

Министерство здравоохранения Республики Беларусь

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

здравоохранения -

Главный государственный

санитарный врач

Республики Беларусь

В.И. Качан

2010г.

Регистрационный № 075-0210



МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»; ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»; ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии и гематологии»; ГУ РНПЦ эпидемиологии и микробиологии; ГУ РНПЦ «Мать и дитя»; ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии»; ГУ «Минский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»; ГУ «Гродненский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»; ГУ «Гомельский областной центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья»; УЗ «Городская детская инфекционная клиническая больница»; УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро».

Авторы: Коломиец Н.Д., Тонко О.В., Сероокая Т.И., Марейко А.М., Литуновская Л.Г., Ермакова Т.С., Колодкина В.Л., Сергейчик Н.Л., Левшина Н.Н., Славинская А.А., Точко Н.И., Войтик С.Б., Новомлинова Л.В., Шитикова П.В., Ключко Н.Л., Куличковская И.В.

Минск-2010

РАЗДЕЛ I ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

ГЛАВА 1 ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. Настоящая Инструкция по применению (далее – Инструкция) предназначена для применения в микробиологических лабораториях органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, организаций здравоохранения и других республиканских органов государственного управления.

2. Инструкция устанавливает микробиологические методы исследования биологического материала с целью выделения и идентификации основных этиологических агентов; принципы интерпретации результатов исследований. Инструкция является обязательной в ходе проведения исследований, применяемых для профилактики, диагностики и лечения инфекционно-воспалительных заболеваний и осложнений.

ГЛАВА 2 ОБЩИЕ ПРАВИЛА ЗАБОРА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

3. Биологический материал (далее – материал) забирается персоналом лечебно-профилактического учреждения до начала антимикробной терапии, если это невозможно – перед введением антимикробного препарата. Материал берут непосредственно из очага инфекции или исследуют клинически значимый биологический материал, с соблюдением правил асептики с целью снижения риска контаминации посторонней микрофлорой. Количество материала должно быть достаточным для проведения исследования.

4. Материал собирают в стерильную лабораторную посуду с соблюдением условий, сроков хранения и доставки. Пробы маркируют и транспортируют в контейнерах медицинских (металлических биксах, термоконтейнерах и др.) с сопроводительным документом установленной формы. Материал доставляют в лабораторию в максимально короткие сроки (для большинства образцов не позднее 1,5-2 часов после их получения). Допускается хранить и транспортировать биологический материал с использованием транспортных систем.

РАЗДЕЛ II

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

ГЛАВА 3

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ

5. В норме кровь стерильна. Сепсис, бактериемию могут вызывать любые микроорганизмы, как патогенные, так и условно-патогенные. Микробиологическое исследование крови следует проводить при заболеваниях, характерной особенностью которых является лихорадка. Выделение микроорганизмов из крови при гипертермии, помогает подтвердить диагноз при менингитах, пневмониях, пиелонефритах, остеомиелитах, артритах, перитонитах, холециститах, энтероколитах, травмах, раневых повреждениях кожи и мягких тканей. Бактериемия может быть результатом различных хирургических манипуляций. Длительная бактериемия характерна для эндоваскулярных инфекций (эндокардит, инфицированная аневризма, тромбофлебит).

6. Питательные среды для первичного посева.

Для аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов – «двухфазная среда», бульон на основе гидролизатов казеина и сои (триптиказо-соевый бульон (далее – ТСБ)); для облигатно-анаэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов – «среда для контроля стерильности» (тиогликолевая среда), бульон Шэдлера, Колумбийский бульон с добавлением 0,05% цистеина, обогащенный сердечно-мозговой бульон; для грибов – среда Сабуро.

Исследование на гемокультуру можно проводить с использованием коммерческих флаконов, с визуальной или автоматической системой учета результатов.

Исследования для выделения предполагаемой группы возбудителей определяются лечащим врачом в каждом конкретном случае индивидуально и зависят от характера инфекционного процесса. При подозрении на грибковые септические состояния кровь засевают одновременно в два флакона: с питательной средой для аэробных бактерий и в среду Сабуро для грибов.

7. Условия для отбора проб.

Исследование целесообразно проводить до начала антибиотикотерапии, либо в момент максимального выведения из организма антибактериальных препаратов. Кровь берут во время подъема температуры из периферической вены с соблюдением правил асептики и мер индивидуальной защиты, предусмотренных при работе с кровью. Не следует брать кровь из сосудистых катетеров, кроме случаев, когда предполагается инфекция катетерного происхождения. Кровь засевают в

питательные среды сразу после взятия у постели больного или в процедурном кабинете.

8. Посев материала, хранение и транспортировка проб.

Посев во флаконы, приготовленные в лаборатории, осуществляют два человека. В то время как один обрабатывает кожу пациента, пунктирует вену и берёт кровь, другой над пламенем спиртовки открывает пробки флаконов, подставляет флаконы со средой под струю крови из шприца или системы, обжигает горлышки и пробки флаконов и закрывает их. Соотношение крови и питательной среды должно быть не менее 1:10 (до 10 мл у взрослых и 5 мл для детей). У новорожденных и детей неонатального периода допустимо взятие 1–2 мл крови.

При использовании коммерческих флаконов посев производится согласно прилагаемой инструкции: дезинфицируют резиновую пробку флакона 70% этиловым спиртом (или заменяющим его препаратом), выдерживают 1 минуту, производят посев крови во флакон, предварительно сменив иглу шприца. При подозрении на наличие анаэробов, во избежание попадания воздуха из шприца, сначала производят посев в «анаэробный» флакон, а затем – в «аэробный». Флаконы маркируют с указанием фамилии, имени, отчества больного, даты и времени отбора пробы, и до момента доставки в лабораторию содержат в термостате или при комнатной температуре в защищённом от света месте (не в холодильнике).

9. Культивирование.

Инкубация посевов производится при температуре 35-37°C. Длительность культивирования определяется типом питательной среды, используемой для выделения микроорганизмов: аэробные, факультативно-анаэробные и облигатно-анаэробные микроорганизмы – 7 суток; грибы – 14 суток.

При отсутствии роста на 8 и 15 сутки, соответственно, дают отрицательный ответ.

Если имеется подозрение на наличие медленно растущих микроорганизмов на 8 сутки проводится пересев на кровяной агар и селективную питательную среду. Условия культивирования определяются предполагаемым возбудителем. Инкубацию флаконов с кровью следует продолжить еще в течение 7 дней.

10. Флаконы с визуальной системой учета результатов, просматривают не реже одного раза в сутки на наличие признаков роста. Одновременно производят перемешивание жидкой фазы и орошение твердой питательной среды.

О наличии микробного роста на питательных средах без твердой фазы свидетельствует: хлопьевидный осадок, белые крупинки или пленка на поверхности, помутнение среды, гемолиз, коагуляция бульона, газообразование.

При появлении признаков роста, следует асептически отобрать материал для приготовления мазков (для окраски по Граму, простыми и специальными методами) и посева на питательные среды. При отсутствии микроорганизмов в препарате, окрашенном по Граму, можно предположить наличие микроорганизмов, плохо или не окрашивающихся по Граму (некоторые виды грибов, кислотоустойчивые бактерии).

11. В соответствии с данными бактериоскопии, типом питательной среды и сроками появления роста во флаконе, производится высев на питательные среды общего и селективного назначения: кровяной агар, шоколадный агар – для выделения широкого спектра микроорганизмов; среда Эндо (среда МакКонки) – для обнаружения энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных бактерий (далее – НГОб); желточно-солевой агар (далее – ЖСА) или другие аналогичные по назначению среды – для обнаружения стафилококков; анаэробный агар (агар Шедлера и другие) – для выделения анаэробных бактерий; среда Сабуро – для грибов, при необходимости – на другие питательные среды.

12. Условия культивирования посевов: кровяной агар – при 35-37⁰С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов; шоколадный агар – при 35-37⁰С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов; среда Эндо (среда МакКонки) – при 35-37⁰С в аэробных условиях, в течение 24 часов; ЖСА – при 35-37⁰С в аэробных условиях, в течение 24-48 часов; среда Сабуро – при 25-30⁰С в аэробных условиях в течение 72 часов; анаэробный агар – при 35-37⁰С в анаэробных условиях в течение 7 дней.

При выделении микроорганизмов их идентифицируют и определяют чувствительность к антибактериальным препаратам.

13. Оценка результатов.

При случайной контаминации крови чаще всего выделяются микроорганизмы, входящие в состав нормальной микрофлоры кожи или широко распространенные в окружающей среде: *Staphylococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. и другие. Одновременное выделение из крови нескольких видов микроорганизмов чаще всего свидетельствует о загрязнении посевов крови. У больных с иммунодефицитами возможна смешанная инфекция. В пользу этиологической значимости выделенного микроорганизма свидетельствует его неоднократное выделение из крови или одновременное выделение из крови и из других биологических материалов.

14. Исследование внутрисосудистого катетера.

14.1. При подозрении на катетерассоциированную инфекцию целесообразно проводить исследование внутрисосудистого катетера.

В асептических условиях извлечь катетер и отрезать его дистальный (внутрисосудистый) конец длиной 5 см, поместить в стерильный контейнер (пробирку). Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 15 минут. В это время он может находиться при комнатной

температуре. Допускается хранение биологического образца в течение 24 часов при 4-6°C.

