B. fragilis*, *B. distasonis*, *B. vulgatus* и др. Частота обнаружения бактериоидов составила всего 41,8%. При этом только у 25,0% обследованных пациентов популяция бактериоидов присутствовала в количестве, соответствующем возрастной норме.

Отсутствие бактериоидов у большинства больных (58,2% обследованных) предположительно может свидетельствовать о высокой лабильности этих микроорганизмов и сильной зависимости от внутренних и наружных неблагоприятных факторов. Низкий уровень бактериоидов может служить индикатором глубоких нарушений микробиоценоза.

Анализ микробиоты у пациентов с урогенитальными инфекционно-воспалительными заболеваниями

Для лабораторной диагностики урогенитальных инфекционно-воспалительных заболеваний нами разработан алгоритм исследований, включающий:

- ~ культуральные методы в направлении поиска всех групп приоритетных условно-патогенных микроорганизмов, включая строгие анаэробы, микоплазмы и грибы;
- ~ метод микроскопии нативного биоматериала;
- ~ экспресс-метод с целью обнаружения стрептококков группы В (*S. agalactiae*);
- ~ определение чувствительности выделенных возбудителей (бактерий, микоплазм и грибов) ко всем поколениям антибактериальных и антимикотических препаратов, что дает возможность осуществить целенаправленную тактику лечения.

С начала пубертатного периода у женщин лактобактерии становятся доминирующими микроорганизмами во влага-

лице и сохраняют это положение на протяжении всего репродуктивного периода.

Лактофлора является определяющим фактором, обеспечивающим стабильность вагинальной экосистемы и устойчивость к различного рода инфекциям. Совокупность методов позволила обнаружить присутствие популяций лактобацилл во влагалищном секрете у 78,8% обследованных женщин репродуктивного возраста с признаками воспаления. При этом уровень содержания лактобацилл только в половине случаев соответствовал нормальным количественным показателям. Новые возможности в изучении микробиоценозов появились с внедрением инновационного метода масс-спектрометрии. Использование преимуществ культурального посева в сочетании с масс-спектрометрическим анализом позволило определить видовой состав лактобацилл, колонизирующих влагалищный биотоп. Обнаруженные впервые Додерлейном в конце XIX в. в вагинальном мазке грамположительные палочки ассоциировались до недавнего времени с *Lactobacillus acidophilus*. В свете последних научных исследований [2] показано, что в организме здоровой женщины репродуктивного возраста лактофлора представлена преимущественно видом *L. crispatus*, продуцирующим перекись водорода и молочную кислоту. Наличие объективных признаков воспаления обычно коррелирует с выявлением *L. gasseri* или *L. iners*.

В 2013–2015 гг. нами было выделено из влагалищного отделяемого обследованных женщин 408 изолятов рода *Lactobacillus*

и идентифицировано более 14 видов лактобацилл, некоторые из которых могли быть участниками инфекционно-воспалительного процесса в генитальной сфере (рис. 2).

Для интегральной оценки состояния микробиоценоза влагалища мы использовали общепринятый алгоритм исследования, включающий определение следующих параметров: уровень содержания лактобацилл, количество лейкоцитов

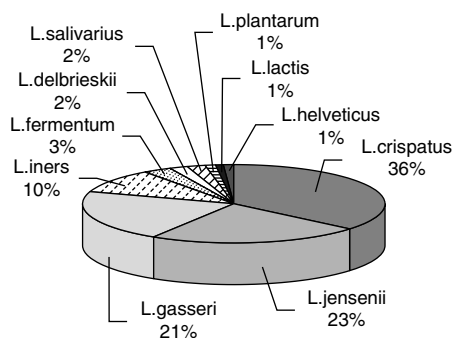


Рис. 2. Частота обнаружения различных видов лактобацилл во влагалищном секрете обследованных женщин

в поле зрения, состав и количество условно-патогенных микроорганизмов, наличие и количество грибов рода *Candida*, присутствие коккобациллярных форм, наличие «ключевых» клеток.

В основу исследований положены технологии, разработанные в ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» под руководством д-ра мед. наук проф. А.С. Анкирской [1].

Были подвергнуты ретроспективному анализу данные микробиологических исследований отделяемого влагалища 603 женщин с признаками воспаления, а также с симптомами болезни невоспалительного характера, находящихся под амбулаторным наблюдением врача-гинеколога в течение 2012–2015 гг. Полученные данные позволили выделить группы женщин с процессами инфекционно-воспалительного характера и другими патологическими состояниями.

Результаты исследования микробиоценоза биотопа влагалища женщин представлены на рис. 3.

Серьезную проблему представляет лечение больных с хроническими и отягощенными воспалительными заболеваниями мочевыводящих путей в связи с высокой устойчивостью микроорганизмов – уропатогенов к антибактериальным препаратам. Именно такой контингент больных обращается за помощью в наше учреждение [12]. Так, среди обследованных были лица с диагнозами: хронический пиелонефрит – 51,8% случаев, хронический цистит – 17,9%, клинические формы неуточненной локализации – 30,3% случаев. Отмечено, что большое число обследованных (порядка 42,0%) имели осложненные

формы заболевания.

В результате мониторинга результатов микробиологических исследований на протяжении 15 лет (2001–2015 гг.) получены данные о частоте обнаружения различных групп микроорганизмов, которые с учетом степени бактериурии оценивались как возбудители инфекций мочевыводящих путей.

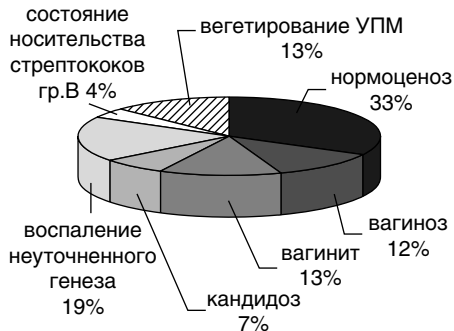


Рис. 3. Результаты исследования микробиоценоза биотопа влагалища обследованных женщин

Всего подвергнуты анализу результаты микробиологического исследования более 10 тыс. образцов мочи. Основными возбудителями за многолетний период наблюдений неизменно являлись такие условно-патогенные микроорганизмы, как кишечная палочка, клебсиелла и энтерококк (рис. 4).

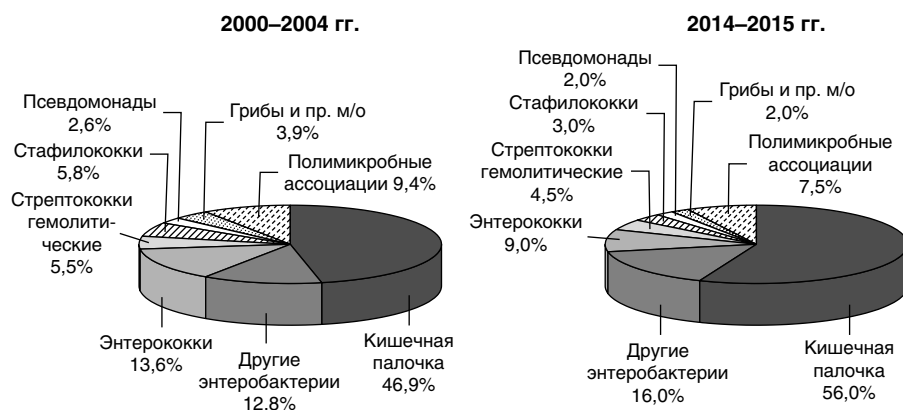


Рис. 4. Структура возбудителей воспалительных заболеваний мочевыводящих путей у пациентов амбулаторного приема

Своевременная этиологическая диагностика с определением индивидуальной антибиотикограммы выделенных

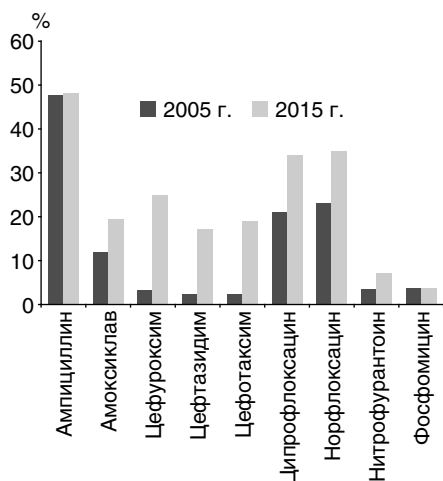


Рис. 5. Результаты изучения антибиотикорезистентности культур кишечной палочки, выделенной из мочи амбулаторных пациентов в 2005 и 2015 году (по оси ординат – процент резистентных культур)

штаммов играет решающее значение в выборе тактики целенаправленной терапии [9]. Профиль антимикробной резистентности выделенных культур кишечной палочки, по данным двух выборочных периодов наблюдения с десятилетним временным промежутком, представлен на рис. 5.

На диаграмме прослеживается рост резистентности урокультур кишечной палочки ко всем группам антибиотиков, которые широко используются в урологической практике. Особую проблему создает увеличение доли (более 30,0%) штаммов, резистентных к фторхиноло-

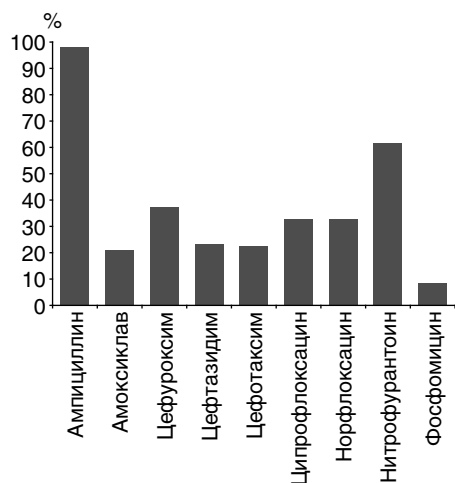


Рис. 6. Антибиотикорезистентность урокультур клебсиелл в 2015 году

нам, которые являются препаратами выбора при инфекциях мочевыводящих путей.

Урокультуры *K. pneumoniae* (изучено 200 культур) отличались полирезистентностью к большинству используемых препаратов, с особенно высокой частотой устойчивости к нитрофурантоину (рис. 6).

Приведенные данные являются отражением состояния антибиотикорезистентности возбудителей инфекций мочевыводящих путей у амбулаторных пациентов в конкретном ЛПУ и в определенной степени Нижегородском регионе в целом. Полученные результаты будут чрезвычайно полезны для определения стратегии и тактики применения антибактериальных препаратов в клинической практике.

Учитывая присутствие в нашей жизни многочисленных неблагоприятных внешних факторов, влияющих, возможно, в первую очередь на иммунитет и микроэкологию организма человека, клиническая микробиология в перспективе должна приобрести особую актуальность. Пути развития микробиологической практики видятся в укреплении и укрупнении лабораторных баз; соединении в единый комплекс всех современных методов, направленных на поиск микробных агентов; объединении усилий микробиологов, фармакологов, эпидемиологов и клиницистов; создании региональных центров по мониторингу антибиотикорезистентности клинических изолятов; разработке новых нормативных документов взамен устаревших.

Учитывая присутствие в нашей жизни многочисленных неблагоприятных внешних факторов, влияющих, возможно, в первую очередь на иммунитет и микроэкологию организма человека, клиническая микробиология в перспективе должна приобрести особую актуальность. Пути развития микробиологической практики видятся в укреплении и укрупнении лабораторных баз; соединении в единый комплекс всех современных методов, направленных на поиск микробных агентов; объединении усилий микробиологов, фармакологов, эпидемиологов и клиницистов; создании региональных центров по мониторингу антибиотикорезистентности клинических изолятов; разработке новых нормативных документов взамен устаревших.

Список использованной литературы

1. Анкирская А.С., Муравьева В.В. Интегральная оценка состояния микробиоты влагалища. Диагностика оппортунистических вагинитов (медицинская технология). М., 2011. 20 с.
2. Ворошилина Е.С. Совершенствование методических подходов к оценке микробиоценоза влагалища у женщин репродуктивного воз-

- раста. Автореферат дисс. на соиск. уч. ст. д-ра мед. наук. Челябинск, 2012. 37 с.
3. ГОСТ Р ИСО 15 189-2009. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
4. Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство. Том II. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2013. 805 с.
5. Методики клинических лабораторных исследований. Т. 3. Клиническая микробиология / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Лабора. 2009. 880 с.
6. МУК 4.2.1890-04. «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам», утв. Главным государственным санитарным врачом РФ. 91 с.
7. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: клинические рекомендации. Утв. на расширенном совещании Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии. Москва, 22 мая 2015 г.
8. Приказ Минздрава России от 09.06.2003 № 231. Отраслевой стандарт «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». 73 с.
9. Синякова Л.А., Косова И.В. Антимикробная терапия неосложненных инфекций мочевых путей // Consillium medicum. 2014. № 7. С. 3–6.
10. Тартаковский И.С. Микробиологические исследования. Методическое пособие «Организация и нормативно-правовое обеспечение лабораторной службы. Инновационное развитие лабораторной медицины в России». М., 2014 . С. 82–83.
11. Тарасов Ю.И., Усачева С.Ю. Пути оптимизации и совершенствования деятельности лабораторий клинической микробиологии (опыт нижегородских бактериологов): материалы Всероссийской научно-практической конференции «Медицинская микробиология – XXI век». Саратов, 2004. С. 216–217.
12. Усачева С.Ю., Бандорина О.Л., Мозжухина Е.А. и др. Практическая значимость этиологической диагностики при инфекционно-воспалительных заболеваниях мочевыводящих путей // Нижегородский медицинский журнал. № 3. 2006. С. 43–47.
13. Шлегель Г.Г. История микробиологии. М.: Эдиториал УРСС. 2006. 266 с.



Критерии оценки состава биоценоза просвета толстой кишки

А.Г. Точилина

канд. биол. наук, ст. науч. сотр.,

И.В. Белова

канд. мед. наук, ведущ. науч. сотр.,

И.В. Соловьева

заведующая лабораторией,

В.А. Жирнов

науч. сотр.,

Т.П. Иванова

науч. сотр.

Лаборатория микробиома человека и средств его коррекции ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород

В статье приведено подробное описание метода и методического обеспечения для оценки состояния микробиоты кишечника человека, а также нормативные таблицы, позволяющие верифицировать диагноз в соответствии с результатами исследования, выполненного предложенным методом.

Микробиоценоз кишечного тракта представляет собой высокочувствительную индикаторную систему, которая реагирует количественными и качественными сдвигами на изменение состояния здоровья макроорганизма [11]. Многими исследователями кишечная микрофлора рассматривается как основная детерминанта здоровья человека [9].

Доказано, что существует сложная многоуровневая система регуляции симбиотических взаимоотношений между микробными популяциями и клетками организма-хозяина.

Как только наступают патологические изменения, меняется состав и свойства кишечной микрофлоры, нарушаются ее важные для макроорганизма функции [24]. Изменения в микрофлоре кишечника, наступающие под влиянием всевозможных факторов, обозначают терминами «дисбиоз», «дисбиозноз», «дисбактериоз».

В ОСТ 91500.11.0004-2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника» понятие «дисбактериоз» трактуется как клинико-лабораторный синдром, связанный с изменением качественного и/или количественного состава микрофлоры кишечника с последующим развитием метаболических и иммунологических нарушений с возможным развитием желудочно-кишечных расстройств.

Данный отраслевой стандарт является основным регламентирующим документом при оценке состояния микробиоценоза кишечника. В нем приведены таблицы, характеризующие состав микрофлоры у здоровых людей, и критерии для диагностики дисбиоза.

Однако ни в этом, ни в других документах, посвященных обсуждаемому вопросу [1, 3], не указана методика проведения анализа, хотя от нее напрямую зависит спектр микроорганизмов, который бактериолог может выделить из микробиоты обследуемого и идентифицировать до рода и вида.

к сведению

Широко используемые в практическом здравоохранении методики бактериологической диагностики дисбактериоза кишечника направлены в основном на выделение и дифференциацию аэробных микроорганизмов. Представители анаэробной части микробного сообщества кишечника чаще всего выделяются полуколичественным способом (при определении количества микроорганизмов учитывается разведение биологического материала, но не проводится подсчет колоний, выросших в данном разведении, т. к. микроорганизмы выращиваются на полужидких или жидких средах), без видовой идентификации. Это в первую очередь касается лакто- и бифидобактерий. В рутинной практике определение родовой принадлежности этих микроорганизмов проводится, как правило, только по морфологическим признакам, что делает

невозможной дифференциацию их с пропионобактериями, эубактериями и другими грамположительными анаэробами и микроаэрофилами. Исключение составляют отдельные методики, позволяющие дополнительно идентифицировать бактериоиды и клостридии с использованием питательных сред собственного приготовления [21] и методики, «привязанные» к готовым средам определенного производителя [3]. Большинство методик не предусматривают выделение и идентификацию эубактерий и фузобактерий, несмотря на то, что согласно ОСТ их содержание в микробиоте у здоровых лиц находится в определенных пределах. Вышесказанное свидетельствует, что в отраслевом стандарте обобщены данные отечественных и зарубежных авторов о составе микрофлоры здоровых людей, полученные в результате применения разных методических подходов, тогда как унифицированный стандартный метод изучения качественного и количественного состава микробиоты просвета толстой кишки не предложен.

В связи с этим мы посчитали необходимым обобщить современные сведения по данному вопросу с учетом доступности лабораторных методов для бактериологических подразделений практических клинко-диагностических лабораторий разной степени оснащенности: методику проведения анализа, методическое обеспечение, включая перечень современных питательных сред, а также критерии, позволяющие оценить состояние микробиоты кишечника при использовании предложенного метода.

Методика проведения исследования

В качестве основы предлагаемой методики был выбран традиционный бактериологический метод изучения микробиоценоза просвета толстой кишки, разработанный Р.В. Эпштейн-Литвак и Ф.Л. Вильшанской [25]. Данный метод широко применяется в отечественной современной клинической практике в различных модификациях. За прошедшие с момента исследований Р.В. Эпштейн-Литвак и Ф.Л. Вильшанской годы арсенал бактериологической службы пополнился большим количеством новых современных стандартных питательных сред для классической бактериологии, что позволило, не меняя принципа метода, дополнить его расширенным набо-

ром сред для первичного посева и вследствие этого выделять обширный спектр микроорганизмов различных родов [8].

Сущность метода заключается в мерном посеве десятикратных разведений субстрата (фекалий) в физиологическом растворе на дифференциально-диагностические среды, позволяющие выделить чистые микробные культуры и определить количество каждой из них в 1 г биологического материала пациента.

Исследуемый материал (фекалии) забирают в стерильную, предварительно взвешенную емкость для сбора фекалий без консерванта в количестве около 1 г (1 мл). Материал доставляют в лабораторию в течение 2–3 ч с момента взятия, что особенно важно для выделения анаэробов, погибающих при контакте с кислородом.

Вес взятого на анализ материала определяют по разнице веса флакона с материалом и весом пустого флакона. Для приготовления разведения 1:10 требуемое количество фосфатного буфера по Хенелю или физиологического раствора определяют по пересчетной таблице (табл. 1).

Таблица 1

Пересчетная таблица

Вес, мг	Кол-во физ. р-ра, мл	Вес, мг	Кол-во физ. р-ра, мл	Вес, мг	Кол-во физ. р-ра, мл	Вес, мг	Кол-во физ. р-ра, мл
200	1,80	400	3,60	600	5,40	800	7,20
210	1,89	410	3,69	610	5,49	810	7,29
220	1,98	420	3,78	620	5,58	820	7,38
230	2,07	430	3,87	630	5,67	830	7,47
240	2,16	440	3,96	640	5,76	840	7,56
250	2,25	450	4,05	650	5,85	850	7,65
260	2,34	460	4,14	660	5,94	860	7,74
270	2,43	470	4,23	670	6,03	870	7,83
280	2,52	480	4,32	680	6,12	880	7,92
290	2,61	490	4,41	690	6,21	890	8,01
300	2,70	500	4,50	700	6,3	900	8,10
310	2,79	510	4,59	710	6,39	910	8,19
320	2,88	520	4,68	720	6,48	920	8,28
330	2,97	530	4,77	730	6,57	930	8,37
340	3,06	540	4,86	740	6,66	940	8,46
350	3,15	550	4,95	750	6,75	950	8,55
360	3,24	560	5,04	760	6,84	960	8,64
370	3,33	570	5,13	770	6,93	970	8,73
380	3,42	580	5,22	780	7,02	980	8,82
390	3,51	590	5,31	790	7,11	990	8,91
						1000	9,00

При невозможности немедленной доставки материала в лабораторию необходимо переложить нативный материал во флакон с транспортной средой (например, транспортную систему со средой Кари – Блэйра (HiMedia) или любой другой транспортной средой для анаэробов) или добавить транспортную среду в таком количестве, чтобы получилось разведение 1:10.

В течение 5–10 мин содержимое емкости интенсивно перемешивают до получения гомогенной взвеси, не допуская попадания кислорода. Затем готовят ряд десятикратных разведений фекалий в стерильном физиологическом растворе или фосфатном буфере от 10⁻¹ до 10⁻¹¹. Подсчет количества каждого вида микроорганизмов в 1 г проводят по числу колоний, выросших на питательных средах, с пересчетом на количество посевного материала и степень его разведения по формуле:

$$M = P \times 2 \times 10^{n+1},$$

где M – число микроорганизмов в 1 г биологического материала пациента, P – число колоний, n – разведение, 2 – коэффициент при посевном объеме 0,05 мл.

Если проводится посев в объеме 0,1 мл, то коэффициент 2 не используется:

$$M = P \times 10^{n+1}.$$

Если проводится посев 1 мл биологического материала пациента из разведений, то подсчет числа бактерий в грамме определяется по формуле:

$$M = P \times 10^n.$$

Получение изолированных колоний является обязательным условием достоверности количественного учета отдельных групп микроорганизмов.

Питательные среды

Необходимо отметить, что описанный метод не привязан к диагностическим питательным средам конкретного производителя и оставляет возможность использовать любые сертифицированные питательные среды, аналогичные по назначению, а также дополнительные накопительные, селективные, элективные, дифференциально-диагностические, позволяю-

Повышение квалификации

щие выделять и идентифицировать до рода и вида требуемый спектр микроорганизмов облигатной, факультативной и транзитной микрофлоры. Примерный перечень сред для первичного посева и подробные комментарии к методу даны в табл. 2.

Таблица 2

Схема бактериологического исследования микробиоценоза кишечника

Наименование среды	Разведение	Количество, мл	Условия инкубации			Назначение среды
			анаэробные/аэробные	Т °С	вре-мя, ч	
1	2	3	4	5	6	7
Среда обогащения: селенитовый бульон или магниевая среда, забуференная пептонная вода (Buffered peptone water, M614 HiMedia)	10 ⁻¹	1,0	Аэробные	37	18–24	Среды обогащения для бактерий рода <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i>
Среда Плоскорева	Со среды обогащения	Посев петлей	Аэробные	37	18–24	Обнаружение бактерий рода <i>Shigella</i>
Висмут-сульфитный агар	Со среды обогащения	Посев петлей	Аэробные	37	24–48	Обнаружение бактерий рода <i>Salmonella</i>
Гектоеновый энтеро-агар (Hektoen Enteric Agar, M467 HiMedia)	Со среды обогащения	Посев петлей	Аэробные	37	24–48	Обнаружение бактерий родов <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>
Среда Плоскорева	10 ⁻¹	Посев петлей	Аэробные	37	18–24	Обнаружение бактерий родов <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , условно-патогенных микроорганизмов семейства <i>Enterobacteriaceae</i>
	10 ⁻⁴	0,05	Аэробные	37	18–24	Выделение и подсчет колоний бактерий родов <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , а также <i>Klebsiella</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Proteus</i> и других условно-патогенных микроорганизмов семейства <i>Enterobacteriaceae</i> , а также неферментирующих грамотрицательных бактерий

Повышение квалификации

Продолжение табл. 2

1	2	3	4	5	6	7
Среда Эндо	10 ⁻⁵	0,05	Аэробные	37	18–24	Выделение и подсчет колоний типичных и атипичных <i>E. coli</i> , отбор колоний для проведения агглютинации с поливалентной сывороткой ОКА для выявления возбудителей эшерихиозов, а также выделение и подсчет колоний др. условно-патогенных микроорганизмов семейства <i>Enterobacteriaceae</i> и неферментирующих грам-отрицательных бактерий
5% кровяной агар	10 ⁻⁵	0,05	Аэробные	37	18–24	Выделение и подсчет гемолитических форм <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> . Выделение и подсчет колоний бактерий рода <i>Staphylococcus</i>
Желточно-солевой агар. Основа агара Бэрда – Паркера (Baird Parker Agar Base), добавка с теллуридом калия и эмульсией яичного желтка М 1468, FD 046 HiMedia	10 ⁻³	0,05	Аэробные	37	48	Выделение и подсчет колоний бактерий рода <i>Staphylococcus</i> , определение лецитиназной активности
Агар по Вогелу – Джонсону (Vogel – Johnson Agar Base М 023, HiMedia)	10 ⁻³	0,05	Аэробные	37	48	Выделение и подсчет колоний коагулазо- и маннит-положительных бактерий рода <i>Staphylococcus</i>
Среда Сабуро	10 ⁻¹ 10 ⁻³	0,1	Аэробные	22–25	До 7 суток	Выделение и подсчет колоний грибов рода <i>Candida</i>

Повышение квалификации

Продолжение табл. 2

1	2	3	4	5	6	7
Висмут-сульфит-глюкозо-глицино-дрожжевой агар – среда Никкерсона (Bi.G.G.Y. Agar M 217, HiMedia),						Высокоселективная среда для выделения и предварительной идентификации <i>Candida albicans</i> и <i>Candida tropicalis</i>
ХайКром селективный агар для грибов <i>Candida</i> (HiCrom Candida Agar M1297A/ M1456A, HiMedia)						Хромогенная среда. Применяется для селективного выделения и идентификации в первичном посеве <i>Candida albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. tropicalis</i>
Среда Блаурокка, бифидум-среда ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора (г. Оболенск), агар для бифидобактерий, модифицированная селективная среда <i>Bifidobacterium</i> agar, M1396, HiMedia	$10^{-5}-10^{-9}$	1,0	Анаэробные	37	72	Определение количества бактерий рода <i>Bifidobacterium</i>
Среда МРС-2 НИЦФ (г. Санкт-Петербург)	$10^{-5}-10^{-9}$	0,05	Микроаэрофильные	37	24–72	Определение количества бактерий рода <i>Lactobacillus</i>
Среда МРС-4 НИЦФ (г. Санкт-Петербург), Лактобакагар ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора (г. Оболенск)	10^{-5} , 10^{-6}	0,05	Анаэробные	37	24–72	Выделение и определение количества бактерий рода <i>Lactobacillus</i>
ЖСС агар ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора (г. Оболенск), агар для выделения клостридий (Clostridial agar M 497, HiMedia), агар Шадлера M291, HiMedia, агар по Вилкинсу – Чалгрону M832, HiMedia	10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4}	1	Анаэробные	37	24–48	Выделение и определение количества бактерий рода <i>Clostridium</i>

Повышение квалификации

Окончание табл. 2

1	2	3	4	5	6	7
2% кровяной агар с добавлением дрожжевого автолизата, твин-80 и аскорбиновой кислоты, агар для бактероидов с желчью и эскулином (Bacteroides Bile Esculin Agar) + селективная добавка для бактероидов М 805 FD 062, HiMedia, агар Шадлера М291, HiMedia, агар по Вилкинсу – Чалгрону М832, HiMedia	10^{-5} , 10^{-7} – 10^{-9}	0,1	Анаэробные	37	24–48	Выделение и подсчет бактерий группы <i>Bacteroides fragilis</i>
2% кровяной агар с добавлением дрожжевого автолизата, твин-80 и аскорбиновой кислоты, среда Фогета – Фредетта с добавлением 0,4% агара М431, HiMedia, агар Шадлера М291, HiMedia	10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4}	1	Анаэробные	37	24–48	Выделение эубактерий, фузобактерий, пептококков, пептострептококков

Работа по выделению и идентификации аэробных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, микроорганизмов родов *Staphylococcus*, *Enterococcus* и представителей группы неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов проводится по методикам, приведенным в соответствующих нормативных документах [12, 14, 15, 18], и, как правило, не вызывает особенных трудностей. Идентификация микроорганизмов проводится с использованием как классических сред, так и реагентов отечественного производства (например, систем индикаторных бумажных дисков (СИБов) «Микроген», Нижний Новгород, Россия; пластин биохимических, дифференцирующих энтеробактерии (ПБДЭ), стафилококки (ПБДС), «ДС-ДИФ-ЭНТЕРО – 12, 24», «ДС-ДИФ-СТАФИ-16»

НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород, Россия) и зарубежного производства (API, BioMerieux, Франция; BBL Crystal, Becton Dickinson, США и др.). Для сокращения времени идентификации можно использовать хромогенные среды групповой, родовой, видовой и внутривидовой идентификации (например, хромогенные среды Rambach Agar (Merck KGaA, Германия; «SM-ID»К BioMerieux, Франция; Fluorocult HC Agar acc. to SZABO и CT-Sorbitol MacConkey Agar (CT-SMAK Agar) Merck, Германия, и т. п.)), а также приборное обеспечение – различного рода баканализаторы и MALDI TOF масс-спектрометры.