14.2. Посев на питательные среды. С помощью стерильного пинцета произвести прокатывание вращательными движениями фрагмента катетера по поверхности кровяного агар. При необходимости, возможно использование других питательных сред: шоколадный агар, среда Эндо (среда МакКонки), ЖСА, среда Сабуро.

14.3. Культивирование посевов: кровяной агар – при 35-37°C, 5-10% CO₂, в течение 24- 48 часов; шоколадный агар – при 35-37°C, 5-10% CO₂, в течение 24-48 часов; среда Эндо (среда МакКонки) – при 35-37°C в аэробных условиях, в течение 24 часов; ЖСА – при 35-37°C в аэробных условиях, в течение 24-48 часов; среда Сабуро – при 25-30°C в аэробных условиях в течение 72 часов.

14.4. Оценка результатов.

При росте на чашке более 15 колоний одного вида – результат исследования следует считать положительным, в остальных случаях – сомнительным, так как высок риск контаминации биологического образца во время отбора, хранения и посева материала на питательные среды.

ГЛАВА 4

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

15. Спинномозговую жидкость (далее – СМЖ) исследуют в случае предполагаемого менингита как первичного процесса, так и осложнения после черепно-мозговой травмы, нейрохирургической операции или наличия инфекционного очага в организме.

Наиболее частыми возбудителями менингита у новорожденных являются: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus spp.* (групп В, D), *Listeria monocytogenes*. У детей раннего возраста: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*.

Менингококки и пневмококки сохраняют своё значение для взрослых людей, а гемофильная палочка в старших возрастных группах вызывает менингиты только при наличии предрасполагающих факторов: алкоголизм, наркомания, иммунодефициты. Листерии так же могут быть причиной менингитов в старших возрастных группах. В начальном периоде листериоза ликвор серозный, позднее – гнойный. В случае серозных менингитов следует в первую очередь исключить туберкулез.

У лиц пожилого возраста и больных с иммунодефицитами менингит может быть как результатом инфицирования *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, так и проявлением внутригоспитальной инфекции, вызванной *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *Salmonella spp.* Этиологическим

фактором менингитов, развившихся после черепно-мозговой травмы или как осложнение после нейрохирургических операций, чаще всего являются *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*. Как правило, менингит вызывается только одним микроорганизмом.

16. Взятие материала.

Первую порцию СМЖ (около 1 мл) берут в отдельную пробирку для проведения общего ликворологического исследования с соблюдением всех правил асептики. Вторую порцию (1-2 мл), предназначенную для бактериологического исследования, забирают в стерильную пробирку. Одновременно готовят не менее двух мазков для микроскопического исследования. На поверхность предметного стекла наносят 1-2 капли ликвора, не распределяя их по поверхности, высушивают на воздухе. Мазки фиксируют над пламенем спиртовки и окрашивают метиленовым синим и по Граму, при подозрении на туберкулез – по Циль-Нильсену, при необходимости – другими методами. Результаты бактериоскопии немедленно сообщают лечащему врачу в виде предварительного ответа. В соответствии с результатами микроскопии могут быть внесены коррективы в ход бактериологического исследования.

Образец должен быть доставлен в лабораторию немедленно. Во время транспортировки СМЖ следует тщательно предохранять от охлаждения. Допускается хранение материала в течение 1-2 часов в термостате при температуре 37⁰С или в течение 24 часов при комнатной температуре при использовании коммерческих флаконов с двухфазной средой с визуальной системой учета роста и флаконов с различными селективными свойствами для автоматизированной системы.

17. Посев материала.

Стерильной пипеткой со дна пробирки отбирают материал и по 2-4 капли и засевают на поверхность чашек Петри с подогретыми питательными средами. Схема посева ликвора представлена в приложении 1 к настоящей Инструкции.

Культивирование посевов: менингококк агар (без добавок) или сывороточный агар при 35-37⁰С, 5-10% CO₂, в течение 24-48 часов; кровяной агар – при 35-37⁰С, 5-10% CO₂, в течение 24-48 часов; шоколадный агар – при 35-37⁰С, 5-10% CO₂, в течение 24-48 часов; среда Эндо (среда МакКонки) – при 35-37⁰С в аэробных условиях, в течение 24 часов.

СМЖ, оставшаяся в пробирке, используют для посева на среду «обогащения» (полужидкий сывороточный агар), 0,5 мл жидкости засевают в 5 мл 0,1% полужидкого сывороточного агара, и инкубируют при 35-37⁰С в аэробных условиях в течение 48 часов. Для исследования СМЖ наряду с прямым посевом используют коммерческие флаконы с двухфазной средой с визуальной системой учета роста и флаконы с различными селективными свойствами для автоматизированной системы.

При отсутствии роста на твердых питательных средах делают высевы из среды «обогащения».

При выделении микроорганизмов их идентифицируют и определяют чувствительность к антибактериальным препаратам.

18. Для экспресс-диагностики используют метод латекс-агглютинации, основанный на выявлении специфических поверхностных полисахаридных антигенов бактерий непосредственно в СМЖ, при этом используют коммерческие наборы для латекс-агглютинации. Исследование проводят согласно инструкции производителя.

19. Дальнейший ход исследования СМЖ проводят в соответствии с Инструкцией о методах микробиологической диагностики менингококковой инфекции и бактериальных менингитов, утвержденной Приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 13.02.2006 г., №81.

20. Исследование СМЖ при менингитах, вызванных грибами, при туберкулезе, сифилисе следует проводить в соответствии с действующими нормативными документами по лабораторной диагностике соответствующей нозологической формы.

21. Оценка результатов.

Ликвор в норме стерилен. Выделение любого микроорганизма расценивается как положительный результат. При обнаружении указывается наличие роста микроорганизмов на первичных питательных средах и средах обогащения. При отсутствии роста бактерий на 4 сутки выдается отрицательный результат.

ГЛАВА 5

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ ИЗ СТЕРИЛЬНЫХ ЛОКУСОВ

22. Выделение микроорганизмов из образца, отобранного из стерильного локуса, с высокой долей вероятности является причиной воспаления в исследуемом биотопе. Наиболее частыми возбудителями плевритов являются: *S. aureus*, *S. pneumoniae*, стрептококки группы А, энтеробактерии, НГОБ, бактероиды, актиномицеты, микобактерии. При перитонитах наиболее часто выделяют: энтеробактерии, НГОБ, энтерококки, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, анаэробные бактерии (*Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp.) и другие микроорганизмы являющиеся нормальной микрофлорой желудочно-кишечного тракта. Артриты и остеомиелиты могут вызывать *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., энтеробактерии, НГОБ, микобактерии.

23. Плевральная, перитониальная, перикардальная, суставная и другие жидкости.

23.1. Отбор материала проводится с соблюдением правил асептики в стерильный контейнер или шприц в количестве не менее 1 мл для выделения бактерий и не менее 10 мл для грибов. Образец доставляется в теплом

виде в лабораторию в течение 15 минут. Допускается хранение материала в течение 24 часов при комнатной температуре при использовании флаконов для гемокультур.

23.2. Для микроскопии готовят не менее двух мазков.

Для жидких непрозрачных биологических образцов, наносят каплю на обезжиренное предметное стекло вблизи от торца, перед каплей ставят под углом 45° стекло и плавным движением равномерно распределяют материал по поверхности.

Для прозрачных проб производится центрифугирование при 3000 оборотах в течение 5 минут, затем из осадка на поверхность предметного стекла наносится 1-2 капли (не распределять по поверхности).

23.3. Высушенные мазки фиксируют в пламени спиртовки и окрашивают метиленовым синим и по Граму, а при подозрении на туберкулез – по Циль-Нильсену, при необходимости – другими методами. Результаты бактериоскопии немедленно сообщают лечащему врачу в виде предварительного ответа. В соответствии с результатами микроскопии могут быть внесены коррективы в ход бактериологического исследования.

Отрицательный ответ может быть выдан на 4-5 сутки.

24. Биоптаты внутренних органов и тканей.

24.1. Отбор материала проводится с соблюдением правил асептики. Кусочек ткани объемом не менее 3-4 мм отбирается в стерильный контейнер. Образец должен быть доставлен в лабораторию в течение 15 минут. Допускается хранение материала в течение 24 часов при 4-6°С в стерильном физиологическом растворе объемом не менее 1 мл.

24.2. Для микроскопии готовят не менее двух мазков. Ткани предварительно размельчают на мелкие кусочки, добавляют около 5 мл стерильного физраствора и центрифугируют при 3000 оборотах в течение 5 минут, затем на поверхность предметного стекла наносятся 1-2 капли супернатанта. Препараты высушивают при комнатной температуре, фиксируют над пламенем спиртовки и окрашивают метиленовым синим, по Граму, при подозрении на туберкулез – по Циль-Нильсену, при необходимости – другими методами. Результаты бактериоскопии сообщают лечащему врачу в виде предварительного ответа.

25. Посев материала из стерильных локусов.

Стерильной пипеткой со дна пробирки берут 0,1 мл материала, засевают шпателем на питательные среды: кровяной агар, шоколадный агар, агар среда Эндо (среда МакКонки), ЖСА, анаэробный агар, тиогликолиевая среда, среда Сабуро. При необходимости, в схему исследования могут быть включены дополнительные дифференциально-диагностические среды.

Оставшийся материал используют для посева на среды «обогащения»: 0,1% полужидкий сывороточный агар, ТСБ, среду Сабуро.