Для обнаружения **дрожжеподобных грибов рода *Candida*** исследование проводят по следующей схеме. Так как в норме количество грибов обычно невелико, посев исследуемого материала проводят из разведений 10^{-1} и 10^{-3} на среду Сабуро в количестве 0,1 мл. Чашки с посевом выдерживают в термостате при температуре 37 ± 1 °C в течение 5–7 дней. Плотные, непрозрачные, молочно-белого цвета колонии разной величины микроскопируют в 40%-ном растворе едкого натрия. В мазках дрожжеподобные грибы имеют вид прозрачно-зеленоватых почкующихся клеток яйцевидной формы или вытянутых клеток. С целью обнаружения псевдомицелия и хламидоспор, наличие которых является основным характерным признаком грибов рода *Candida* (в частности, *C. albicans*), культуры пересевают на рисовый агар. Просмотр засеянных чашек рисового агара проводится под микроскопом через 2–3 дня. Дальнейшую идентификацию грибов рода *Candida* можно проводить с использованием различных реагентов, например диагностического набора КАНДИДА-скрин (Erba-Lachema, Чехия). Для первичного посева и идентификации дрожжеподобных грибов можно применять метод, предложенный ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России [4]. Также можно использовать современные хромогенные среды видовой идентификации, например HiCrome Candida Agar (HiMedia, Индия) и др. (табл. 2).

Выделение **анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов** проводят с использованием специальных условий: для обнаружения микроорганизмов производят посев в высокий столбик жидких или полужидких питательных

сред. Материал засевают на дно пробирки, не допуская попадания воздуха из пипетки во время посева.

При применении для выделения и идентификации анаэробов плотных питательных сред необходимо использовать анаэробные системы: анаэроостаты, анаэробоксы, анаэропакеты и системы GasPak (для микроаэрофилов или строгих анаэробов с катализатором или без, например «GasPak Anaerobe Gas Generating Pouch System with Indicator» (Becton Dickinson, США), GENbag-GENbox (BioMerieux, Франция), HiAnaero Bag System (HiMedia, Индия)).

Определение количества **молочнокислых бактерий** проводится на питательных средах de Man – Rogosa – Sharp (MPC). Для получения достоверных результатов оптимально использовать две среды: полужидкую агаровую среду MPC-2 (НИЦФ, Санкт-Петербург) с 0,15% агара (5 мл в пробирке) и чашки с плотной 1,5% агаровой средой MPC-4 (НИЦФ, Санкт-Петербург) с 0,04% сорбиновой кислоты (предварительно разведенной в небольшом количестве 95% спирта), которая подавляет рост дрожжевых и плесневых грибов и другой сопутствующей флоры. Также можно использовать среду Лактобакагар (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, Оболенск) с добавлением сорбиновой кислоты и др. Все среды имеют кислую реакцию (pH 6,2–6,6).

После посева материала на среду MPC-2 пробирки инкубируют при 37 °С в аэробных условиях. Далее оценивается характер роста (лактобактерии вырастают в виде отдельных колоний, имеющих форму пушинок или запятых), из типичных колоний готовятся мазки. В мазках, окрашенных по Граму, лактобактерии имеют форму грамположительных палочек с соотношением длины к ширине порядка 2:1 или 3:1. Палочки располагаются скоплениями или короткими и длинными цепочками. Количество лактобацилл подсчитывается в соответствии с формулой:

$$M = 10^{n+1},$$

где М – число микроорганизмов в 1 г биологического материала пациента, 10^n – максимальное разведение, при котором в мазках отмечено наличие типичных лактобацилл, +1 – коэффициент пересчета.

На данной среде могут также расти и представители транзиторной микрофлоры кишечника человека – бактерии **рода Propionibacterium**, которые имеют сходную морфологию (в мазке, окрашенном по Граму, – грамположительны, имеют «палисадное» расположение клеток, иногда образуют короткие цепочки и иероглифы). Дифференцировать лактобациллы от пропионобактерий можно по характеру роста на плотной среде (МРС-4, Лактобакагар и др.) и с помощью каталазного теста. На плотной среде МРС-4 и Лактобакагара лактобактерии растут в виде гладких, средних по величине, выпуклых белых колоний, иногда с коричневатым пигментом в центре, а также в форме шероховатых более крупных беловатых или молочно-белых с неровными фестончатыми краями. Пропионобактерии образуют на среде влажные и маслянистые блестящие круглые или овальные колонии с кремовым и коричневым пигментом. Каталазный тест у лактобацилл отрицательный, у пропионобактерий – положительный.

Дальнейшая видовая идентификация лактобацилл при необходимости проводится согласно МУ 2.3.2.2789–10, пп. 5.1 и 5.2 [16] с использованием наборов реагентов API 20 CHL, API 50 CHL (BioMerieux, Франция), АНАЭРОтест (Erba-Lachema, Чехия).

Для определения количества **бифидобактерий** оптимально использовать две среды – жидкую среду Блаурокка или бифидум-среду с добавлением тиогликолевой среды (в соотношении 1:3) (ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, г. Оболенск), разлитые в пробирки по 9 мл, и чашки с агаризованной бифидум-средой с добавлением 1,5% агара и 0,00075% налидиксовой кислоты (налидиксовая кислота предотвращает рост сопутствующей флоры) или Bifidobacterium agar (HiMedia, Индия). Все среды имеют рН 7,4–7,8.

Непосредственно перед работой проводят регенерацию жидких сред – удаление растворенного в питательной среде кислорода.

внимание!

Для этого проводят кипячение в течение 15–20 мин на водяной бане с последующим быстрым охлаждением до

45–50 °С. Посев на жидкие среды производят по 1,0 мл из разведений биологического материала пациента пипеткой на дно пробирки, не допуская попадания воздуха. За счет регенерации среды и метода посева создаются анаэробные условия культивирования, пробирки инкубируют в термостате.

Бифидобактерии растут отдельными колониями в виде «крупинок», «пушинок», «гвоздиков», «столбиков» либо гомогенной мути, колонии легко изолируются. В мазках они имеют вид грамположительных или тинкториально окрашенных палочек с раздвоением на конце или булабовидным утолщением, расположенных в виде буквы V или в виде характерных скоплений, напоминающих китайские иероглифы.

Количество бифидобактерий подсчитывается в соответствии с формулой:

$$M = 10^n,$$

где M – число микроорганизмов в 1 г биологического материала пациента, 10^n – максимальное разведение, при котором в мазках отмечено наличие типичных бифидобактерий.

На средах для культивирования бифидобактерий также могут расти пропионобактерии, отдельные виды которых в мазке имеют сходную морфологию не только с лакто-, но и с бифидобактериями. На плотных питательных средах колонии бифидобактерий растут в виде гладких, мелких и средних по величине, выпуклых белых (молочно-белые, серо-белые) и кремовых блестящих колоний. Подобные колонии могут образовывать и некоторые виды пропионобактерий. Получение чистых культур на плотной питательной среде позволяет провести разделение этих микроорганизмов в последующем тесте на каталазную активность. У бифидобактерий его результат отрицательный, у пропионобактерий – положительный.

Дальнейшая видовая идентификация при необходимости также проводится согласно МУ 2.3.2.2789–10, пп. 5.1 и 5.2 [16] с использованием тест-систем API 20A (BioMerieux, Франция), АНАЭРОтест 23 (Erba-Lachema, Чехия).

Дополнительные питательные среды

В предлагаемой нами методике бактериологической диагностики дисбактериоза кишечника для выделения других родов и видов облигатных представителей анаэробной микрофлоры для первичного посева рекомендуется использовать ряд дополнительных питательных сред.

Для выделения бактерий группы *Bacteroides fragilis* можно использовать, например, плотную селективную среду с желчью и эскулином с внесенной селективной добавкой для бактероидов (M805, FD062 HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия). Материал засеивается с разведений 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} в количестве 0,1 мл. На агаре с желчью и эскулином бактероиды в результате гидролиза эскулина образуют черные колонии. Идентификацию проводят по морфологическим признакам – типичный вид колонии и типичная морфология клеток в мазке. В мазках, окрашенных по Граму, бактероиды представляют собой палочковидные неспорообразующие грамотрицательные плеоморфные бактерии, значительно варьирующие по размерам. Дополнительное подтверждение правильности идентификации – проведение теста на каталазную активность микроорганизмов непосредственно из колоний (как правило, бактероиды каталазоположительны). Также для выделения бактероидов можно использовать агар Шадлера (M291, HiMedia, Индия), агар по Вилкинсу – Чалгрёну (M832, HiMedia, Индия), 2%-ный кровяной агар с добавлением 6% дрожжевого автолизата и 0,1% твин-80 и 0,025% аскорбиновой кислоты. На кровяном агаре с перечисленными выше добавками бактероиды образуют мелкие колонии до 1 мм, немного вогнутые, серовато-белые, без зон гемолиза. Некоторые виды образуют гладкие или шероховатые колонии диаметром 1–3 мм черного цвета, иногда с зоной гемолиза (после 5–7 сут культивирования). На агаре Шадлера эти микроорганизмы образуют серовато-белые колонии с β -гемолизом.

На агаре Шадлера и кровяном агаре с добавлением дрожжевого автолизата и твин-80 можно выделять и другие анаэробы – эубактерии, фузобактерии, пептококки, пептострептококки.

к сведению

Также можно использовать для их культивирования среду Фогета – Фредетта с добавлением 0,4% агара (HiMedia, M431) или другие среды, предназначенные для культивирования анаэробных микроорганизмов.

Эубактерии (*род Eubacterium*) – анаэробные неспорообразующие грамположительные палочки, обычно неправильной формы, часто с раздутыми и заостренными концами, иногда изогнутые. На кровяном агаре образуют мелкие полупрозрачные колонии, слегка выпуклые или плоские.

Фузобактерии (*род Fusobacterium*) – грамотрицательные плеоморфные бактерии, на кровяном агаре выглядят как мелкие выпуклые непрозрачные колонии с желтоватым центром, с зоной гемолиза (через 48 ч культивирования), на агаре Шадлера образуют колонии серовато-белого цвета, окруженные темно-серыми зонами. В мазке имеют форму тонких веретенообразных палочек или полиморфных палочек различной длины (до 15 мкм) с закругленными или заостренными концами. Пептококки (*Peptococcus*) и пептострептококки (*Peptostreptococcus*) через 48 ч на кровяном агаре образуют мелкие круглые, выпуклые, как правило, прозрачные колонии, некоторые виды образуют мутные или черные колонии. На агаре Шадлера образуют белые колонии.

Пептококки – грамположительные, круглые кокки размером 0,3–1,2 мкм, располагающиеся парами, тетрадами, в виде неправильных скоплений или короткими цепочками. Пептострептококки – грамположительные круглые сферические кокки размером 0,5–1,2 мкм, располагающиеся парами, небольшими неправильными скоплениями или цепочками.

Для выделения бактерий рода *Clostridium* используют плотные питательные среды, например Clostridial agar, агар Шадлера и агар по Вилкинсу – Чалгрону (M497, M291, M832 HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия). По 0,1 мл взвеси фекалий из разведений 10^{-1} , 10^{-3} – 10^{-4} засевают на чашку со средой и инкубируют в анаэробных условиях. Далее ведется подсчет колоний с последующей микроскопией. В мазках, окрашенных по Граму, клостридии выглядят как грамположительные прямые или слегка изогнутые палочки, образуют субтерминальные споры овальной или сферической фор-

мы, диаметр которых превышает поперечник вегетативной формы.

Дальнейшая идентификация (при необходимости) анаэробных микроорганизмов проводится с использованием наборов реагентов разных производителей (API, BBDL Crystal, Pliva Lachema и т. п.), бактериологических экспресс-анализаторов, масс-спектрометрии.

Основным достоинством классического микробиологического метода является точная верификация данных за счет выделения чистых культур микроорганизмов и его доступность для КДЛ фактически любого уровня оснащения.

внимание!

К сожалению, классический метод, которым пользуются все лаборатории, имеет два основных недостатка: относительно высокая стоимость расходных материалов (питательных сред) и длительность получения результатов исследования. Однако при использовании автоматических бактериологических анализаторов, MALDI TOF масс-спектрометрии значительно сокращается время выдачи результата (до 48 ч).

Что касается культурально независимых методов исследования (не требующих выделения чистой культуры), в частности полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления ДНК микроорганизмов, то ее использование оправданно в случае поиска конкретного микроорганизма-мишени, но не дает представления о других микроорганизмах данного фекального образца. То есть мы должны обозначить, какие виды микроорганизмов хотим найти (микроорганизм-мишень) и в каком титре, что обуславливает спектр наборов реагентов, которые следует использовать (многие ПЦР-наборы для выявления условно-патогенных микроорганизмов дают положительный результат только при концентрации $> 10^4$ КОЕ/мл). Некоторые исследователи [1] считают, что при использовании ПЦР исходный материал – образцы фекалий – могут храниться до 2 сут при 4 °С без изменения количественного соотношения аэробов и анаэробов. Однако наши наблюдения показывают, что при длительном хранении такого биоматериала без добавления консервантов в указанных усло-

виях размножаются представители аэробной микрофлоры и гибнут анаэробные, при этом изменяется начальное соотношение микроорганизмов, что влияет на достоверность полученных результатов [8].

Вследствие этого ПЦР целесообразно использовать при проведении скрининговых обследований большого числа людей, а также при диагностике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, пищевых токсикоинфекций и др. для направленного поиска конкретного возбудителя.

внимание!

Подробно изложенный выше классический микробиологический метод был использован при изучении состояния микробиоты просвета толстой кишки у лиц разного возраста.

В ходе работы изучена микрофлора 3268 «здоровых» и «больных» людей 7 возрастных групп (табл. 3). Для каждой возрастной группы были определены критерии оценки состояния здоровья для выделения категорий «здоровых» и «больных» [5, 10, 22]. Правильность разбиения больных на группы подтверждена с помощью комплекса статистических методов и многомерного кластерного анализа [2, 7, 20, 22]. Подробное описание проведенных исследований приведено в диссертационной работе «Микроэкологические основы коррекции “дисбиозной” микробиоты человека» [22].

Таблица 3

Объем исследований

Возраст	Количество обследованных		
	«здоровые»	«больные»	всего
24 ч – 6 сут	280	337	617
7–29 сут	180	178	358
1–11 мес.	245	290	535
1 год – 6 лет	209	235	444
7–17 лет	192	203	395
18–59 лет	236	234	470
От 60 лет и старше	180	269	449
Итого	1522	1746	3268

Данные бактериологических исследований микрофлоры кишечника проанализированы с помощью созданной нами программы – «Автоматизированная система микробиологического мониторинга микробиоценозов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ)» (свидетельство о государственной регистрации № 2011614233, зарегистрировано в реестре программ для ЭВМ 30.05.2011). Статистическая обработка результатов проводилась с использованием названной программы и прикладной программы STATISTICA 8.0 фирмы StatSoft. Критический уровень значимости принимали $p = 0,05$. В случае множественных сравнений проводилась корректировка критического уровня значимости с помощью поправки Бонферрони [7].