Возможно использование коммерческих флаконов с двухфазной средой с визуальной системой учета роста и флаконов с различными селективными свойствами для автоматизированной системы.

Культивирование посевов: кровяной агар – при 35-37⁰С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов; шоколадный агар – при 35-37⁰С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов; среда Эндо (среда МакКонки) – при 35-37⁰С в аэробных условиях, в течение 24 часов; ЖСА – при 35-37⁰С в аэробных условиях, в течение 24-48 часов; анаэробный агар (агар Шедлера и другие) – при 35-37⁰С в анаэробных условиях в течение 7 дней; тиогликолевая среда – при 35-37⁰С в анаэробных условиях в течение 7-10 дней; среда Сабуро – при 25-30⁰С в аэробных условиях в течение 72 часов; 0,1% полужидкий сывороточный агар или ТСБ – при 35-37⁰С в аэробных условиях в течение 48 часов.

При отсутствии роста колоний на твердых средах делают высев из сред «обогащения» на кровяной агар и шоколадный агар.

При выделении микроорганизмов их идентифицируют и определяют чувствительность к антибактериальным препаратам.

26. Оценка результатов.

При отсутствии роста бактерий на 4 (или соответственно на 11) сутки выдается отрицательный результат. При обнаружении бактерий указывается характер роста на первичных питательных средах и средах обогащения. Выделение бактерий только на средах обогащения свидетельствует о высокой вероятности контаминации материала на любом из диагностических этапов (отбор, хранение, транспортировка и посев биологического материала на питательные среды).

ГЛАВА 6 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖЕЛЧИ

27. Желчь исследуют при воспалительных заболеваниях желчного пузыря и желчных протоков (холециститы, холангиты, желчнокаменная болезнь), при диагностике брюшного тифа и брюшнотифозного носительства. Наиболее часто из желчи выделяют *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Actinomyces spp.*, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*

28. Взятие исследуемого материала.

Желчь собирают путем зондирования, в три стерильные пробирки, отдельно по порциям А, В и С (соответственно дуоденальное содержимое, пузырную желчь и желчь из желчных протоков), либо во время операции с помощью шприца в одну пробирку, соблюдая правила асептики.

Дуоденальное содержимое и желчь имеют зеленовато-желтый цвет и щелочную реакцию. Кислая реакция, белесоватый оттенок жидкости, наличие хлопьев свидетельствуют о примеси желудочного сока, такой ма-

териал не пригоден для исследования. Пробы доставляют в лабораторию в течение 1-2 часов от момента взятия.

29. Посев исследуемого материала.

29.1. Питательные среды для первичного посева: кровяной агар, среда Эндо (среда МакКонки), тиогликолевая среда, селенитовый бульон.

29.2. Культивирование.

По 0,1 мл каждой порции желчи высевают на кровяной агар, инкубируют при 35-37⁰С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов; по 0,1 мл на среду Эндо (среда МакКонки) – при 35-37⁰С в аэробных условиях, в течение 24 часов; на анаэробный агар (агар Шедлера и другие) – при 35-37⁰С в анаэробных условиях в течение 7 дней; в тиогликолевую среду – при 35-37⁰С в анаэробных условиях в течение 7-10 дней. Для выделения сальмонелл желчь засевают в соотношении 1:9 в селенитовый бульон, а также помещают в термостат нативную желчь, в последующем на протяжении 3 дней ежедневно производят высевы на висмут-сульфит агар с селенитового бульона и из нативной желчи.

В случае бактериального роста на кровяном агаре подсчитывают количество колоний каждого вида, пересчитывают на 1 мл исследуемого материала и после бактериоскопии окрашенных по Граму мазков проводят идентификацию культур и определяют чувствительность к антибактериальным препаратам.

30. Оценка результатов.

Желчь, полученная в результате дуоденального зондирования, может содержать микроорганизмы, попавшие из ротовой полости и верхних отделов пищеварительного тракта. На контаминацию желчи микрофлорой полости рта указывают находки в ней нейссерий и дрожжеподобных грибов. Наиболее достоверными являются результаты исследования проб, полученных во время операции. При отсутствии роста бактерий на 4 (или соответственно на 11) сутки выдается отрицательный результат.

ГЛАВА 7 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЧИ

31. Исследование мочи направлено на выделение возбудителя заболевания (качественный критерий) и на определение степени бактериурии (количественный критерий).

32. Взятие исследуемого материала.

Исследованию подлежит средняя порция свободно выпущенной мочи, взятой в стерильную посуду в количестве не менее 1 мл после тщательного туалета наружных половых органов теплой водой с мылом. Предпочтительно отбирать утреннюю порцию мочи. Целесообразно накануне вечером воздержаться от мочеиспускания до взятия анализа.

Моча может быть получена инвазивным путем: с помощью надлобковой пункции мочевого пузыря, цистоскопии, катетеризации.

Материал для исследования берут до начала антибактериальной терапии или в интервалах между курсами лечения. Пробы мочи могут храниться до начала исследования не более 2 ч при комнатной температуре и не более 24 ч в холодильнике.

33. Посев исследуемого материала.

33.1. Питательные среды: кровяной агар и среда Эндо (среда МакКонки), среда Сабуро – при подозрении на грибковое поражение. Допускается использование готовых хромогенных сред для выделения уропатогенов, а также коммерческих систем, включающих в себя несколько типов питательных сред. В этом случае, посев биологического материала проводится по инструкции к тест-системе.

33.2. Условия и сроки инкубации определяются типом питательной среды и видом предполагаемого возбудителя.

Кровяной агар – при 35-37⁰С в аэробных условиях в течение 24-48 часов, среда Эндо (среда МакКонки) – при 35-37⁰С в аэробных условиях в течение 24 часов, среда Сабуро – при 25-30⁰С в аэробных условиях в течение 72 часов.

34. Схемы посева.

34.1. Схема посева мочи методом секторных посевов представлена в приложении 3 к настоящей Инструкции.

Перемешать образец. Бактериологической петлей, диаметром 2 мм, емкостью 0,005 мл, производят посев мочи (30-40 штрихов) на сектор А чашки Петри с кровяным агаром. После этого петлю прожигают и производят 4 штриховых посева из сектора А в сектор I, затем петлю прожигают и производят 4 штриховых посева из сектора I во II, петлю прожигают и производят 4 штриховых посева из II сектора в III.

Определение степени бактериурии по количеству выделенных колоний производят согласно приложению 4 к настоящей Инструкции. Подсчитывают колонии выросшие на чашке Петри с кровяным агаром и пересчитывают их количество на 1 мл мочи.

34.2. Схема посева мочи альтернативным методом представлена в приложении 5 к настоящей Инструкции.

Перемешать образец. Нанести на чашку материал в количестве 0,01 мл (10 мкл), используя дозатор или микробиологическую петлю соответствующего объема; произвести рассев петлей в виде сплошной линии через всю поверхность агара; не меняя петлю, распределить биологический материал по всей чашке.

Определение степени бактериурии производят согласно приложению 6 к настоящей Инструкции.

В зависимости от количества колоний, выросших на чашках проводится пересчет на количество микроорганизмов содержащихся в 1 мл ис-

следуемого материала (КОЕ\мл): 1-10 колоний соответствует примерно 10^2 КОЕ\мл; 11-50 колоний – 10^3 КОЕ\мл; 51-100 колоний – 10^4 КОЕ\мл; более 100 колоний выросших примерно на $1/2$ поверхности посева – 10^5 КОЕ\мл; рост колоний не поддающийся учету на $1/2$ поверхности агара и наличие изолированных колоний на оставшейся поверхности агара – 10^6 КОЕ\мл; рост колоний не поддающийся учету на всей поверхности агара – 10^7 КОЕ\мл и более.

35. Метод позволяет не только определить степень бактериурии, но и выделить возбудителя заболевания в чистой культуре.

Колонии, выросшие на плотных питательных средах, отсевают в пробирки со скошенным агаром, выделенную чистую культуру идентифицируют и определяют ее чувствительность к антибактериальным препаратам.

36. Оценка результатов.

В норме моча человека, полученная неинвазивным путем, как правило, может быть контаминирована представителями нормальной микрофлоры мочевыводящих путей. В дистальном отделе уретры в норме обнаруживают: *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp, *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* spp., энтеробактерии, *Bacteroides* spp. и другие.

Согласно рекомендациям ВОЗ уропатогены разделены по уровням приоритетности. Патогены высокого уровня приоритетности: кишечная палочка и другие энтеробактерии, энтерококки, *S. saprophyticus*. Патогены среднего уровня приоритетности: НГОб, другие стафилококки. Патогены низкого уровня приоритетности: *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*.

Основная задача при интерпретации полученных данных заключается в доказательстве этиологической роли микроорганизмов, выделенных из мочи. Учитывается целый комплекс тестов: степень бактериурии, вид выделенного микроорганизма, повторность его выделения в процессе заболевания, присутствие в моче монокультуры или ассоциации.

37. Общие рекомендации ВОЗ относительно оценки результатов количественных тестов.

Категория 1 – Обнаружение менее 10^4 бактерий в 1 мл мочи. Свидетельствует о «вероятном отсутствии» инфекции мочевого тракта. Исключение: присутствие менее 10^4 бактерий в 1 мл мочи, взятой непосредственно из мочевого пузыря путем надлобковой пункции или цистоскопии.

Категория 2 – Обнаружение 10^4 – 10^5 бактерий в 1 мл мочи. Если у пациента отсутствуют проявления заболевания, необходимо взять еще один анализ и повторить подсчет бактерий. При клинических проявлениях заболевания или если из мочи выделены колонии одного или двух уропатогенных микроорганизмов, проводят идентификацию бактерий и определяют чувствительность к антибиотикам.

Категория 3 – Обнаружение более 10^5 бактерий в 1 мл мочи. Если из мочи выделены колонии одного или двух разных типов, проводят идентификацию бактерий и определяют чувствительность к антибиотикам. Обнаружение такого количества микроорганизмов является серьезным основанием для предположения о наличии инфекции мочевого тракта.

В тех случаях, когда в пробе мочи обнаруживаются более двух видов микроорганизмов в категориях 2 и 3 результаты оценивают как: «Подозрение на контаминацию мочи посторонней флорой, исследование повторить».

38. В отдельных случаях воспалительные процессы в мочевыводящей системе могут протекать и при низких уровнях бактериурии. Это бывает на фоне форсированного диуреза (низкий удельный вес мочи), на фоне антибиотикотерапии, в сочетании с низкими (менее 5) значениями рН мочи. В этом случае постановке диагноза помогает анализ видового состава микрофлоры. Обнаружение эшерихий, протеев, синегнойной палочки, клебсиелл должно расцениваться как неблагоприятный признак. Находки дифтероидов, лактобацилл, грамположительных палочек свидетельствуют о загрязнении нормальной микрофлорой. Обнаружение монокультуры в сочетании с высокой степенью бактериурии характерны для острого воспалительного процесса, ассоциации микроорганизмов – для хронических процессов.

39. В окончательном ответе, который выдается лабораторией, указывается степень бактериурии, вид выделенных культур и их чувствительность к антибактериальным препаратам. Отрицательный результат исследования выдается при отсутствии роста на всех питательных средах в течение 3-5 суток.

ГЛАВА 8

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОТДЕЛЯЕМОГО ИЗ ВЕРХНИХ ОТДЕЛОВ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

40. Общеизвестным этиологическим агентом бактериальных фарингитов являются стрептококки группы А (*S. pyogenes*). Реже воспалительный процесс слизистых верхних дыхательных путей вызывают: *Arcanobacterium haemolyticum* (*Corynebacterium haemolyticum*), *Chlamydo-phyla pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *Mycoplasma pneumoniae*, стрептококки группы С. Значительная часть заболеваний верхних дыхательных путей обусловлена вирусами (80% всех фарингитов).

Острые ларингиты обычно вирусной этиологии, поэтому бактериологическое исследование необходимо для исключения дифтерии и *S. pyogenes*.

Бактериальные синуситы чаще всего вызываются микрофлорой, выделяемой из верхних дыхательных путей: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. aureus*, *M. catarrhalis*, стрептококки групп А и С, *Chlamydothyla pneumoniae*, *P. aeruginosa* и другие НГОБ, смешанная анаэробная инфекция, плесневые грибы (*Aspergillus spp.* и *Hyphomycetes*, вызывающие аллергический синусит, *Zygomycetes* – инвазивное поражение).

При подозрении на наличие у больного дифтерии, коклюша, хламидиоза, микоплазмоза, гонореи, заранее информируют работников лаборатории.

41. Образцы из зева, носоглотки, глотки, гортани.

Мазок следует брать до еды или через 2-3 часа после приёма пищи. Прижимая язык шпателем, вводят стерильный тампон между дужками миндалин и язычком, ротационным движением собирают материал с задней поверхности глотки, миндалин и участков воспаления или изъязвления слизистой. При взятии пробы со слизистой зева и глотки нельзя касаться щёк, языка, дёсен, а также собирать слюну, так как этот материал характеризует слизистые ротовой полости, то есть верхний отдел желудочно-кишечного тракта. Не следует брать материал при воспалённом надгортаннике, так как может возникнуть абструкция дыхательных путей. Тампон помещают в стерильную пробирку, при необходимости используя транспортную среду.

42. Отделяемое из ротовой полости.

Материал берут стерильным ватным тампоном или ложечкой с поражённых участков слизистой оболочки, у выходов протоков слюнных желез, поверхности языка, из язвочек. При наличии пленки ее снимают стерильным пинцетом. Тампон помещают в стерильную пробирку, при необходимости используя транспортную среду.

43. Мазок со слизистой передних отделов полости носа.

Исследование обычно проводится для выявления носительства *S.aureus*. Сухой стерильный тампон поочередно вводят в обе ноздри и вращательными движениями собирают материал со слизистой.

Биологический материал доставляют в лабораторию в максимально короткие сроки, не позднее 1,5-2 ч после их получения. Допускается хранить биологический материал с использованием транспортных систем в течение 24 часов при комнатной температуре.

44. Микроскопия исследуемого материала.

Лабораторная диагностика ангины Венсана основана на микроскопии мазков из зева и десен при окраске разбавленным (1:10) карболовым фуксином. Обнаружение характерных морфологических форм спирохет и фузобактерий, а также в значительном количестве полиморфноядерных нейтрофилов подтверждает наличие инфекции.

45. Посев исследуемого материала.

Питательные среды: кровяной агар, дополнительно, возможно использовать ЖСА, шоколадный агар, среду Эндо (среда Мак-Конки), среду Сабуро.

Допускается использование готовых хромогенных сред, а также коммерческих систем. Посев материала проводится в соответствии с инструкцией к тест-системе.

46. Метод посева: поворачивая тампон вокруг оси равномерно распределить материал на 1/6 поверхности чашки Петри. Затем материал стерильной петлей, штрихом, разносится через первый участок примерно на 1/4 поверхности чашки, чашку поворачивают на 90° и стерильной петлей производят посев штрихом через участок вторичной инокуляции на третий квадрант. Чашку вновь поворачивают на 90° и стерильной петлей рассеивают материал с третьего квадранта на четвертый, причем последними несколькими штрихами, не возвращаясь к третьему квадранту. Для получения отдельных колоний используют 3-4 серии штрихов. Схема посева материала, собранного с помощью микробиологического тампона представлена в приложении 7 к настоящей Инструкции.

Условия культивирования посевов: кровяной и шоколадный агар – при 35-37°C, 5-10% CO₂, в течение 24- 48 часов; среда Эндо (среда Мак-Конки) – при 35-37°C в аэробных условиях, в течение 24 часов; ЖСА – при 35-37°C в аэробных условиях, в течение 24-48 часов; среда Сабуро агар – при 25-30°C в аэробных условиях в течение 72 часов. Чашки с биологическим материалом просматривают ежедневно.

При появлении роста на плотных средах проводят учет колоний различной морфологии, учитывая их рост на секторах: рост колоний микроорганизмов только на I секторе – скудный рост; на I-II секторах – умеренный рост; на III- IV секторах – массивное количество.

Проводят видовую идентификацию микроорганизмов. Отрицательный результат исследования выдается при отсутствии роста на всех питательных средах в течение 3-5 суток.

47. Аспират из придаточных пазух.

47.1. Исследуют при бактериальных синуситах. Отбор материала проводится с соблюдением всех правил асептики и антисептики в количестве не менее 1 мл (не использовать микробиологический тампон!). Образец должен быть доставлен в лабораторию в течение 2-х часов в стерильном контейнере или шприце (возможно использование анаэробных транспортных систем). Допускается хранение проб с использованием транспортных систем в течение 24 часов при комнатной температуре.

47.2. Для микроскопии готовят не менее двух мазков.

Для жидких непрозрачных биологических образцов препарат готовится также как мазки крови: каплю жидкости диаметром 2-3 мм наносят на обезжиренное предметное стекло вблизи от торца, перед каплей ставят

под углом 45° стекло со шлифованным краем и плавным движением равномерно распределяют материал по поверхности.

47.3. Для прозрачных проб производится центрифугирование при 3000 оборотах в течение 5 минут, затем на поверхность предметного стекла наносят 1-2 капли супернатанта.

47.4. Препараты высушивают при комнатной температуре, фиксируют над пламенем и окрашивают метиленовым синим и по Граму, а при подозрении на туберкулез – по Циль-Нильсену, при необходимости – другими методами. Результаты бактериоскопии сообщают лечащему врачу в виде предварительного ответа.

В соответствии с результатами микроскопии могут быть внесены коррективы в ход бактериологического исследования.

47.5. Посев материала.

Материал засевают на питательные среды: кровяной агар, шоколадный агар, среда Эндо (среда МакКонки), ЖСА, анаэробный агар, тиогликолиевую среду, Сабуро агар. При необходимости, в схему исследования могут быть включены дополнительные дифференциально-диагностические среды.

Оставшийся материал используют для посева на среды «обогащения»: 0,1% полужидкий сывороточный агар или ТСБ; бульон Сабуро.

Возможно использование коммерческих флаконов с двухфазной средой с визуальной системой учета роста и флаконов с различными селективными свойствами для автоматизированной системы.

Условия культивирования: кровяной и шоколадный агар – при 35-37°C, 5-10% CO₂, в течение 24-48 часов; среда Эндо (среда Мак-Конки) – при 35-37°C в аэробных условиях, в течение 24 часов; ЖСА – при 35-37°C в аэробных условиях, в течение 24-48 часов; анаэробный агар – при 35-37°C в анаэробных условиях в течение 7 дней; тиогликолевая среда – при 35-37°C в анаэробных условиях в течение 7-10 дней; среда Сабуро – при 25-30°C в аэробных условиях в течение 72 часов; 0,1% полужидкий сывороточный агар или ТСБ – при 35-37°C в аэробных условиях в течение 48 часов. Чашки с биологическим материалом просматривают ежедневно.