Оценка видового разнообразия микроорганизмов в микробиоте кишечника проводилась с помощью ранговых распределений. Для описания ранговых распределений применялась гиперболическая модель, адекватность которой оценивали при помощи коэффициента детерминации [13]. Для анализа перестройки ранговых распределений численности различных видов микроорганизмов микробиоты просвета толстой кишки человека по возрастным группам использован метод ранговых профилей [6].

Для подтверждения сделанных обобщений и получения статистически корректных оценок различий (t-критерий Стьюдента) в видовом разнообразии микрофлоры толстой кишки разновозрастных групп здоровых и больных людей был применен индекс Шеннона, для которого разработаны соответствующие алгоритмы [17].

После анализа и обобщения полученных данных было установлено, что у здоровых лиц разного возраста имеют место статистически значимые изменения видовой структуры микрофлоры толстой кишки, характерные для определенных возрастных групп. Поэтому для правильной оценки состояния микрофлоры потребовалось подразделение каждой из ранее выделяемых по ОСТ 91500.11.0004-2003 возрастных групп – 0–1 год и 1 год – 60 лет – минимум на три подгруппы: 24 ч – 6 сут, 7–29 сут, 1–11 мес. и 1 год – 6 лет, 7–17 лет, 18–59 лет.

На основании данных статистического и экологического анализа предложена сводная таблица качественного и коли-

Таблица 4

Качественный и количественный состав микробиоценоза толстого кишечника у здоровых людей (КОЕ/г фекалий)

№ п/п	Показатели	Возраст						
		24 ч – 6 сут	6–29 сут	1–11 мес.	1–6 лет	7–17 лет	18–59 лет	60 лет и старше
1	<i>Bifidobacterium</i> spp.	10^2-10^9	10^7-10^{10}	10^8-10^{11}	10^8-10^{11}	10^8-10^{11}	10^7-10^{10}	10^7-10^9
2	<i>Lactobacillus</i> spp.	10^3-10^8	10^8-10^9	10^7-10^{11}	10^7-10^9	10^7-10^{11}	10^7-10^9	10^7-10^9
3	<i>Lactococcus lactis</i>	10^2-10^8	Нет	10^7-10^{10}	10^7-10^9	10^9-10^{11}	10^7-10^9	10^8-10^9
4	<i>Clostridium</i> spp. и другие анаэробные микроорганизмы*	Нет	Нет	10^4-10^6	10^4-10^6	10^5-10^6	10^5	10^7
5	<i>Bacteroides</i> spp.**	Нет	Нет	10^5-10^6	10^7-10^8	10^7-10^8	10^7-10^8	10^7-10^8
6	<i>E. coli</i> лактозопозитивные	10^3-10^9	10^7-10^8	10^7-10^9	10^7-10^9	10^6-10^8	10^6-10^9	10^7-10^8
7	<i>E. coli</i> лактозонегативные	$<10^5$	$<10^5$	$<10^6$	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$
8	<i>E. coli</i> гемолитические	Нет	Нет	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$
9	<i>E. coli</i> (общее количество)	10^3-10^9	10^7-10^8	10^7-10^9	10^7-10^9	10^6-10^8	10^6-10^9	10^7-10^8
10	<i>Enterococcus</i> spp.	10^4-10^6	10^4-10^7	10^5-10^8	10^6-10^8	10^7-10^8	10^7-10^8	10^6-10^8
11	<i>S. epidermidis</i>	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$	$<10^4$	$<10^4$
12	<i>S. aureus</i>	$<10^4$	$<10^4$	$<10^5$	$<10^4$	$<10^4$	Нет	Нет
13	Опportunистические микроорганизмы (условно-патогенные микроорганизмы) семейства Enterobacteriaceae	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$
14	Неферментирующие грамотрицательные бактерии, в том числе <i>P. aeruginosa</i>	Нет	Нет	$<10^4$	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$	$<10^5$
15	Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i>	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$	$<10^4$
16	<i>Salmonella</i> spp.	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
17	<i>Shigella</i> spp.	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
18	<i>E. coli</i> энтеропатогенные, энтеротоксигенные, энтерогеморрагические, уропатогенные	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет

* Выделяются начиная с возраста 9–11 мес.

** Выделяются начиная с возраста 7–8 мес.

качественного состава микрофлоры просвета толстой кишки у здоровых людей (табл. 4).

При оценке полученных результатов нельзя учитывать отдельно количественную представленность каждого микроорганизма в микробиоценозе.

внимание!

Необходимо оценивать всю совокупность микроорганизмов как по количеству каждого, так и их соотношение. Это прежде всего касается снижения концентрации бифидобактерий на 1–2 порядка, снижения концентрации лактобактерий на 1–2 порядка, нарастания концентрации кишечных палочек с измененными свойствами, снижения концентрации нормальных кишечных палочек (менее 10^6 КОЕ/г) или увеличения их содержания (более 10^6 КОЕ/г), нарастания концентрации других условно-патогенных микроорганизмов [19].

Часто из-за сложности интерпретации результатов микробиологических нарушений при дисбактериозе кишечника (по таблице, приведенной в ОСТ 91500.11.0004-2003, с. 66–68) врачи в основном пользуются таблицей «Качественный и количественный состав основной микрофлоры толстого кишечника у здоровых людей» (ОСТ 91500.11.0004-2003, с. 65), принимая приведенные значения за «норму», и переносят их непосредственно в бланк результатов микробиологических исследований. В связи с этим трактовка результатов ведется только по количественной представленности того или иного микроорганизма в микробиоценозе, без учета количественного соотношения анаэробных и аэробных микроорганизмов.

На наш взгляд, более правильной будет предлагаемая схема оценки состояния микробиоты кишечника, основанная на комплексном подходе. Оценка проводится как с позиции количественной представленности отдельных видов микроорганизмов, так и соотношения анаэробов к аэробам (табл. 5).

Приведенные ниже примеры могут быть полезны для понимания предложенного алгоритма оценки результатов бактериологических исследований микробиоценозов просвета толстой кишки.

**Классификация дисбиоза по степени выраженности
бактериологических показателей**

	Признаки	Слабо выраженный дисбиоз кишечника (I степени)	Выраженный дисбиоз кишечника (II степени)	Резко выраженный дисбиоз кишечника (III степени)
«Анаэробы»* анаэробы и микро- аэрофилы	Соотношение аэробной и анаэробной флоры	Преобладает анаэробная флора	Соотношения равные	Преоблада- ет аэробная флора
	Наличие бифи- добактерий	10^7-10^8	Чаще присут- ствует один из родов <i>Bifido- bacterium</i> или <i>Lactobacillus</i> 10^6-10^7	Отсутствуют бактерии родов <i>Bifidobacterium</i> или <i>Lactobacillus</i> или резко угнетены (10^5 и менее)
	Наличие лак- тобактерий	10^7-10^8		
	Наличие бак- тероидов***	10^5-10^8	10^5-10^7	10^5-10^7
	Наличие кло- стридий**	10^4-10^7	10^4-10^7	10^4-10^7
«Аэробы» аэробы и факультативные анаэробы	Наличие <i>E. coli</i>	10^6-10^7	10^6-10^7	10^4-10^9
	Наличие условно-пато- генных микро- организмов, в том числе ге- молитических <i>E. coli</i> и <i>E. coli</i> со сниженной ферментатив- ной активност- ью	Наличие 1–2 видов услов- но-патоген- ных микро- организмов в количестве до 10^5-10^6 ****	Наличие ассо- циаций услов- но-патогенных микроорга- низмов по 3 вида и более в количествах 10^5-10^7 или один вид в количестве 10^5-10^7 *****	Наличие ассо- циаций услов- но-патогенных микроорганиз- мов по 3 вида и более в коли- чествах 10^5-10^8 или один вид в ко- личестве 10^5-10^7 *****

* Объединены анаэробные и микроаэрофильные микроорганизмы (лактоба-
циллы).

** Выделяются начиная с возраста 9–11 мес.

*** Выделяются начиная с возраста 7–8 мес.

**** У детей от 1 мес. до 1 года ассоциации по 3–4 вида [23].

***** Необходимо проводить дифференциальную диагностику при оценке ре-
зультатов между дисбиозом и кишечной инфекцией, вызванной условно-пато-
генными микроорганизмами, в частности пищевой токсикоинфекцией.

Ребенок, 7 месяцев.

Результаты микробиологического анализа: бифидобактерии – 1×10^9 КОЕ/г, лактобактерии – 2×10^8 КОЕ/г, *E. coli* – всего $1,3 \times 10^7$ КОЕ/г, лактозопозитивные – 13×10^6 КОЕ/г, лактозонегативные – 7×10^5 КОЕ/г, гемолитические – 2×10^6 КОЕ/г, бактериоды – 1×10^6 КОЕ/г, *Morganella morganii* – $1,4 \times 10^6$ КОЕ/г, *Klebsiella oxytoca* – $2,4 \times 10^6$ КОЕ/г. Если оценивать состав микрофлоры только по критериям т. н. норм (табл. 4), то мы увидим резко выраженные изменения – увеличение количества гемолитических *E. coli* на порядок, присутствие лактозонегативных форм эшерихий при сохранении общего количества кишечных палочек «в норме», увеличение условно-патогенных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* – *Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca* на порядок. Также обращает на себя внимание выделение ассоциации условно-патогенных микроорганизмов (4 вида).

пример

Оценивая соотношения между аэробной и анаэробной флорой (согласно табл. 5), можно отметить преобладание анаэробной флоры на два порядка – наличие бифидобактерий, лактобактерий и бактериодов в количествах 10^7 – 10^9 КОЕ/г, наличие *E. coli* в количестве 10^7 , в т. ч. лактозонегативных и гемолитических, и выделение четырех видов условно-патогенных микроорганизмов (*Morganella morganii*, *Klebsiella oxytoca*, *E. coli* лактозонегативных и гемолитических в количествах 10^5 – 10^6). Таким образом, у ребенка состояние микробиоты кишечника по микробиологическим показателям нужно расценивать как слабо выраженный дисбиоз первой степени.

Взрослый, 33 года.

Результаты микробиологического анализа: бифидобактерии – 1×10^7 КОЕ/г, лактобактерии – 2×10^6 КОЕ/г, лактококки – 2×10^6 КОЕ/г, *E. coli* – всего $1,8 \times 10^7$ КОЕ/г, лактозопозитивные – $1,8 \times 10^7$ КОЕ/г, бактериоды – 1×10^7 КОЕ/г, *Klebsiella oxytoca* – 2×10^5 КОЕ/г.

пример

Если оценивать микрофлору только по критериям табл. 4, то мы не увидим выраженных изменений в ее составе. В пределах «нормы» сохраняется коли-

чество бифидобактерий и бактероидов, незначительно снижено количество лактобактерий, сохранено количество кишечных палочек, не превышающее представленных в таблице значений. Отсутствуют измененные формы кишечных палочек, выделяется один вид условно-патогенных микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae* – *Klebsiella oxytoca* в количестве, соответствующем верхней границе «нормы». При оценке соотношения аэробов и анаэробов обращает на себя внимание равное соотношение анаэробной и аэробной части флоры (бифидобактерии, бактероиды и кишечная палочка в количестве 10^7 КОЕ/г). Обнаружена *Klebsiella oxytoca* в количестве 2×10^5 КОЕ/г. Следовательно, у данного больного состояние микробиоты кишечника по микробиологическим показателям нужно расценивать как выраженный дисбиоз второй степени.

пример

В приведенных примерах дана оценка только результатов бактериологического исследования. Для постановки диагноза необходимо кроме микробиологических показателей учитывать анамнез и жалобы пациента, данные физикального и копрологического исследования [19].

Необходимо отметить, что оценка характера микрофлоры только с позиции «норм» для отдельных видов микроорганизмов приводит, с одной стороны, к гипердиагностике дисбиозов, а с другой – к пропуску случаев кишечных инфекций (в т. ч. пищевых токсикоинфекций и внутрибольничных инфекций), вызванных условно-патогенными микроорганизмами.

Список использованной литературы

1. Ардатская М.Д., Бельмер С.В., Добрица В.П. и др. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2015. № 5 (117). С. 13–50.
2. Банержи А. Медицинская статистика понятным языком: вводный курс / пер. с англ. под ред. В.П. Леонова. М.: Практическая медицина, 2007. 287 с.

3. Бондаренко В.М., Лиходед В.Г. Микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника: методические рекомендации. М.: ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, 2007. 68 с.
4. Васильева Н.В., Елинов Н.В., Богомолова Т.С. и др. Методические рекомендации. Микологические культуральные исследования: методические рекомендации. СПб: ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России. 2013. 56 с.
5. Вельтищев Ю.Е., Ветров В.П. Объективные показатели нормального развития и состояния здоровья ребенка (нормативы детского возраста). М.: 2000. 96 с.
6. Гелаишвили Д.Б., Басуров В.А., Ефимова (Зазнобина) Н.И. Эколого-экономический анализ экотоксикологической опасности промышленных предприятий города Н. Новгорода // Экологический ежемесячник. 2001. № 7 (82). С. 22–25.
7. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с.
8. Диагностика и биокоррекция нарушений антиинфекционного гомеостаза в системе «Мать-дитя»: книга практического врача (под ред. Е.И. Ефимова, К.Я. Соколовой). Н. Новгород: НижГМА, 2004. 376 с.
9. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению. 2-е изд., испр. и доп. (под ред. Е.И. Ткаченко, А.Н. Суворова). СПб: ИнформМед, 2009. 276 с.
10. Казин Э.М., Блинова Н.Г., Литвинова Н.А. Основы индивидуального здоровья человека: введение в общую и прикладную валеологию. М.: Гуманит. изд. центр ВЛАДОС, 2000. 192 с.
11. Куваева И.Б. Обмен веществ организма и кишечная флора. М.: Медицина, 1976. 248 с.
12. Лабораторная диагностика сальмонеллез, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды: методические указания – введ. 02.09.2010. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. 2011. 111 с.
13. Левич А.П., Забурдаева Е.А., Максимов В.Н. и др. Поиск целевых показателей качества для биоиндикаторов экологического состояния и факторов окружающей среды (на примере водных объектов реки Дон) // Водные ресурсы. 2009. Т. 36. № 6. С. 730–742.
14. Методические указания по лабораторной диагностике заболеваний, вызываемых *Escherichia coli*, продуцирующих шига-токсины (STEC-культуры), и обнаружению возбудителей STEC-инфекций в пищевых продуктах МУК 4.2.2963-11 – введ. 19.08.2011. М.: изд-во Госстандартов, 2011. 57 с.

15. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызываемых энтеробактериями МУ 04-723/3 – введ. 17.12.1984. М.: Минздрав СССР, 1984.
16. Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов: методические указания № 2.3.2.2789-10. М.: Роспотребнадзор. 2010. 71 с.
17. *Мэгарран Э.* Экологическое разнообразие и его измерение / Пер. с англ. М.: Мир, 1992. 184 с.
18. Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».
19. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. ОСТ 91500.11.0004-2003 – введ. 06.09.2003. М.: изд-во Госстандартов, 2003. 172 с.
20. *Сергиенко В.И., Бондарева И.Б.* Математическая статистика в клинических исследованиях. 2-е изд., перераб. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 304 с.
21. Совершенство методов диагностики дисбактериозов толстого кишечника: информационное письмо – введ. 22.11.2002. СПб: ФГУ «Центр госсанэпиднадзора в г. Санкт-Петербурге». 2002.
22. *Соловьева И.В.* Микроэкологические основы коррекции «дисбиозной» микробиоты человека / дисс... д-ра биол. наук, утв. 11.03.2014. Н. Новгород, 2013. 396 с.
23. *Соловьева И.В., Белова И.В., Точилина А.Г., Жирнов В.А., Иванова Т.П.* Микроэкологические основы коррекции «дисбиозной» микробиоты человека // Медицинский альманах. 2013. № 2 (26). С. 60–65.
24. *Шендеров Б.А.* Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. III: Пробиотики и функциональное питание. М.: ГРАНТЪ, 2001. 288 с.
25. *Эпштейн-Литвак Р.В., Вильшанская Ф.А.* Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника: методические рекомендации. М., 1977. 22 с.



Бактериологическая диагностика дифтерийной инфекции

А.П. Шепелин

*д-р биол. наук, заместитель директора
по научно-производственной работе*

*Федеральное бюджетное учреждение науки
«Государственный научный центр прикладной микробиологии
и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ), Московская обл., п. Оболенск*

*Для уточнения биологических свойств питательной среды корине-бакагар проведены эксперименты по определению показателей чувствительности среды, скорости роста и стабильности основных биологических свойств микроорганизмов и определению ингибирующих свойств этой и других питательных сред. Особое внимание уделяли оценке времени формирования колоний *C. diphtheriae*, интенсивности их роста, размера и культурально-морфологических свойств. Установлено, что питательная среда коринебакагар обладает улучшенными по сравнению с кровяно-теллуриновым агаром ростовыми свойствами. Ее применение позволяет повысить качество бактериологической диагностики дифтерийной инфекции.*

Современная лабораторная диагностика дифтерийной инфекции позволяет установить диагноз, принять решение о проведении специфической терапии, оценить и спрогнозировать эпидемиологическую ситуацию.

Методическую помощь по вопросам взятия, транспортировки и лабораторной диагностики дифтерии осуществляют региональные центры по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV групп патогенности на базе ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора в субъектах РФ и референс-центр по мониторингу дифтерии на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора.

Бактериологический метод в лабораторной диагностике дифтерии является основным и используется с диагностической, профилактической и эпидемиологической целью. Задача исследования – выявить возбудителя с применением минимального количества диагностических тестов: необходимых, достаточных и специфичных для получения достоверного ответа в максимально сжатые сроки. Сроки составляют:

- ~ не менее 3 сут – для получения отрицательного ответа;
- ~ 3–4 сут – ответа о выделении токсигенных коринебактерий дифтерии (возбудителя дифтерии);
- ~ 4–5 сут – ответа о выделении нетоксигенных коринебактерий дифтерии или других представителей этого рода.

Чтобы добиться максимальной высеваемости коринебактерий дифтерии и роста колоний, видимых невооруженным глазом через 24 ч, должны быть созданы оптимальные условия для роста и размножения бактерий, сохранения их биологических и культурально-морфологических свойств, а также для ингибирования роста сопутствующей микрофлоры. Питательная среда должна обеспечивать условия для накопления и выделения бактерий при минимальном их содержании в анализе. Поэтому качество питательной среды имеет важнейшее значение.

Каждая новая серия питательной среды (как готовой, так и приготовленной в лабораторных условиях) подлежит бактериологическому контролю [1].

Для выделения коринебактерий из инфицированного материала в соответствии с методическими указаниями МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» [4] широко используют селективные дифференциально-диагностические кровяные теллуритовые среды лабораторного приготовления – кровяно-теллуритовый агар (КТА) и Клауберг II.

Основой для этих сред служат сухой питательный агар, питательный агар на основе панкреатического гидролизата рыбной муки, среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам сухая (АГВ). *Ex tempore* добавляется кровь либо любые гемолизированные кровяные добавки, глицериновая смесь, теллурит калия. Теллурит калия включен в питательные среды в качестве ингибитора сопутствующей микрофлоры, т. к. в определенных концентрациях он не препятствует росту большинства штаммов коринебактерий дифтерии.

На средах, содержащих теллурит калия, *C. diphtheriae* формирует колонии темно-серого или черного цвета, т. к. за счет продукции теллуритредуктазы происходит восстановление металлического теллура и его накопление в клетках бактерий.

к сведению

Питательная среда коринебакагар производства ФБУН ГНЦ ПМБ отличается тем, что в нее не нужно добавлять кровь. Оригинальный состав данной питательной среды запатентован [6]. В качестве заменителя крови использован стимулятор роста гемофильных микроорганизмов (СРГМ), полученный путем ферментативного гидролиза суспензии черного альбумина с последующей сушкой методом распыления. Введение в состав среды СРГМ позволило получить питательную среду, биологические свойства которой находятся на уровне КТА и среды Клауберга II. Выявляемость коринебактерий на коринебакагаре, по сравнению со средой Клауберга II, составляет более 90% [2, 5]. В коринебакагаре регламентируется отсутствие роста стафилококка и стрептококка из 10^{-4} разведения. Отличием питательных сред лабораторного приготовления по МУК 4.2.3065-13 является наличие роста единичных колоний стафилококка из высоких концентраций, что довольно часто встречается при применении КТА.

Коринебакагар широко используется в российских бактериологических лабораториях. Однако в МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» о коринебакагаре сказано, что он уступает кровяным средам по ингибирующей активности и ростовым свойствам (образуются колонии меньшего размера на 1-е сутки роста, или же они могут появляться только на 2-е сутки).

Для уточнения биологических свойств коринебакагара в мае 2015 г. на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора совместно с сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ были проведены межучрежденческие испытания биологических свойств 6 серий питательной среды. Результаты испытаний отражены в совместной публикации [3].

Для контроля эффективности коринебакагара использовали тест-штаммы микроорганизмов *C. diphtheriae gravis* 665, *C. diphtheriae mitis* 6765, *C. ulcerans* 675 и *C. xerosis* 1911, *S. aureus* Wood-46, *S. pyogenes* Dick I из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk», а также тест-штаммы *C. diphtheriae* биовара *gravis* токсигенный № 665 из коллекции ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора и *St. aureus* № 25923 из коллекции ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Результаты экспериментов учитывали по определению специфической активности: показатели чувствительности среды, скорости роста и стабильности основных биологических свойств микроорганизмов – и определению ингибирующих свойств питательных сред. Особое внимание уделяли оценке времени формирования колоний *C. diphtheriae*, интенсивности их роста, размера и культурально-морфологических свойств.

Через 20–24 ч инкубации при визуальном просмотре чашек (в т. ч. под микроскопом при увеличении в 25 раз) колонии штаммов коринебактерий выглядели следующим образом:

- ~ ***C. diphtheriae gravis* 665:** на коринебакагаре – темно-серые, круглые, уплощенные, со слегка неровными краями и несколько шероховатой поверхностью; диаметр большинства колоний – 1,5 мм. На сывороточном агаре – круглые бесцветные колонии диаметром 1,2–1,5 мм. На КТА – темно-серые, шероховатые, плосковатые, с неровным краем, незначительной радиальной исчерченностью, диаметром 1,5 мм;
- ~ ***C. diphtheriae mitis* 6765:** на коринебакагаре – темно-серые, круглые, выпуклые, блестящие, с ровными краями, диаметр большинства колоний 1,6 мм. На сывороточном агаре – круглые бесцветные гладкие колонии диаметром 1,8 мм. На КТА – серовато-черные гладкие колонии диаметром 1,6 мм;
- ~ ***C. ulcerans* 675:** на коринебакагаре – темно-серые, круглые, выпуклые блестящие, с серебристым ободком по краю, диаметр большинства колоний 0,4 мм. На сывороточном агаре – круглые бесцветные колонии диаметром 0,2–0,4 мм. На КТА – рост отсутствовал;
- ~ ***C. xerosis* 1911:** на коринебакагаре – темно-серые, круглые, выпуклые, блестящие, гладкие колонии с ровными краями, диаметр большинства колоний 1,0 мм. На сывороточном агаре – круглые бесцветные гладкие колонии диаметром 1,2 мм. На КТА – сероватые гладкие колонии диаметром 1,2 мм.

Через 44–48 ч инкубации при визуальном просмотре чашек колонии коринебактерий выглядели следующим образом:

- ~ ***C. diphtheriae gravis* 665:** на коринебакагаре – темно-серые, шероховатые, со складчатой поверхностью и неровными (изрезанными) краями (тип «маргаритки»), диаметром 3,5 мм. На сывороточном агаре – круглые бесцветные колонии с неярко выраженным центром и неровными краями, диаметром 4,0 мм. На КТА – черные слегка уплощенные колонии с незначительной радиальной исчерченностью и неровными краями, диаметром 2,5–3,5 мм;
- ~ ***C. diphtheriae mitis* 6765:** на коринебакагаре – темно-серые, круглые, гладкие, блестящие, с ровными краями, диаметром 3,0 мм. На сывороточном агаре – круглые, гладкие, слегка выпуклые, бесцветные колонии диаметром 4,0 мм. На КТА – черные гладкие блестящие колонии диаметром 2,5–2,8 мм;
- ~ ***C. ulcerans* 675:** на коринебакагаре – серовато-черные, круглые, выпуклые, блестящие колонии диаметром 0,5–1,5 мм. На сывороточном агаре – круглые, блестящие, бесцветные, гладкие колонии диаметром 2,5 мм. На КТА рост отсутствовал;

~ *C. xerosis* 1911: на коринебакагаре – серовато-черные, круглые, выпуклые, блестящие колонии диаметром 1,2–2,0 мм. На сывороточном агаре – круглые, блестящие, бесцветные, выпуклые колонии диаметром 2,5–2,8 мм. На КТА – серовато-черные блестящие выпуклые колонии диаметром 2,2 мм.

Также обнаружено, что по количеству вырастающих колоний коринебакгар не только не уступает контрольной среде КТА, но и в ряде случаев ее превосходит (таблица).

**Количество колоний на разных питательных средах
при различных разведениях**

Наименование	Разведение	Количество колоний на коринебакагаре	Количество колоний на кровяно-теллуриновом агаре
<i>C. diphtheriae gravis</i> 665	10^{-7}	16–20	20
	10^{-6}	55–73	44
<i>C. diphtheriae mitis</i> 6765	10^{-7}	11–17	18
	10^{-6}	50–61	42
<i>C. ulcerans</i> 675	10^{-7}	7–14	Роста нет
	10^{-6}	12–22	Роста нет
<i>C. xerosis</i> 1911	10^{-7}	5–13	5
	10^{-6}	46–51	Нет данных

При оценке ингибирующей активности всех серий коринебакагара отметили отсутствие роста *S. aureus* Wood-46 и *S. pyogenes* Dick I на всех засеянных чашках Петри при посеве по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-4} в течение 48 ч при температуре 37 ± 1 °С. На контрольной питательной среде на основе панкреатического гидролизата рыбной муки наблюдался сплошной рост вышеуказанных культур.

Результаты испытаний были положены в основу информационного письма руководителя Роспотребнадзора А.Ю. Поповой «О результатах проведения внешнего контроля качества исследований по диагностике дифтерии и качества питательных сред в Российской Федерации» [7].

В письме указано, что сравнительные испытания выборочных серий питательных сред, используемых на территории РФ, показали их соответствие требованиям МУК 4.2.3065-13 по биологическим показателям. Все среды обладают высокой ростовой ценностью, обеспечивают однородность культурально-морфологических признаков коринебактерий дифтерии, визуальное обнаружение роста культур через 24 ч, проявля-

ют хорошую ингибирующую активность в отношении сопутствующей микрофлоры.

Таким образом, коринебакагар обладает улучшенными по сравнению с КТА ростовыми свойствами. Его применение позволяет повысить качество бактериологической диагностики дифтерийной инфекции.

Список использованной литературы

1. Харсеева Г.Г., Алутина Э.Л., Гасретова Т.Д., Дятлов И.А., Лабушкина А.В., Миронов А.Ю., Шепелин А.П. Дифтерия: микробиологические и иммунологические аспекты. М.: Практическая медицина. 2014. 241 с.
2. Шепелин А.П. Отечественная питательная среда – коринебакагар для выделения возбудителя дифтерии // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2012. № 4. С. 109–111.
3. Шепелин А.П. Сравнительная характеристика питательных сред для выделения коринебактерий // Клиническая лабораторная диагностика. 2016. № 1. С. 59–64.
4. Методические указания МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».
5. Методические указания МУК 4.2.3065-13 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».
6. Патент № 2041947 Российская Федерация, МПК6 С 12 N 1/20. Питательная среда для выделения дифтерийного микроба / А.П. Шепелин и др.; заявл. 04.03.1992; опубл. 20.08.1995.
7. Письмо Роспотребнадзора № 01/15524-15-27 от 16.12.2015 «О результатах проведения внешнего контроля качества исследований по диагностике дифтерии и качества питательных сред в Российской Федерации».



ПОВЫШЕНИЕ КВАЛИФИКАЦИИ

Организационные аспекты деятельности лаборатории по вопросам этиологической диагностики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи

Ю.А. Захарова

*д-р мед. наук, заведующая клинко-диагностической лабораторией
Пермского клинического центра ФМБА России,
доц. кафедры эпидемиологии Пермского
государственного медицинского университета,
ведущ. науч. сотр. НПО «Микроген» (филиал НПО «Биомед»),
г. Пермь*

«Одним из ведущих направлений профилактики инфекций является их своевременная лабораторная диагностика с изучением биологических свойств возбудителя. Последнее приобретает особую значимость при внутрибольничных гнойно-септических инфекциях. Лабораторная диагностика составляет основу микробиологического обеспечения системы эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи».*

Хорошо известно, что микробиологическая лаборатория играет ключевую роль в этиологической расшифровке инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), обосновании антибактериальной терапии и оценке ее эффективности, выявлении формирования и особенностей циркуляции внутрибольничных клонов микроорганизмов, формировании стратегии и тактики использования противомикробных и дезинфицирующих средств, оценке качества проводимых дезинфекционных и стерилизационных мероприятий [9]. Требования к организации

* Национальная концепция профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 06.11.2011).