47.6 Оценка результатов.

Отрицательный результат исследования выдается при отсутствии роста на всех питательных средах в течение 3-5 суток.

При обнаружении бактерий указывается характер роста на первичных питательных средах и средах обогащения. Выделение бактерий, являющихся нормальной микрофлорой слизистых верхних дыхательных путей, только на средах обогащения для отделяемого из придаточных пазух свидетельствует о высокой вероятности контаминации материала на любом из диагностических этапов (отбор, хранение, транспортировка и посев биологического образца на питательные среды).

ГЛАВА 9

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОТДЕЛЯЕМОГО ИЗ НИЖНИХ ОТДЕЛОВ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

48. Инфекции нижних отделов дыхательных путей – это заболевания, возникающие в трахее, бронхах или легочной ткани (трахеиты, бронхиты, легочные абсцессы, пневмонии). Особенностью микробиологического исследования при инфекционно-воспалительных процессах дыхательных путей является частое наличие в исследуемом материале нескольких видов микроорганизмов. Основные возбудители при разных нозологических формах инфекций нижних дыхательных путей представлены в приложении 8 к настоящей Инструкции.

49. Взятие исследуемого материала.

49.1 Неинвазивные методы.

Мокроту следует отбирать утром, до приема пищи, в стерильный контейнер с крышкой, предварительно почистив зубы и тщательно прополоскав рот кипяченой водой. В случае плохого отхождения мокроты необходимо сделать ингаляцию солевым раствором, а затем откашлять отделяемое из бронхов.

Признаки правильно собранной мокроты: гнойная зеленая; гнойная желтая; слизисто-гнойная (т.е. частично гнойная, частично слизистая); с прожилками крови; с прожилками крови и зелеными включениями.

Признаки неправильно собранной мокроты (мокроты, содержащей в основном секреты ротовой полости и глотки): серая слизистая; серая пенная; белая слизистая; белая пенная; белая слизистая с частицами пищи; водянистая (т.е. присутствует лишь слюна); водянистая, с частицами пищи.

49.2. Инвазивные методы.

Трахеобронхиальные смывы. Гортанным шприцем в трахею вводят примерно 10 мл стерильного физиологического раствора и собирают откашливаемый смыв. У маленьких детей через катетер вводят в трахею 5-10 мл стерильного физиологического раствора и затем отсасывают трансbronхиальный смыв. Бронхиальные смывы, в том числе вблизи очага воспаления, могут быть сделаны с помощью бронхоскопа. Недостатком является значительное разведение трахеобронхиального содержимого, что снижает возможность выделения бактерий.

Браш-биоптат получают их глубины бронхов с помощью специальной канюли с защитными щётками, что предохраняет материал от контаминации флорой верхних дыхательных путей и позволяет производить исследования на анаэробы.

Пунктат из очага воспаления (инфильтрат, абсцесс) получают при трансторакальной пункции под рентгенологическим контролем.

Отбор материала проводится в стерильный контейнер объемом не менее 1 мл (при подозрении на грибковое поражение не менее 10 мл). Образец должен быть доставлен на исследование в течение 2-х часов. Допускается хранение материала в течение 24 часов при 4-6°C (холодильник).

50. Микроскопия исследуемого материала.

Мокроту распределяют тонким слоем по дну чашки Петри, с помощью двух игл или пинцета выбирают слизистые либо гнойные комочки и переносят их на середину предметного стекла. Затем берут второе стекло и накладывают поверх первого. Комочки мокроты растирают между двумя стеклами до тех пор, пока не получится достаточно тонкий мазок. Во избежание инфицирования рук работающего, и на первом и на втором стеклах мазки не должны занимать более 1/2-2/3 поверхности. Высушенные мазки фиксируют в пламени спиртовки и окрашивают по Граму, а при подозрении на туберкулез – по Циль-Нильсену, при необходимости – другими методами. Результаты бактериоскопии сообщают лечащему врачу в виде предварительного ответа.

Препарат мокроты исследуют под малым увеличением микроскопа (объектив $\times 10$) не менее 20-30 полей зрения. При наличии менее 10 полиморфноядерных лейкоцитов и более 25 эпителиальных клеток культуральное исследование нецелесообразно, так как в этом случае изучаемый материал содержит примесь содержимого ротовой полости. Критерии оценки качества материала собранного из нижних отделов дыхательного тракта представлены в приложении 9 к настоящей Инструкции. Суммарная оценка всех параметров 0 и менее свидетельствует о контаминации материала микрофлорой носоглотки. При обнаружении микроорганизмов отмечают их морфологические и тинкториальные свойства (кокки, палочки, отношение к окраске по Граму). При острой инфекции в мокроте, как правило, обнаруживают не более 1-2 типов бактерий, локализованных вблизи гранулоцитов. Микроорганизмы, попавшие из ротовой полости, чаще располагаются около эпителиальных клеток. При исследовании мокроты бактериоскопия мазков является обязательной, так как позволяет судить о качестве взятия мокроты и, во многих случаях, сделать заключение о предполагаемой этиологии инфекции нижних дыхательных путей.

51. Посев исследуемого материала.

51.1. Питательные среды: кровяной агар (для получения роста пневмококков после посева материала на I сектор накладывают диск с оптохином); шоколадный агар с селективной добавкой для гемофилов или кровяной агар с 2-3 сапониновыми дисками (бумажные диски диаметром 6 мм пропитывают 5% водным раствором сапонины, высушивают и хранят при 4°C не более месяца).

Дополнительные питательные среды: ЖСА, среда Эндо (среда Мак-Конки), среда Сабуро, анаэробный агар (только для биологического мате-

риала собранного инвазивным способом). Для выделения легионелл, бордетелл, микоплазм необходимо использовать специальные среды.

51.2. Посевы на кровяном и шоколадном агаре инкубируют – при 35-37⁰С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов, на среде Эндо (среде Мак-Конки) – при 35-37⁰С в аэробных условиях, в течение 24 часов; ЖСА – при 35-37⁰С в аэробных условиях, в течение 24-48 часов; среде Сабуро – при 25-30⁰С в аэробных условиях в течение 72 часов; на анаэробном агаре – при 35-37⁰С в анаэробных условиях в течение 7 дней. Чашки с биологическим материалом просматривают ежедневно.

52. Существуют два подхода к культуральному исследованию мокроты.

52.1. Первый вариант. Мокроту выливают в чашку Петри. С помощью игл, пинцета выбирают 2-3 гнойных комочка, вносят в сосуд (пробирку, колбочку) с 5-10 мл мясопептонного бульона или 2% пептонной воды (рН 7,4-7,6). Осторожно комочки 2-3 раза отмывают. Затем их переносят на питательные среды и равномерно распределяют микробиологической петлей на 1/4 поверхности чашки Петри, чашку поворачивают на 90⁰ и стерильной петлей производят посев штрихом через участок вторичной инокуляции на третий квадрант. Чашку вновь поворачивают на 90⁰ и стерильной петлей рассеивают материал с третьего квадранта на четвертый, причем последними несколькими штрихами, не возвращаясь к третьему квадранту. Для получения отдельных колоний используют 3-4 серии штрихов. Схема посева материала представлена в приложении 2 к настоящей Инструкции.

В результате «отмывки» удаётся освободиться от некоторого количества микроорганизмов – представителей нормальной микрофлоры верхних дыхательных путей. В среднем стократно снижается концентрация непатогенных нейссерий, зеленающих стрептококков, негемолитических стрептококков, стафилококков и др. При этом возможно снижение на 1-2 lg концентрации этиологически значимых микроорганизмов (пневмококков и гемофилов).

Промывные воды бронхов засевают аналогичным образом, но без предварительной отмывки.

Оценка результатов.

При появлении роста на плотных средах проводят учет колоний различной морфологии, учитывая их рост на секторах: рост колоний микроорганизмов только на I секторе – скудный рост; на I-II секторах – умеренный рост; на III-IV секторах – массивное количество.

Проводят видовую идентификацию микроорганизмов. Отрицательный результат исследования выдается при отсутствии роста на всех питательных средах в течение 3-5 суток (при исследовании на анаэробии на 8 сутки).

52.2. Второй вариант. В основе количественного метода лежит высеv на плотные питательные среды из разведений мокроты. Гомогенизация материала позволяет нивелировать неравномерность микробного обсеменения и проводится разными способами: использование муколитиков (ацетилцистеин, мукозольван и другими), применение ферментов (трипсин, хемотрипсин, панкреатин), физическими (ультразвук), механическая гомогенизация (ступка с песком, размельчитель тканей и другие).

Наиболее эффективно применение 0,5% раствора ацетилцистеина. Ацетилцистеин не угнетает рост пневмококков, а выделение гемофильных палочек улучшается, так как он снимает ингибирующее действие муцина на *N. influenzae*. В неметаллический сосуд вносят равные объёмы патологического материала (0,5-1мл мокроты) и муколитика и тщательно перемешивают пипеткой с резиновой грушей 1-2 мин. Ввиду бактерицидного действия ацетилцистеина сразу же делают разведение обработанного материала в соотношении 1:5 (в 1 мл обработанного материала добавляют 4,5 мл питательного бульона или 2% пептонной воды), чем достигается разведение исходного субстрата 1:10 (10^1).

Механические методы гомогенизации материала.

В ступку со стерильным кварцевым песком вносят 0,5-2 мл материала и растирают (25-30 раз) с добавлением 2% пептонной воды или питательного бульона до концентрации 1:10.

Гомогенизация со стеклянными бусами. Берут 1 мл мокроты, добавляют 9 мл питательного бульона или 2% пептонной воды (разведение 1:10, т.е. 10^1) и гомогенизируют в банке со стеклянными бусами 20 мин.

Посев материала.

Приготовленный гомогенизат мокроты принимается за разведение материала 10^{-1} . Из него готовят ряд серийных разведений до 10^{-7} в питательном бульоне или 2% пептонной воде. Засевают по 0,1 мл из разведений 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} , на чашки с кровавым агаром и шоколадным агаром. Посев на ЖСА, среду Эндо (среду МакКонки), среду Сабуро, анаэробный агар делают из исходного разведения 1:10.

53. Содержимое бронхов полученное при бронхоскопии или при заборе через трахеостому, засевают как мокроту, но без предварительного отмывания гнойных комочков. При отсутствии комочков гноя и слизи производят посев материала, набирая его стерильной пипеткой.

Подсчитывают каждый вид микроорганизма. Количество микроорганизмов определяют в максимальном разведении, в котором удалось обнаружить данный вид бактерий. Например: на кровавом агаре выросли 3 колонии пневмококка при посеве 0,1 мл мокроты с разведения 10^{-5} , следовательно, в 1 мл мокроты содержится 3×10 и умноженное на 10^5 (степень разведения) = 3000000 пневмококков или 3×10^6 .

54. Оценка результатов.

Диагностически значимым при исследовании мокроты является обнаружение пневмококка и гемофильной палочки (до антибактериальной терапии) в 1 мл в концентрации 10^6 и выше. Аналогичные концентрации значимы и для условно-патогенных микроорганизмов в случае 2-3-кратного обнаружения с интервалом 3-5 дней. Следует учитывать, что на фоне адекватной антибиотикотерапии происходит снижение количества бактерий в материале.

При количественном подсчете бактерий в трахеобронхиальных смывах, представляющих собой гомогенную взвесь, условно принимают за разведение 1:9. Диагностически значимым является обнаружение пневмококков и гемофильной палочки (до антибактериальной терапии) в концентрации 10^4 . Аналогичные концентрации значимы и для условно-патогенных микроорганизмов в случае 2-3-кратного обнаружения с интервалом 3-5 дней.

ГЛАВА 10

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ АБСЦЕССОВ И РАН

55. Возбудителями гнойно-воспалительных процессов могут быть представители различных родов и видов бактерий, большинство которых являются условно-патогенной микрофлорой. Основными этиологическими агентами являются: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Escherichia* spp., *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp. Микроорганизмы могут вызывать и поддерживать гнойный процесс как в монокультуре, так и в ассоциации.

56. Взятие исследуемого материала.

Взятие материала производится во время операции или перевязки. При наличии абсцессов и ран (фистул, гангрены, некроза тканей) кожу вокруг раневой поверхности обрабатывают антисептиком, некротические массы, детрит, гной удаляют стерильной сухой салфеткой и отбирают отделяемое из основания очага поражения используя стерильный контейнер или шприц объемом не менее 1 мл.

При отборе проб с помощью микробиологического тампона, используют два тампона (один используют для посева, второй – для бактериоскопии). Материал отбирают из глубины пораженного участка на границе со здоровыми тканями и помещают в стерильную пробирку или в транспортную среду. После обработки поверхности раны и высыхания антисептика с помощью шприца получают аспират из глубины раны; если имеется везикула- жидкость и клетки у основания дефекта.

Материал из закрытого абсцесса отбирают с помощью шприца с иглой.

Микробиологическому исследованию при ожогах, язвах, эрозиях, целлюлитах подлежит биопсийный материал. Объем ткани диаметром 3-4 мм – минимальное количество для культурального исследования.

Гнойное содержимое из раны после укусов получают шприцем после надреза, дренирования или поверхностной обработки инфицированной раны. При свежих укусах бактериологическое исследование проводят не ранее чем через 12 часов, так как в этот период трудно выделить этиологически значимый микроорганизм.

Материал, полученный при оперативном вмешательстве (кости, биоптаты мягких тканей) помещают в стерильный контейнер с физраствором.

При наличии в ране дренажей для активной аспирации берут стерильным шприцем 1-2 мл отделяемого и помещают в стерильную пробирку.

Материал, отобранный с помощью микробиологического тампона или собранный в стерильный контейнер, хранится при комнатной температуре не более 2-х часов. Возможно хранение и транспортировка материала в транспортной среде до 24 часов при комнатной температуре.

57. Микроскопия исследуемого материала.

Материал, взятый тампоном, распределяют по стерильному предметному стеклу, окрашивают по Граму. При обнаружении микроорганизмов отмечают их морфологическую характеристику (грамположительные и грамотрицательные палочки, кокки и другое). В соответствии с результатами микроскопии могут быть внесены коррективы в ход бактериологического исследования.

58. Питательные среды: кровяной агар, шоколадный агар, среда Эндо (среда МакКонки), ЖСА, 0,1% полужидкий сывороточный агар или ТСБ или тиогликолевую среду, при подозрении на анаэробную инфекцию – анаэробный агар.

Культивирование: на кровяном агаре при 35-37⁰С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов; на шоколадном агаре при 35-37⁰С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов; среда Эндо агар (среда Мак-Конки) – при 35-37⁰С в аэробных условиях, в течение 24 часов; ЖСА – при 35-37⁰С в аэробных условиях, в течение 24-48 часов; 0,1% полужидкий сывороточный агар или ТСБ – при 35-37⁰С в аэробных условиях в течение 48 часов; анаэробный агар – при 35-37⁰С в анаэробных условиях в течение 7 дней. Чашки с биологическим материалом просматривают ежедневно. При наличии роста в жидких средах, производят высев на кровяной агар.

59. Схема посева биологического материала, собранного с помощью микробиологического тампона, представлена в приложении 7 к настоящей Инструкции. После посева на твердые питательные среды поместить тампон в 0,1% полужидкий сывороточный агар или ТСБ или тиогликолевую среду.

60. Схема посева материала из стерильного контейнера или шприца представлена в приложении 2 к настоящей Инструкции. После посева на твердые питательные среды, материал засеивается в 0,1% полужидкий сывороточный агар, ТСБ, тиогликолевую среду.

61. Оценка результатов.

При появлении роста на плотных средах проводят учет колоний различной морфологии, учитывая их рост на секторах: рост колоний микроорганизмов на только I секторе – скудный рост; на I-II секторах – умеренный рост; на III- IV секторах – массивное количество.

Проводят видовую идентификацию микроорганизмов и определяют чувствительность к антимикробным препаратам. Отрицательный результат исследования выдается при отсутствии роста на всех питательных средах в течение 3-5 суток (при исследовании на анаэробы на 8 сутки).

При обнаружении бактерий указывается характер роста на первичных твердых питательных средах и средах обогащения и чувствительность к антимикробным препаратам. При выделении ассоциации микроорганизмов, в ответе перечисляют все виды микроорганизмов и отмечают, имеется ли преимущественный рост какого - либо из них. Выделение бактерий только на средах обогащения свидетельствует о высокой вероятности контаминации материала на любом из диагностических этапов (отбор, хранение, транспортировка и посев биологического материала на питательные среды).

ГЛАВА 11 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОТДЕЛЯЕМОГО ГЛАЗ

62. Микробиологическое исследование проводится при гнойно-воспалительных заболеваниях конъюнктивы, век, слезных мешков, роговицы. Превалирующей нормальной микрофлорой глаз являются коагулазо-негативные стафилококки, дифтероиды, реже – непатогенные нейссерии и зеленящие стрептококки.

При бактериальных конъюнктивитах чаще обнаруживаются: *S.pneumoniae*, *S.aureus*, *H.influenzae*, *N.meningitidis*, *C.trachomatis*; при кератитах – *S.aureus*, *S.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *Enterococci*, *S.pyogenes*, *Enterobacteriaceae*; при эндофтальмитах – *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *P.acnes*, *B.cereus*, *S.pneumoniae*, *N.meningitidis*.

63. Взятие материала.

Накануне, за 5-8 часов отменяют все лекарственные препараты и процедуры. Материал забирают с пораженных мест в разгар воспалительного процесса с соблюдением правил асептики. Сразу после взятия материал помещается в соответствующую транспортную среду или доставляется в лабораторию не позднее 2-х часов от момента взятия, избе-

гая охлаждения. Допускается хранение материала в транспортной среде при комнатной температуре в течение 24-х часов.

64. Отделяемое с конъюнктивы. Отводят нижнее веко и стерильным тампоном или платиновой петлей проводят по поверхности конъюнктивы нижнего века по направлению к внутреннему углу глаза. Исследование из каждого глаза проводят отдельным тампоном. При поражении одного глаза следует производить забор материала параллельно и из здорового глаза в качестве контроля.

65. Край век. Корочки гноя удаляют пинцетом. Берут материал из язвочки у основания ресниц.

66. Роговица. Материал на исследование, после обезболивания, можно взять платиновой петлей или другим подходящим инструментом. Если пациент применяет контактные линзы, необходимо исследовать их внутреннюю поверхность.