работы лаборатории определяются системой менеджмента в рамках Национального стандарта РФ ГОСТ Р ИСО-15189-2012 [3]. Признанием соответствия организации работы лаборатории и качества проводимых мероприятий является ее аккредитация.

Оснащение лаборатории, участвующей в диагностике и профилактике ИСМП возложено на руководителя подразделения и госпитального эпидемиолога. Оно должно обеспечить качественное выполнение трех основных этапов лабораторного исследования: преаналитического, аналитического и постаналитического.

Преаналитический этап

Результативность и эффективность работы лаборатории во многом зависит от внешних факторов. Исходя из этого, особое внимание следует уделить регламенту взаимодействия клинической и лабораторной служб внутри учреждения и (или) с субподрядными организациями (внешними лабораториями). Во всех случаях специалисты лаборатории, с учетом специфики учреждения, должны разработать четкие указания сотрудникам клинических подразделений, в какое время и каким образом следует осуществлять забор планируемого к исследованию биологического материала, с указанием объема пробы и вида наполнителя (в случае использования транспортных систем заводского производства). Такие указания должны быть утверждены руководителем лечебно-профилактического учреждения (ЛПУ) и направлены в клинические подразделения, сотрудники которых осуществляют заказ соответствующих лабораторных исследований и взятие биологического материала для его выполнения (ИСО 15189). Правильное оформление направления на исследование является неотъемлемой частью преаналитического этапа.

Методика забора материала для микробиологического исследования

С целью повышения качества работы в части объективизации результатов исследований деятельность микробиологических лабораторий по этому разделу была унифицирована – в 2005 г. были утверждены Методические указания МУ 4.2.2039-05 [6]. В документе отражены основные требования к методам забора биологического материала, организации его хранения и транспортировки. Особое место отводится вопросам профилактики инфицирования персонала и пациентов путем сведения к минимуму непосредственного контакта проб биологического материала с руками медицинских работников и соблюдения асептических условий в процессе выполнения инвазивных манипуляций. Именно поэтому использование стерильной лабораторной посуды заводского производства является приоритетным.

Взятие проб биологического материала для проведения микробиологических исследований необходимо осуществлять до начала антибактериальной терапии, при отсутствии такой возможности – непосредственно перед повторным введением (приемом) препарата, в достаточном для выполнения анализа количестве, с минимальным загрязнением образца посторонней микрофлорой и нормофлорой локусов организма. Перед взятием пробы учитывают пользу и возможные риски для пациента, а также значимость исследования данного вида биологического материала для целей объективизации клинического диагноза и оценки проводимых или планируемых лечебных (профилактических) мероприятий.

Получение у пациента любой пробы, требующей инвазивного вмешательства, рекомендуется проводить врачу. Исключение составляют пробы крови, которые может забирать процедурная медицинская сестра.

Учитывая важность создания асептических условий при заборе проб от особого контингента пациентов (родильницы и новорожденные), в работе рекомендуют использовать транспортные среды и стерильную лабораторную посуду только заводского производства. Если сроки доставки материала не превышают 2 ч, отбор проводят в стерильные контейнеры или тупферы для взятия мазков. Исключение составляют микроорганизмы, требующие специальных условий культивирования: вирусы, хламидии, анаэробная микрофлора, возбудитель туберкулеза, для которых использование специальных транспортных сред является обязательным, как и при длительной транспортировке биологического материала. Правила забора проб представлены в МУ 4.2.2039-05 [6], рекомендациях федерального и регионального уровня [4], включающих взятие биологического материала, не регламентированное МУ [15] или требующее существенных уточнений [14].

Хранение и транспортировка проб

Условия хранения и транспортировки биологического материала должны обеспечить сохранение жизнеспособности и предотвратить размножение находящихся в нем микроорганизмов. Регламент сбора и транспортировки, как и забора биоматериала, детализирован в МУ 4.2.2039-05. Для хранения и транспортировки проб в пределах лечебного учреждения достаточно использовать стерильные контейнеры (тупферы), исключающие контаминацию образца и окружающей среды. Доказано, что в подавляющем большинстве случаев качественный и количественный состав бактерий в образце биологического материала в течение 2 ч при комнатной температуре не меняется [8]. Исключение составляют строгие анаэробы. Очевидно, что выдержать указанный срок возможно только при наличии лаборатории в структуре лечебного учреждения. Го-

товые транспортные среды, как указывают их производители, позволяют сохранить количественный и качественный состав бактериальной флоры в образце в течение 24–48 ч при комнатной температуре. Несмотря на это в лаборатории целесообразно проводить их валидацию (выборочные исследования для подтверждения заявленных производителями характеристик). Следует признать неадекватным использование питательных сред и стерильной посуды лабораторного приготовления. Прежде всего это относится к исследованию гемокультуры. Стандартом диагностики бактериемии должно стать использование соответствующих питательных сред (флаконов) промышленного производства, оптимальный вариант – помещение этих флаконов в автоматические анализаторы для регистрации роста бактерий. Можно устанавливать анализатор непосредственно в лечебном подразделении, например в отделении реанимации и интенсивной терапии. Это позволит помещать флаконы в прибор непосредственно после их заполнения и при наличии положительного сигнала оперативно получить предварительный результат.

Преаналитический этап завершается доставкой биологического материала в лабораторию, его регистрацией в лабораторной информационной системе (эффективность использования такой системы повышается при наличии штрихкодирования образцов) и первичным посевом на плотные и жидкие питательные среды.

Методы первичного посева

В большинстве бактериологических лабораторий техника посева биологических образцов основана на ручном труде и регламентируется приказом Минздрава СССР от 22.04.1985 № 585 [8] и Методическими рекомендациями Минздрава РСФСР от 19.12.1991 [5]. В ряде лабораторий используют методики исходя из профиля обслуживаемых отделений, на основе региональных рекомендаций. Лишь для посева проб мочи, согласно национальным клиническим рекомендациям, разработана стандартная операционная процедура [14].

Технологические аспекты проведения качественного первичного посева биологического материала в последние годы связаны с использованием автоматизированных микробиологических комплексов: Previ-Isola (BioMerieux), Innova (Becton Dickinson), Inocula (RIESTRA), WASP (Copan). В этих комплексах удалось оптимизировать один из самых критичных этапов микробиологических исследований.

Техника первичного посева материала предусматривает использование специальных микробиологических приемов, позволяющих, с одной стороны, определить количественный состав присутствующих в образце микроорганизмов, с другой – получить на средах первичного посева изолированные колонии для дальнейшего изучения.

Выделение чистых культур микроорганизмов и их идентификация являются ключевым звеном аналитического этапа микробиологического исследования.

Аналитический этап

Аналитический этап бактериологических исследований начинается с изучения ведущих биологических свойств микроорганизмов и включает микроскопию, видовую идентификацию, оценку чувствительности к антимикробным препаратам, внутривидовое типирование (маркирование), поиск детерминант резистентности и пр. и завершается выдачей результата.

Видовая идентификация микроорганизмов

Работа по идентификации бактерий начинается еще до выделения чистой культуры. Культуральные свойства выращенных на плотной питательной среде бактериальных изолятов включают форму, размер колоний, наличие пигмента, способность к росту при определенной температуре и при концентрации газа определенного состава. У выращенных на жидкой среде бактерий можно изучить характер образования осадка, оценить степень мутности, газообразования, изменения цвета питательной субстанции и т. д.

Кроме культуральных свойств, у колоний на средах первичного посева иногда могут быть определены некоторые биохимические (наличие ферментов) и антигенные (в реакции агглютинации) свойства, факторы патогенности (лицетовителлаза, ДНК-аза, фосфолипаза и пр). Важной составляющей при изучении колоний являются микроскопические исследования.

Одной из инноваций в области культивирования микроорганизмов является использование хромогенных питательных сред (Oxoid, BioMerieux, HiMedia). Эти среды имеют в своем составе специальные питательные субстраты, изменяющие цвет колоний при росте отдельных видов бактериальных патогенов, что позволяет уже на следующий день после первичного посева получить предварительный результат.

Хромогенные питательные среды имеют важное диагностическое значение при проведении исследований для выявления определенных видов микрофлоры (например, при работе в очагах ИСМП установленной этиологии).

внимание!

При работе в плановом режиме их можно использовать при проведении видовой диагностики микроорганизмов, что позволяет исключить трудоемкие этапы приготовления питательных основ, постановки многочисленных биохимических дифференцирующих тестов, которые используют в классической схеме идентификации.

В последние годы все чаще для дифференциации бактерий применяют готовые тест-системы, что позволяет не только повысить точность, сократить время анализа, но и унифицировать бактериологические методы для сопоставления результатов исследований, проводимых в лабораториях различных организаций. Инкубация посевного материала в таких тест-системах проводится в обычных термостатах с последующим учетом результатов и использованием кодовых книг. Наиболее удобным представляется использование автоматических бактериологических анализаторов (Bactek, Vitek, Vidas, WalkAway и др.) со считывающим устройством («ридером»), где в закрытом режиме происходят инкубация, считывание, анализ и архивация результатов.

В качестве перспективного метода идентификации бактерий в последнее время рассматривают определение нуклеотидных последовательностей консервативных генов, прежде всего генов 16S рРНК методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. Принципиальным преимуществом данного метода, кроме сокращения времени исследования (от 8 ч до нескольких минут), является низкая себестоимость расходных материалов.

Способы идентификации патогенов, не связанные с культивированием, преимущественно основаны на применении полимеразной цепной реакции (ПЦР) для отдельных видов микроорганизмов, прежде всего вирусов, трудно культивируемых бактерий, возбудителей тяжелых зоокоммунальных инфекций и сепсиса (представителей *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*).

Определение факторов патогенности (вирулентности)

Патогенность как биологический признак бактерий реализуется через их три свойства: инфекционность, инвазивность и токсигенность. Изучение факторов патогенности (вирулентности) бактерий для эпидемиологической и клинической диагностики возбудителей гнойно-септических инфекций (ГСИ) – чрезвычайно важный этап при оценке биологических свойств микроорганизмов, поскольку именно вирулентность является одним из ведущих признаков госпитального штамма. К наиболее информативным, доступным и хорошо описанным методам оценки факторов вирулентности энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных бактерий можно отнести определение адгезивной активности, капсулообразования, слизиобразования, пленкообразования, интенсивности дыхания, отсутствие подвижности и способности к разложению лактозы (у лактозопозитивных и подвижных видов), выработку гемолизинов, ДНК-азы, протеолитических ферментов. У стафилококков необходимо выявлять продукцию плазмокоагулазы, лецитовителлазы, ДНК-азы, пигментообразование, пленкообразование, персистентные свойства, анти-

лизоцимную, антиинтерфероновую, антикомплементарную активность. У энтерококков и коринебактерий можно определить антилизоцимную, антиинтерфероновую и антикомплементарную активность, у грибов рода *Candida* – выработку фосфолипазы и т. д. [17].

С развитием новых технологий в области молекулярной генетики с каждым годом у микроорганизмов открывают новые детерминанты патогенности. Следовательно, будут появляться и новые методы для их оценки.

До настоящего времени остается дискуссионным вопрос о детерминантах резистентности микроорганизма к антибиотикам как фактора патогенности (инвазии). Данная дискуссия выходит за рамки представленной статьи. Вместе с тем именно в этом разделе отметим, что детекция генов антибактериальной резистентности с использованием методов молекулярной генетики является одним из перспективных и востребованных методов при эпидемиологическом типировании (маркировании) внутрибольничных штаммов.

Важно отметить необходимость информирования лечащего врача и госпитального эпидемиолога о промежуточных результатах исследования на основе микроскопии первичного материала, сокращенных схем идентификации по определению видовой принадлежности, экспресс-тестов по оценке факторов патогенности и детекции механизмов антибиотикорезистентности клинически и эпидемиологически значимых штаммов. Доступность такой информации позволит клиницистам обосновать назначение пациенту эмпирической антимикробной терапии, эпидемиологам – предотвратить формирование и распространение внутрибольничных популяций (клонов) микроорганизмов, оперативно принять управленческие решения в период локализации эпидемических очагов ГСИ.

Внутривидовое типирование бактериальных изолятов

Внутривидовое типирование микроорганизмов является неотъемлемой частью работы бактериологической лаборатории в рамках эпидемиологического надзора за ИСМП. Именно типирование (маркирование) позволит провести их сопоставление по определенным биологическим свойствам и ответить на вопрос о видовом (внутривидовом) разнообразии циркулирующей популяции в лечебном учреждении или структурном подразделении, установить наличие или отсутствие внутрибольничных штаммов.

К современным методам внутривидового типирования микроорганизмов относят фенотипические и генотипические, в их числе:

- ~ культуральный (характер роста на питательных средах);
- ~ биохимический (отношение к утилизации сахаров, аминокислот, спиртов и др.);
- ~ серологический (агглютинация с соответствующими сыворотками в реакции агглютинации, коагглютинации и др.);

- ~ антибиотикограмма (диско-диффузионный метод, Е-тест, метод серийных разведений);
- ~ фагограмма (на плотных и жидких питательных средах по методу Грация и Аппельмана);
- ~ антагонистической активности;
- ~ с использованием анилиновых красителей;
- ~ молекулярно-биологический (ПЦР, мультилокусное и полногеномное секвенирование, гель-электрофорез в пульсирующем поле, MALDI-TOF масс-спектрометрия в различных модификациях и др.).

Несомненно, учитывая активное развитие микробиологической науки и практики, количество этих методов будет увеличиваться, как и улучшаться их достоверность и востребованность.

Основная работа ложится на референс-лаборатории, которые должны координировать усилия с межведомственными лабораториями по микробиологической диагностике возбудителей ИСМП и стать научно-методическими центрами. Одной из важнейших задач таких референс-центров является расшифровка генома актуальных возбудителей ИСМП и детекция механизмов антибиотикорезистентности.

Оценка чувствительности к антимикробным препаратам

Чувствительность к антибиотикам. Основной целью при определении чувствительности микроорганизмов к антимикробным агентам является прогнозирование этиотропной терапии и антибиотикопрофилактики, слежение за распространением резистентности среди микроорганизмов, внутривидовое типирование госпитальных штаммов. Методами определения антибиотикочувствительности микроорганизмов являются:

- ~ метод серийных разведений (количественный, референтный);
- ~ диско-диффузионный метод (полуколичественный);
- ~ Е-тест (промежуточный).

Референтный метод последовательных серийных разведений в повседневной практике микробиологических лабораторий не нашел широкого применения из-за значительной трудоемкости. Однако именно относительно этого метода «калибруются» как наиболее распространенный в рутинной практике диско-диффузионный метод, так и различные тесты заводского производства (Е-тест). Результаты оценки антибиотикочувствительности бактерий, полученные с помощью референтного метода (серийных разведений), используют для обоснования микробиологических и клинических критериев чувствительности.