При необходимости, врач-офтальмолог готовит мазки для микроскопического исследования. Взятый дополнительным влажным тампоном (смоченным физиологическим раствором) материал наносят на поверхность предметного стекла. Мазки высушивают, стекло маркируют, на его обратной стороне обводят границы мазка и помещают в контейнер для транспортировки в сопровождении направления (направление к препаратам помещается в полиэтиленовый пакет).

67. Микроскопия исследуемого материала.

Мазки фиксируют над пламенем и окрашивают по Граму или метиленовым синим, при подозрении на туберкулез – по Циль-Нильсену, при необходимости – другими методами. Результаты бактериоскопии немедленно сообщают лечащему врачу в виде предварительного ответа. В соответствии с результатами микроскопии могут быть внесены коррективы в ход бактериологического исследования.

68. Посев исследуемого материала.

Питательные среды: шоколадный агар, кровяной агар, 0,1% полужидкий сывороточный агар или ТСБ или тиогликолевый бульон, при подозрении на грибы – агар Сабуро.

Культивирование: на шоколадном агаре при 35-37⁰С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов, на кровяном агаре при 35-37⁰С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов; Сабуро агар – при 25-30⁰С в аэробных условиях в течение 72 часов; 0,1% полужидкий сывороточный агар или ТСБ или тиогликолевый бульон – при 35-37⁰С в аэробных условиях в течение 48 часов. Чашки с биологическим материалом просматривают ежедневно. При наличии роста в жидких средах, производят высев на кровяной агар.

Посев материала. Схема посева биологического материала собранного с помощью микробиологического тампона представлена в приложении 7 к настоящей Инструкции. После посева на твердые питательные

среды поместить тампон в 0,1% полужидкий сывороточный агар или ТСБ или тиогликолевый бульон.

При появлении роста на плотных средах проводят учет колоний различной морфологии, учитывая их рост на секторах: рост колоний микроорганизмов на только I секторе – скудный рост; на I-II секторах – умеренный рост; на III- IV секторах – массивное количество. При наличии роста в жидких средах, производят высеив на кровяной агар.

Проводят видовую идентификацию микроорганизмов. Отрицательный результат исследования выдается при отсутствии роста на всех питательных средах в течение 3-5 суток.

69. Оценка результатов.

При интерпретации результатов микробиологического исследования глаз необходимо учитывать контингент обследованных больных, анамнез, клинические проявления болезни; сравнивать видовой состав микроорганизмов, выделенных из пораженного и здорового глаза.

Выделение бактерий только на средах обогащения свидетельствует о высокой вероятности контаминации материала на любом из диагностических этапов (отбор, хранение, транспортировка и посев биологического материала на питательные среды).

ГЛАВА 12 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОТДЕЛЯЕМОГО УШЕЙ

70. В норме в наружном ухе, присутствуют условно-патогенные микроорганизмы, представленные нормальными обитателями кожи и слизистых (стафилококки, стрептококки, коринебактерии и другие). В среднем и внутреннем ухе микрофлора отсутствует. Наружный инфекционный отит чаще вызывают *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *Proteus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*

При остром воспалительном отите возбудителем являются *S. pneumoniae*, *Streptococcus* группы B, *H. influenzae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *S. pyogenes*, *M. catarrhalis*.

При хронически протекающей инфекции и серозном среднем отите чаще обнаруживают ассоциации микроорганизмов, основными представителями которых являются *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *M. catarrhalis*, *Proteus spp.*, *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*

71. Взятие исследуемого материала.

71.1. При поражениях среднего и внутреннего уха исследуют пунктаты и материал, полученный во время оперативных вмешательств.

При самопроизвольной перфорации барабанной перепонки экссудат собирают стерильным тампоном, используя слуховое зеркало, в этом слу-

чае высока вероятность контаминации биологического материала эндогенной флорой.

71.2. При воспалении наружного уха отбор материала производится во время операции или перевязки. Промыванием раневой поверхности физиологическим раствором удаляют местно применяемые антисептические и антибактериальные препараты. Кожу вокруг раневой поверхности обрабатывают антисептиком, некротические массы, детрит, гной удаляют стерильной сухой салфеткой и отбирают отделяемое из основания очага поражения.

Материал, отобранный с помощью микробиологического тампона или собранный в стерильный контейнер храниться при комнатной температуре и доставляется на исследование не позднее 2-х часов. Допускается хранение и транспортировка материала в транспортной среде до 24 часов при комнатной температуре.

72. Микроскопия исследуемого материала.

Мазки фиксируют над пламенем и окрашивают по Граму или метиленовым синим, при подозрении на туберкулез – по Циль-Нильсену, при необходимости – другими методами. Результаты бактериоскопии немедленно сообщают лечащему врачу в виде предварительного ответа. В соответствии с результатами микроскопии могут быть внесены коррективы в ход бактериологического исследования.

73. Посев исследуемого материала.

Питательные среды:

Внутреннее ухо: кровяной агар, шоколадный агар, среда Эндо (среда МакКонки), ЖСА, 0,1% полужидкий сывороточный агар или ТСБ или тиогликолевая среда, при подозрении на грибы – среда Сабуро, при подозрении на анаэробную инфекцию – анаэробный агар.

Наружное ухо: кровяной агар, шоколадный агар, агар Эндо (МакКонки агар), ЖСА, при подозрении на грибы – агар Сабуро.

Культивирование: на кровяном агаре при 35-37⁰С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов; на шоколадном агаре при 35-37⁰С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов; Эндо агар (Мак-Конки агар) – при 35-37⁰С в аэробных условиях, в течение 24 часов; ЖСА – при 35-37⁰С в аэробных условиях, в течение 24-48 часов; 0,1% полужидкий сывороточный агар, ТСБ, тиогликолевая среда – при 35-37⁰С в аэробных условиях в течение 48 часов; Сабуро агар – при 25-30⁰С в аэробных условиях в течение 72 часов; анаэробный агар – при 35-37⁰С в анаэробных условиях в течение 7 дней. Чашки с биологическим материалом просматривают ежедневно. При отсутствии роста колоний на твердых средах делают высев из сред «обогащения» на кровяной агар и шоколадный агар.

Схема посева биологического материала собранного с помощью микробиологического тампона представлена в приложении 7 к настоящей Инструкции. После посева на твердые питательные среды поместить там-

пон в 0,1% полужидкий сывороточный агар или ТСБ или тиогликолевую среду.

При появлении роста на плотных средах проводят учет колоний различной морфологии, учитывая их рост на секторах: рост колоний микроорганизмов на только I секторе – скудный рост; на I-II секторах – умеренный рост; на III- IV секторах – массивное количество. При наличии роста в жидких средах, производят высев на кровяной агар.

Проводят видовую идентификацию микроорганизмов. Отрицательный результат исследования выдается при отсутствии роста на всех питательных средах в течение 3-5 суток (при исследовании на анаэробы на 8 сутки).

74. Оценка результатов.

Выделение бактерий только на средах обогащения свидетельствует о высокой вероятности контаминации материала на любом из диагностических этапов (отбор, хранение, транспортировка и посев биологического материала на питательные среды).

ГЛАВА 13 МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОТДЕЛЯЕМОГО ИЗ УРОГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА

75. Возбудителями неспецифических воспалительных заболеваний женских половых органов являются в основном представители нормальной микрофлоры: представители семейства энтеробактерий, энтерококки, псевдомонады, стафилококки, стрептококки, микоплазмы, уреоплазмы, дрожжеподобные грибы, анаэробные бактерии и другие. Условно-патогенные микроорганизмы могут вызывать внутриутробную патологию плода и новорожденного и септические аборты.

Содержимое цервикального канала в норме стерильно. У наружного зева в слизистой пробке в небольшом количестве могут быть обнаружены преимущественно молочнокислые бактерии как результат обсеменения микрофлорой верхней трети влагалища. Полость и придатки матки в норме стерильны.

Нарушение количественного соотношения и видового состава микрофлоры влагалища приводит к инфекционным заболеваниям – вагиниту, сопровождающемуся воспалительной реакцией тканей и бактериальному вагинозу – инфекционному невоспалительному синдрому, связанному с дисбиозом влагалищного биотопа.

Неспецифические инфекции урогенитального тракта у мужчин вызывают условно-патогенные микроорганизмы: кишечные палочки, протеи, клебсиеллы, псевдомонады, энтерококки, стафилококки, стрептококки, грибы и другие.

76. Взятие, транспортировка и хранение клинического материала при инфекциях урогенитального тракта в соответствии с приложением 10 к настоящей Инструкции.

77. Микроскопия исследуемого материала.

Мазки фиксируют на пламени и окрашивают по Граму или метиленовым синим, по Романовскому-Гимзе, при необходимости – другими методами. В соответствии с результатами микроскопии могут быть внесены коррективы в ход бактериологического исследования.

78. Посев исследуемого материала.

Питательные среды: кровяной агар, среда Эндо (среда Мак-Конки), среда Сабуро – при подозрении на грибковое поражение. Возможно использование других дифференциально-диагностических сред для выделения представителей нормальной микрофлоры и предполагаемых инфекционных агентов, при соответствующей клинической ситуации. Допускается использование готовых хромогенных сред, а также коммерческих тест-систем. Посев биологического материала в таких случаях проводится в соответствии с инструкцией к тест-системе.