Метод серийных разведений, Е-тест и диско-диффузионный метод могут быть использованы и для оценки сопоставимости внутрибольничных штаммов.

Следует отметить, что при осуществлении эпидемиологического исследования ИСМП на основе сопоставимости антибиотикограмм (определения минимальной подавляющей концентрации, МПК) необходимо учитывать возможность вариабельности полученных результатов в интервале 4–8-кратных последовательных разведений [16]. Сопоставимыми по антибиотикограмме, полученной диско-диффузионным методом, считаются изоляты, различающиеся не более чем на 2–3 антибиотика при одновременной постановке чувствительности не менее чем к 10 профильным препаратам, согласно критериям определения EUCAST – «чувствительный», «умеренно устойчивый», «устойчивый».

В настоящее время теоретически обоснованным считается подход к оценке чувствительности, предлагаемый Европейским комитетом по тестированию антимикробной чувствительности (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST). Идеология EUCAST основана на признании факта существования различий между микробиологической и клинической чувствительностью/устойчивостью микроорганизмов. Для обоснования клинических критериев EUCAST использует фармакокинетические/фармакодинамические закономерности/зависимости между величиной МПК антибактериального препарата в отношении микроба-возбудителя, фармакологическими характеристиками препарата и эффективностью лечения. Поэтому в России на смену основному документу – МУК 4.2.1890-04, базирующемуся на принципах американской системы NSSLS, пришли национальные клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (2014 г.) [7], в которых даны методология оценки чувствительности бактерий и дрожжей, пограничные значения МПК и зон подавления роста для определения клинических категорий чувствительности, экспертные правила оценки чувствительности по системе EUCAST.

Чувствительность к дезинфицирующим средствам. Эпидемиологическую значимость устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам трудно переоценить. Именно она способствует возникновению вспышек внутрибольничных инфекций, определяет эпидемиологическое благополучие в учреждении и способствует формированию внутрибольничных популяций (клонов) [2]. Как указывает основной документ, регламентирующий работу медицинских организаций, – СанПиН 2.1.3.263010, «в целях предупреждения возможного формирования резистентных к дезинфектантам штаммов микроорганизмов следует проводить мониторинг устойчивости госпитальных штаммов к применяемым дезинфицирующим средствам с последующей их ротацией при необходимости» [10]. В настоящее время документами, регламентирующими работу в этом направлении, являются:

- ~ Инструкция по определению бактерицидных свойств новых дезинфицирующих средств, утв. Минздравом СССР 06.05.1968 № 739-68;
- ~ Методы испытаний дезинфекционных средств для оценки их безопасности и эффективности, утв. Минздравом России, 1998;
- ~ Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности. Руководство Р 4.2.2643-10;
- ~ Методика определения и показатели чувствительности (устойчивости) бактерий к дезинфектантам (Е.И. Гудков, А.П. Красильников. Кафедра микробиологии, вирусологии Минского медицинского института, Минск, 2003);
- ~ Методические рекомендации по ускоренному определению устойчивости бактерий к дезинфекционным средствам (№ 1100-26-0-117, лабораторный центр Московского городского центра дезинфекции, Москва, 2000).

В стадии утверждения на федеральном уровне находятся национальные клинические рекомендации Минздрава России «Способ определения чувствительности бактерий к дезинфицирующим средствам».

Чувствительность к бактериофагам. Спектр средств лечения и профилактики инфекционных заболеваний, в т. ч. ИСМП, постепенно сужается в связи с глобальным ростом устойчивости возбудителей ИСМП к антибактериальным препаратам. В этой связи одной из первостепенных задач является разработка и применение дополнительных средств лечения и профилактики инфекционных заболеваний, в качестве которых могут выступать бактериофаги.

Бактериофаги имеют широкое распространение и являются природными ограничителями жизнедеятельности бактерий. Интерес к их применению при бактериальных инфекциях, в т. ч. ИСМП, выглядит абсолютно оправданным.

Определение чувствительности неизвестной культуры к известному бактериофагу может также иметь место в практике работы лаборатории клинической микробиологии с целью:

- ~ фагодифференцировки – идентификации бактерий по их чувствительности к известному фагу;
- ~ фаготипирования – внутривидового типирования бактерий по их чувствительности к типовым бактериофагам;
- ~ идентификации рода (вида) микроорганизма.

По результатам исследования чувствительности микроорганизмов к бактериофагам выдают ответ о наличии или отсутствии чувствительности конкретного микроорганизма, выделенного из биоматериала конкретного пациента или в конкретном структурном подразделении, к испытываемому бактериофагу, с указанием производителя препарата, даты выпуска

и номера серии. В целях соблюдения принципа использования в лечебной практике исключительно вирулентных фагов в лабораторных условиях возможно определение титра фага в препарате, характеризующего его литическую активность. Методика имеет количественный (по методу Грация) и полуколичественный (по методу Аппельмана) варианты.

Подробное описание методик определения чувствительности микроорганизмов к препаратам бактериофагов и интерпретация полученных результатов приведены в национальных клинических рекомендациях [1].

Контроль качества микробиологических исследований

Система менеджмента качества, или совокупность организационной структуры, методик, процессов и ресурсов, охватывает широкий спектр позиций – от нормативно-методической документации, всесторонне регламентирующей деятельность лаборатории, ее планировки и технического оснащения, квалификации, численности и расстановки кадров до организации внутреннего контроля. Внутренний контроль качества микробиологических исследований – это комплекс выполняемых лабораторией мероприятий и процедур, направленных на обеспечение и контроль стабильности требуемых условий развития искомого микроорганизма, а также предупреждение неблагоприятного воздействия факторов, возникающих в процессе подготовки, выполнения и оценки результатов анализа, способных повлиять на достоверность результата. Специфика объекта микробиологических исследований, живого микроорганизма, обладающего индивидуальными (родовыми, видовыми, штаммовыми) свойствами и особенностями жизнедеятельности в условиях организма хозяина и внешней среды, создает не зависящие от исследователя проблемы в оценке точности количественного результата и обуславливает погрешность микробиологических методов. Исходя из этого, основной задачей микробиологических исследований является создание оптимальных условий для развития выделяемых микроорганизмов в целях получения надежных и сопоставимых результатов.

Основными направлениями организации внутреннего контроля качества являются: контроль за соблюдением требований к условиям проведения анализа (лабораторные помещения, воздушная среда, температурные режимы инкубации и хранения, режимы дезинфекции и стерилизации и т. д.), выполнение регламентированных процедур ведения тестовых культур; использование заведомо положительных и отрицательных контрольных образцов; оценка доверительных границ полученного количественного результата; систематический анализ результатов контрольных процедур. Документальное оформление результатов таких контрольных процедур осуществляется в утвержденных регистрацион-

ных формах согласно СП 1.2.036-95 от 28.08.1995 [12]. Однако не на все стандартные процедуры в настоящее время разработаны регистрационные учетные формы, что предполагает использование произвольных форм. Следует учесть, что при их разработке необходимо привлекать к участию различные комиссии по проверке работы лаборатории. Разработанные журнальные формы учета или формы отдельных контрольных листов должны быть удобными для заполнения и наглядными для других специалистов. Они утверждаются руководителем медицинской организации, впоследствии их брошюруют за определенный период времени (месяц, квартал, год) в зависимости от кратности и вида контроля. Регистрация и хранение результатов выполненных контрольных процедур может осуществляться на электронных носителях.

Обязательным разделом внутреннего контроля качества является проведение периодического, но не реже одного раза в год, анализа результатов контрольных процедур, с учетом которого осуществляется корректировка руководства по качеству испытательной лаборатории.

Обеспечение качества выполняемых исследований возможно только при наличии квалифицированного персонала.

Требования к составу помещений микробиологической лаборатории и их размещению, организации и обеспечению безопасности работ с патогенными биологическими агентами изложены в СП 1.3.2322-08 от 28.01.2008 [13]. Требования к процедурам выполнения исследований и метрологическому обеспечению оборудования представлены в соответствующих нормативных документах и не являются предметом рассмотрения данных рекомендаций. Вопрос оценки достоверности качественных и количественных результатов микробиологических исследований на сегодняшний день в России остается нерешенным. Действующий приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 № 585 [8], устанавливающий критерии микробной обсемененности биологических материалов и видовой дифференциальной диагностики бактериальных изолятов, не обеспечивает возможность точной идентификации выделенных микроорганизмов, оценки их этиологической значимости в зависимости от степени присутствия в клиническом образце, т. к. входит в противоречие с реальными результатами исследований лабораторий практического звена и данными научной литературы.

В последние годы в рамках организации контроля качества большое внимание уделяется разработке и внедрению на рабочих местах стандартных операционных процедур, которые включают обучение среднего и младшего медицинского персонала, аудит выполнения персоналом требований стандартных операционных процедур; оценку и оптимизацию организационных возможностей выполнения; разработку внутренних документов системы управления качеством; процедуры

внутрилабораторного контроля качества, лабораторных исследований в программах внешней оценки качества, оценку результатов внутреннего и внешнего лабораторного контроля. Участие в системах внешней оценки качества должно стать неотъемлемой частью работы лаборатории.

Постаналитический этап

Основными причинами ошибок на постаналитическом этапе являются: ошибочная валидация данных анализа, несообщение результатов, передача результатов не тому адресату, длительное время производства анализа, неправильный ввод данных на электронный носитель или ошибка при записи от руки, задержка в сообщении о критических значениях, запоздавшая реакция или отсутствие реакции на лабораторный отчет, неверная интерпретация результата; неадекватно составленные планы лечения, наблюдения пациента, организации противоэпидемических и профилактических мероприятий.

Интерпретация результатов бактериологических исследований

Интерпретация результатов микробиологического исследования материалов, полученных при обследовании пациентов, или проб с объектов внешней среды является основной задачей бактериолога, клинициста, госпитального эпидемиолога и представляет определенную трудность, т. к. в значительной мере зависит от опыта специалиста и техники проведения исследования. В изучаемом образце важно определить наиболее значимый микроорганизм или микроорганизмы, которые являются причиной патологических изменений в органах и тканях пациента и (или) относятся к представителям внутрибольничных популяций (клонов). Именно на эти «критичные» группы микрофлоры должна быть нацелена работа микробиологической лаборатории, осуществляющей микробиологический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за ИСМП.

В большинстве случаев, помимо установления видовой принадлежности микроорганизма, проводят количественную оценку выросших культур. Наиболее простым методом оценки является определение степени роста, где число бактерий выражено в виде числа колоний (выросших на чашке), возведенного в определенную степень. Рост условно-патогенных микроорганизмов в низкой степени (до 10 колоний на чашке) чаще всего свидетельствует о загрязнении пробы, высокая степень роста (более 10 колоний) – об этиологической роли данного микроорганизма в воспалительном процессе. Степень роста выражается в колониеобразующих единицах (КОЕ). Определение КОЕ теоретически позволяет установить концентрацию микроорганизмов в единице

объема (количественный посев). Подсчет КОЕ проводят несколькими методами: серийных разведений, методом визуальной микроскопии, секторным посевом по методу Gould. Если результат определения микроорганизмов в жидкой пробе (например, в 1 мл мочи) количественным методом не вызывает сомнений и может приниматься во внимание при определении тактики лечения заболевания, то количественное определение микроорганизмов в отделяемом из органов дает представление о количественном составе микроорганизмов не в органе в целом, а только в конкретной взятой пробе. Поэтому определение различных «титров», «степеней», «количества» микроорганизмов в пробах, взятых из участков локализаций органа, не имеет достаточного практического значения ни для диагностики инфекций, ни для назначения лечения, ни для контроля излеченности – следовательно, является сугубо ориентировочным.

Ценным преимуществом метода бактериологического посева является определение чувствительности выделенных жизнеспособных форм микроорганизмов к антибиотикам. Результаты антибиотикограммы выражают в миллиметрах (диско-диффузионный метод) или в единицах МИК (метод серийных разведений). Однако чувствительность *in vitro* (в пробирке) и *in vivo* (в организме) может быть различной и во многом зависит от фармакокинетики препарата, его совместимости с другими лекарственными средствами, получаемыми пациентом, и других особенностей физиологических функций макроорганизма. Важно знать, какая концентрация антибиотика в минимально ингибирующих единицах будет непосредственно проникать в очаг поражения.

Адаптационные возможности условно-патогенных микроорганизмов, преимущественно выделяемых от пациентов и объектов больницы, их способность формировать госпитальные популяции, характеризующиеся, как правило, более высокой вирулентностью, антибиотикорезистентностью, отсутствием строгой органотропности и др., способствовали существенному расширению круга микроорганизмов – возбудителей ИСМП, снижению инфицирующей дозы, проявлению инфекционности в отношении условно здорового организма-хозяина. Соответственно и решение об этиологической значимости микроорганизма должно приниматься не микробиологом – на основе видовой или родовой принадлежности, что, к сожалению, нередко встречается на практике, а на основе комплексного исследования свойств микроорганизма, количественной оценки, динамического наблюдения при сопоставлении с клиническими и эпидемиологическими данными. Заключение об этиологической значимости микроорганизма – это совместное решение микробиолога, лечащего врача и эпидемиолога.

При проведении биологического типирования штаммов должен учитываться высокий уровень внутрипопуляционной изменчивости госпитальных клонов, обусловленный биотическими и абиотическими факторами больничной среды, что допускает наличие гетерогенности их циркулирующей популяции. Большое количество однотипного генетического материала в комплексе с абиотическими факторами внешней среды является мощным механизмом селекции. В большей степени это относится к микроорганизмам, которые в обычных условиях составляют нормофлору локусов тела человека или являются повсеместно распространенными свободно живущими видами.

Сроки хранения и утилизации биологического материала и первичной медицинской документации

Весь доставленный на исследование в лабораторию биологический материал после выполнения назначенных тестов архивируется. Сроки хранения биологических проб в архиве лаборатории (в специальных опломбированных биксах, холодильниках, низкотемпературных камерах, лиофилизированном виде и пр.) зависят от вида материала и исследуемых компонентов. Так, первичный материал для бактериологического исследования должен храниться до окончания исследования, кровь для исследования иммунного статуса – не более 24 ч, материал для исследования методом ПЦР – до конца исследования (время исчисляется с момента взятия материала). Процедуры обеззараживания биологического материала, сбора, хранения и утилизации отходов микробиологических лабораторий регламентированы СП 1.3.2322-08 [13] и СанПиН 2.1.7.728-99 [11]. Архивированию подлежит также первичная медицинская документация: бланки направлений, документы аналитического этапа (результаты исследований, протоколы производственного контроля внешней среды, материалы по контролю качества). Сроки хранения этих документов составляют 15 лет.

Список использованной литературы

1. Асланов Б.И., Зуева Л.П., Кафтырева Л.А. и др. Принципы использования бактериофагов для борьбы с инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи: Методические рекомендации. М., 2014.
2. Благоднарова А.А. Проблемные вопросы мониторинга устойчивости микроорганизмов к дезинфицирующим средствам // Медицинский альманах. 2013. № 2. С. 103–107.
3. ГОСТ Р ИСО 15189-2012 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
4. Зубков М.Н. Сбор, транспортировка биологического материала и трактовка результатов микробиологических исследований // Лабораторная диагностика. 2004. № 6. С. 143–154.

5. Методические рекомендации Минздрава РСФСР от 19.12.1991. Методы бактериологического исследования условно-патогенных микроорганизмов в клинической микробиологии.

6. МУ 4.2.2039-05. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. Методические указания.

7. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Национальные клинические рекомендации. 15112014/1. М., 2014.

8. Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 № 585 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинко-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений».

9. *Покровский В.И., Акимкин В.Г., Брико Н.И.* Пути совершенствования лабораторной диагностики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи // Медицинский альманах. 2012. № 2. С. 12–16.

10. СанПиН 2.1.3.2576-10 от 27.04.2010. Гигиенические требования к размещению, устройству, оборудованию и эксплуатации больниц, родильных домов и других лечебных стационаров.

11. СанПиН 2.1.7.728-99 от 22.01.1999. Правила сбора, хранения и удаления отходов лечебно-профилактических учреждений.

12. СП 1.2.036-95. Порядок учета, хранения и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности.

13. СП 1.3.2322-08. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней (с изменениями от 02.06.2009).

14. Стандартная технология «Бактериологический анализ мочи». Национальные клинические рекомендации. 2013. 16 с.

15. *Фельдблюм И.В., Захарова Ю.А., Деменко С.Г.* Научное обоснование микробиологического исследования последа в системе микробиологического мониторинга для прогнозирования развития гнойно-септических инфекций у родильниц в ранний послеродовой период // Медицинский альманах. 2013. № 2. С. 53–56.

16. *Фельдблюм И.В., Захарова Ю.А., Николаева А.М. и др.* Эпидемиологическая диагностика внутрибольничных гнойно-септических инфекций синегнойной этиологии на основе внутривидового типирования возбудителя // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2013. № 1. С. 14–20.

17. *Захарова Ю.А.* Совершенствование эпидемиологического надзора за гнойно-септическими инфекциями в акушерских стационарах на основе оптимизации эпидемиологического и микробиологического мониторингов. Дисс... доктора мед. наук. Пермь, 2009. 318 с.



ОБМЕН ОПЫТОМ

Алгоритм ускоренного бактериологического исследования с использованием хромогенных питательных сред

О.В. Полухина

*заведующая бактериологической лабораторией
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научный центр радиологии
и хирургических технологий»
Минздрава России, г. Санкт-Петербург,*

Т.Н. Суборова

*д-р биол. наук, ст. науч. сотр.
научно-исследовательской лаборатории
военной хирургии Научно-исследовательский центр
Военно-медицинской академии
им. С.М. Кирова, г. Санкт-Петербург,*

С.А. Егорова

канд. мед. наук, науч. сотр.,

М.А. Макарова

канд. мед. наук, науч. сотр.,

Л.А. Кафтырева

*д-р мед. наук, главный внештатный специалист
по бактериологии Комитета по здравоохранению
г. Санкт-Петербурга, проф. кафедры эпидемиологии,
паразитологии и дезинфектологии
ГБОУ ВПО СЗГМУ им. И.И. Мечникова,
заведующая лабораторией кишечных инфекций*

*ФБУН «НИИ эпидемиологии
и микробиологии имени Пастера»*

В статье приведен алгоритм использования хромогенных питательных сред при бактериологическом исследовании биологического материала. Применение хромогенных питательных сред позволяет сократить сроки исследования и через 18–24 часа после посева получить информацию о выделенных микроорганизмах, клинически значимой резистентности к антимикробным препаратам и выдать рекомендации для проведения этиотропной терапии и профилактических мероприятий в рамках инфекционного контроля.

В настоящее время для проведения бактериологических исследований разработан и представлен на рынке широкий спектр дифференциальных питательных сред нового поколения – хромогенных и флуорогенных, которые позволяют идентифицировать различные микроорганизмы непосредственно в процессе культивирования. Поскольку хромогенные и селективные субстраты входят в состав питательных сред, используемых для первичного посева, то выделение «чистой культуры» микроорганизма и его идентификация происходят одновременно и не требуют постановки дополнительных тестов, что значительно сокращает время и материальные затраты на исследование. Использование хромогенных (флуорогенных) сред при исследовании проб биологического материала на этапе первичного посева делает возможным ускоренное получение ответа (через 18–24 ч).

Большой выбор представленных на рынке хромогенных сред различных производителей позволяет подобрать оптимальный набор для исследования в соответствии с задачами и возможностями лаборатории.

Основными возбудителями внутрибольничных инфекций (ВБИ) в стационарах являются *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, грамотрицательные неферментирующие бактерии (ГОНБ) (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*), *Enterococcus* spp., грибы рода *Candida*, которые способны вызывать инфекции кровотока, мягких тканей, дыхательных и мочевыводящих путей, особенно у ослабленных и иммунокомпрометированных пациентов, а также пациентов, находящихся в отделении реанимации и интенсивной терапии. Эти микроорганизмы представляют угрозу для пациентов и медицинского персонала, поскольку способны длительно сохраняться в больничной среде, а также распространяться от пациента к пациенту при невыполнении изоляционно-ограничительных мероприятий и несоблюдении гигиены рук медицинскими работниками. Ранняя постановка этиологического диагноза позволяет своевременно назначить эмпирическую этиотропную терапию и провести мероприятия инфекционного контроля, направленные на предотвращение распространения микроорганизмов в стационаре.

Опыт использования хромогенных питательных сред в работе бактериологической лаборатории

Хромогенная неселективная среда для выделения и подсчета уропатогенных бактерий позволяет через 18 ч инкубации изолировать и подсчитать микроорганизмы, в т. ч. присутствующие в ассоциации, и идентифицировать бактерии, наиболее часто вызывающие инфекции мочевыводящих путей (*E. coli*, *Enterococcus* spp., *Proteus* spp.), по цвету колоний, который определяется специфической ферментативной активностью в присутствии хромогенных субстратов. Используя дополнительно рутинные тесты, можно выполнить предварительную или окончательную идентификацию других патогенов. Несмотря на то что подобные среды разрабатывались прежде всего для исследования проб мочи, во многих лабораториях в настоящее время их все шире используют для посева других видов биологического материала.

В течение пяти лет в бактериологической лаборатории Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России (ФГБУ «РНЦРХТ») для первичного посева проб биологического материала, полученных от пациентов с гнойно-септическими инфекциями (ГСИ) дополнительно стали использовать две хромогенные среды производства DRG (Франция), предназначенные для скрининга штаммов энтеробактерий, резистентных к цефалоспорином расширенного спектра, продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра (CHROMagar ESB), и карбапенем-резистентных грамотрицательных бактерий (CHROMagar KPC).

Анализ результатов посева более 3 тыс. проб биологического материала показал, что в 71,0% проб выявлена монокультура микроорганизмов, а в 29,0% – микробные ассоциации. Монокультуры были выделены из 87,0% проб крови и смывов с фрагментов катетеров, 73,0–73,4% проб отделяемого нижних дыхательных путей и мочи, 61,0% проб раневого отделяемого. Использование для первичного посева хромогенной среды позволило уже через 18 ч не только выделить чистую культуру возбудителей, но и определить состав микробных ассоциаций. Микробные ассоциации включали 2–4 вида микроорганизмов, колонии которых четко дифференцировались на хромогенной среде. Чаще встречались пробы, содержащие два вида возбудителей (23,3% проб), в 4,0% проб было выявлено три, в 1,8% проб – четыре вида бактерий. Ассоциации возбудителей, каждый из которых обнаруживался в диагностическом титре, состояли в 55,0% случаев из грамотрицательных бактерий (ГОб), в 32,0% случаев – из ГОб и грамположительных бактерий, остальные пробы содержали бактерии или грибы в различных сочетаниях (табл. 1).

Важным этапом бактериологического исследования является определение чувствительности выделенных микроорганизмов к антимикроб-

Таблица 1

**Результаты исследования биологического материала
с использованием хромогенной среды**

Биологический материал	Пробы с наличием роста микроорганизмов									
	монокультура		ассоциации микроорганизмов						всего	
			2 вида		3 вида		4 вида			
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Моча	1014	73,4	304	22,0	31	2,2	33	2,4	1382	100
Раневое отделяемое	605	61,1	293	29,6	74	7,5	19	1,9	991	100
Кровь	211	86,8	30	12,4	2	0,8	0,0	0,0	243	100
Отделяемое нижних дыхательных путей	228	79,7	48	16,8	10	3,5	0,0	0,0	286	100
Фрагмент катетера	25	86,2	4	13,8	0,0	0,0	0,0	0,0	29	100
Другой материал	14	60,9	8	34,8	1	4,4	0,0	0,0	23	100
Итого	2097	71,0	687	23,3	118	4,0	52	1,8	2954	100

ным препаратам (АМП). Подготовка культуры к исследованию и сама процедура тестирования одним из методов (диско-диффузионным, методом пограничных концентраций с использованием автоматических анализаторов или зарегистрированных наборов реагентов) занимают 18–48 ч, что задерживает назначение рациональной антимикробной терапии.

В настоящее время во многих странах частота выделения штаммов микроорганизмов, устойчивых к широкому спектру АМП, достаточно велика. К наиболее «проблемным» с позиции резистентности относят метициллин-резистентные штаммы *S. aureus* (MRSA); штаммы *Enterobacteriaceae* и ГОНБ, резистентные к цефалоспорином расширенного спектра (ЦРС) и карбапенемам; штаммы *Enterococcus* spp., устойчивые к ванкомицину. Быстрая детекция таких штаммов позволяет избежать назначения неадекватных АМП, а также предпринять меры инфекционного контроля, направленные на ограничение распространения резистентного штамма в стационаре.

В целях ограничения распространения резистентных штаммов/генов резистентности в популяции возбудителя необходимо проведение тестов, подтверждающих отдельные (клинически значимые) механизмы резистентности, например продукцию бета-лактамазы расширенного спектра (БЛРС), карбапенемаз у *Enterobacteriaceae* и ГОНБ, наличие пенициллин-связывающего белка 2a у *S. aureus* и др. Постановка фенотипических подтверждающих тестов занимает дополнительные 18–24 ч.

Сократить время исследования помогают молекулярно-генетические методы с использованием наборов реагентов для выявления клинически

значимых микроорганизмов и генов, кодирующих механизмы резистентности. Такие тесты, особенно при применении метода полимеразной цепной реакции с детекцией результатов в режиме реального времени, позволяют значительно сократить время исследования. Однако не все лаборатории располагают необходимым оборудованием и квалифицированным персоналом для их выполнения.

Использование хромогенных сред с дополнительными селективными добавками (определенные пороговые концентрации АМП) позволяет решить большинство вышеперечисленных проблем. При посеве биологического материала одноэтапно проводится не только выделение и идентификация микроорганизма, но и (в зависимости от селективной добавки) обнаруживаются штаммы, устойчивые к бета-лактамам (MRSA, БЛРС-продуцирующие и карбапенем-резистентные энтеробактерии и ГОНБ) и гликопептидам – ванкомицин-резистентные энтерококки (VRE). При этом срок исследования сокращается до 18–24 ч. Кроме того, такие среды позволяют заметить «гетерогенность» популяции возбудителя по чувствительности к АМП и выявить те колонии, которые характеризуются устойчивостью. Использование хромогенных сред не требует специального оборудования, обучения персонала лаборатории и дополнительных трудозатрат.

В 2010–2014 гг. для первичного посева проб биоматериала в бактериологической лаборатории ФГБУ «РНЦПХТ» дополнительно стали использовать две хромогенные среды производства DRG (Франция), предназначенные для скрининга штаммов энтеробактерий, резистентных к ЦПС, продуцирующих БЛРС (CHROMagar ESB), и карбапенем-резистентных грамотрицательных бактерий (CHROMagar KPC).

Использование этих сред при первичном посеве биоматериала позволяет уже через 18 ч выдать предварительные рекомендации о возможности использования для терапии цефалоспоринов и карбапенемов. Своевременная информация о выделении таких штаммов микроорганизмов необходима также госпитальному эпидемиологу – для проведения профилактических мероприятий в рамках инфекционного контроля.

В табл. 2 приводится алгоритм бактериологического исследования биологического материала с использованием традиционных и хромогенных питательных сред, а также указана продолжительность проведения различных этапов бактериологического исследования.

Полученные данные позволяют сделать определенные выводы.

В настоящее время при традиционном бактериологическом исследовании хромогенные среды можно использовать в двух направлениях:

- ~ для одновременного селективного выделения и идентификации микроорганизмов (возбудителей ГСИ, *Candida* spp., *Salmonella*, *E. coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Streptococcus* гр. В и др.) в про-

Таблица 2

Время проведения различных этапов бактериологического исследования биологического материала с использованием традиционных и хромогенных питательных сред

Время получения результатов	Алгоритм бактериологического исследования с использованием питательных сред	
	традиционных	хромогенных
18–24 ч	1. Получение чистой культуры микроорганизмов	1. Получение чистой культуры микроорганизмов. 2. Предварительная и/или окончательная идентификация. 3. Выявление полирезистентных штаммов клинически значимых микроорганизмов
36–48 ч	1. Постановка идентификационных тестов. 2. Определение чувствительности микроорганизмов к АМП	Окончательная идентификация, определение чувствительности к АМП с использованием экспертной системы бактериологического анализатора и интерпретация результатов с использованием EUCAST Исследование завершено
72 ч –10 сут	Учет результатов	

бах биологического материала, а также в пробах пищевых продуктов, воды, на объектах внешней среды при исследованиях, проводимых в рамках внутреннего контроля качества и санитарной микробиологии;

- ~ для скрининга штаммов микроорганизмов, устойчивых к определенным классам АМП: *MRSA*, *VRE*, *Enterobacteriaceae* и ГОНБ, устойчивых к цефалоспорином и карбапенемам (в т. ч. продуцирующих бета-лактамазы расширенного спектра и карбапенемазы).

Хромогенные среды имеют преимущества перед традиционно используемыми средами, т. к. одноэтапное выделение, идентификация и количественная оценка возбудителей ГСИ и инфекционных заболеваний позволяют существенно сократить сроки бактериологического исследования (с 3–5 сут до 18–36 ч).

Детекция устойчивых к АМП штаммов клинически значимых микроорганизмов в течение 18–24 ч при первичном посеве биологического материала на хромогенные питательные среды значительно упрощает и сокращает бактериологическое исследование.