Культивирование. Кровяной агар – при 35-37⁰С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов; среда Эндо (среда Мак-Конки) – при 35-37⁰С в аэробных условиях, в течение 24 часов; Сабуро агар – при 25-30⁰С в аэробных условиях, в течение 72 часов. Чашки с биологическим материалом просматривают ежедневно.

Полуколичественный метод посева. Схема посева биологического материала собранного с помощью микробиологического тампона представлена в приложении 7 к настоящей Инструкции.

Доставленные в лабораторию жидкие пробы (гной, экссудат, содержимое тубоовариальных образований, околоплодные воды) засевают по 0,1 мл на плотные питательные среды, распределяя материал по поверхности среды шпателем или используя полуколичественный метод посева. Схема посева материала полуколичественным методом представлена в приложении 2 к настоящей Инструкции.

При появлении роста на плотных средах проводят учет колоний различной морфологии, учитывая их рост на секторах: рост колоний микроорганизмов на только I секторе – скудный рост; на I-II секторах – умеренный рост; на III- IV секторах – массивное количество.

Проводят видовую идентификацию микроорганизмов. Отрицательный результат исследования выдается при отсутствии роста на всех питательных средах в течение 3-5 суток.

Гнойное отделяемое, экссудат, содержимое язв, эрозий и т.п. исследуют по схемам указанным в Главе 10 настоящей инструкции. Материал из тубоовариальных образований, околоплодные воды и т.п., биопсийный материал внутренних органов и тканей исследуют по схемам указанным в Главе 5 настоящей инструкции.

79. Оценка результатов.

При обнаружении бактерий указывается характер роста на первичных твердых питательных средах и средах обогащения. Выделение бактерий только на средах обогащения свидетельствует о высокой вероятности контаминации материала на любом из диагностических этапов (отбор, хранение, транспортировка и посев биологического материала на питательные среды).

ГЛАВА 14

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МАТЕРИАЛОВ ПРИ АУТОПСИИ

80. Микробиологические исследования проводят в случаях летальных исходов больных, умерших при наличии у них гнойно-воспалительных заболеваний, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. В зависимости от клинического диагноза и обнаруженных в процессе вскрытия патологоанатомических находок, материалом для микробиологического исследования служат органы и ткани, кровь, экссудат и т.д.

81. Взятие исследуемого материала. Материал для бактериологического исследования берет персонал патологоанатомического отделения (врач, фельдшер-лаборант). Необходимые инструменты для проведения забора: платиновая (металлическая) петля, шпатель, скальпель, спиртовая горелка, бактериологические пробирки. Взятие материала производят до изъятия органов из трупа и до соприкосновения их с нестерильными предметами (перчатки, секционные инструменты). Посевы материала из органов делаются после прижигания их раскаленным шпателем той поверхности, которую предполагают разрезать. Разрезание производят скальпелем, предварительно прожженным над пламенем спиртовки. В разрез вводится петля, после чего материал помещается в стерильную пробирку. Основным условием для получения достоверных результатов и правильной их интерпретации является раннее (12-24 часа) после смерти больного, взятие материала. Наиболее приемлемым для микробиологического исследования принято считать отбор материала в течение первых 15 часов после смерти.

Пробы крови получают из левого желудочка сердца шприцем, пастеровскими пипетками или бактериологической петлей, после прижигания поверхности предсердия прокаленным шпателем. Кровь исследуют согласно Главе 3 настоящей инструкции.

Забор жидкостей из полостей тела производят аналогично забору крови после прижигания стенок полостей.

Забор материала из печени, селезенки, легкого, почек производят после прижигания поверхности шпателем и разреза органа.

Забор содержимого кишечника производят петлей после прижигания серозной оболочки шпателем и разреза стенки кишки.

При вскрытии черепа и после рассечения твердой мозговой оболочки делают посевы с поверхности мягких мозговых оболочек, если они пропитаны экссудатом.

Забор материала при исследовании плаценты осуществляется непосредственно в родильном зале и проводится с нижней поверхности хориальной пластинки.

При наличии ран и язв рекомендуется брать материал в области их края и дна.

82. Рекомендуемый перечень исследуемых материалов при различной инфекционной патологии.

Сепсис: кровь, легкое, селезенка, печень, гной из метастатических абсцессов.

Пневмония: легкое, кровь, слизь из бронхов, абсцессы.

Перитонит: кровь, гнойный экссудат.

Раневая инфекция: кровь, экссудаты, гной, некротический детрит, метастатические абсцессы, регионарные лимфатические узлы, селезенка.

Менингиты: ликвор, гной из оболочек, ткань мозга с гнойным пропитыванием оболочек, легкое.

Инфекции мочеполового тракта: кровь, почки, экссудат.

Кишечные инфекции: содержимое толстой (тонкой) кишки, содержимое желчного пузыря, селезенка.

Материал должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-2 часов после забора с соответствующим направлением (с указанием даты смерти и даты забора материала).

83. Микроскопия исследуемого материала.

С поверхности исследуемого органа готовят мазки-отпечатки и окрашивают их по Граму. При микроскопии отмечают степень обсемененности бактериями, морфологию и тинкториальные свойства микроорганизмов. В зависимости от результатов бактериоскопии, клинического диагноза и данных прижизненного микробиологического обследования вносят коррективы в ход исследования (увеличивают набор питательных сред для первичного посева).

84. Посев исследуемого материала.

Питательные среды: кровяной агар, шоколадный агар, среда Эндо агар (среда МакКонки), ЖСА, анаэробный агар, среда Сабуро, селенитовый бульон. При необходимости, в схему исследования могут быть включены дополнительные дифференциально-диагностические среды.

Оставшийся материал используют для посева на среды «обогащения»: 0,1% полужидкий сывороточный агар или ТСБ.

Возможно использование коммерческих флаконов с двухфазной средой с визуальной системой учета роста и флаконов с различными селективными свойствами для автоматизированной системы.

Культивирование: на кровяном агаре при 35-37⁰С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов; на шоколадном агаре при 35-37⁰С, 5-10% СО₂, в течение 24-48 часов; среда Эндо (среда Мак-Конки) – при 35-37⁰С в аэробных условиях, в течение 24 часов; ЖСА – при 35-37⁰С в аэробных условиях, в течение 24-48 часов; 0,1% полужидкий сывороточный агар или ТСБ – при 35-37⁰С в аэробных условиях в течение 48 часов; среда Сабуро – при 25-30⁰С в аэробных условиях в течение 72 часов; анаэробный агар – при 35-37⁰С в анаэробных условиях в течение 7 дней. Для выделения сальмонелл материал засевают в соотношении 1:9 в селенитовый бульон при 35-37⁰С в аэробных условиях, в последующем на протяжении 3 дней ежедневно производят высевы на висмут-сульфит агар.

85. Оценка результатов.

Посмертное культивирование позволяет не только идентифицировать микроорганизмы, но также определить их чувствительность к антимикробным препаратам, что представляется важным, в частности для контроля за внутрибольничными инфекциями. Результаты культивирования аутопсийного материала интерпретируют подобно результатам микробиологического исследования прижизненных образцов. Важное значение имеет дифференциация клинически значимых микроорганизмов, которые могли играть этиологическую роль в развитии болезни или обусловить смерть пациента, от тех, которые не имеют клинического значения. При интерпретации результатов культивирования посмертных образцов используют те же критерии, что и для других клинических образцов. Патогенные микроорганизмы, например сальмонеллы или микобактерии туберкулеза, не являются представителями нормальной микрофлоры человека и чрезвычайно редко контаминируют образцы. Поэтому их присутствие свидетельствует о наличии инфекции. Основные проблемы, как правило, связаны с интерпретацией выделения условно-патогенных микроорганизмов. Трудности часто возникают при сопоставлении результатов культивирования с данными микроскопического исследования окрашенных по Граму гистологических срезов тканей. В срезах тканей грамположительные микроорганизмы обычно видны лучше, чем грамотрицательные. Поскольку срез толще, чем мазок, многие микроорганизмы в нем трудно различимы. Результаты микробиологического исследования должны быть сопоставлены с эпидемиологическими, клиническими и патологоанатомическими данными, а также с результатами лабораторных исследований, выполненных при жизни пациента. Рост микроорганизмов при культивировании секционных образцов крови из сердца или селезенки

может быть результатом контаминации, «агональной» бактериемии или влияния других факторов. При посмертном исследовании крови, взятой из сердца или селезенки, одним из основных критериев этиологической значимости является выделение культур тех же микроорганизмов, которые высевались из периферической крови при жизни пациента.

Факт выделения культуры из легких часто является трудным для интерпретации. Нередко могут возникать несоответствия результатов культивирования и данных микроскопического исследования. Микроорганизмы, в том числе патогенные, могут проникать в легкие еще при жизни пациента, в частности посредством микроаспирации отделяемого ротоглотки. В связи с этим материал для микробиологического исследования необходимо забирать только из тех участков легочной ткани, морфологические изменения которых указывают на наличие инфекционного процесса. При интерпретации результатов посмертного исследования образцов легочной ткани необходимо учитывать также изменение респираторной микрофлоры у госпитализированных пациентов. В целом к оценке аутопсийных культур, выделенных из легочной ткани, надо подходить как и при обычном микробиологическом исследовании мокроты. Как и в случае прижизненного исследования, основным критерием качества образца является соотношение числа эпителиальных клеток и полиморфно-ядерных нейтрофилов. Присутствие в мазке, окрашенной по Граму, большого числа нейтрофилов (более 25 в поле зрения при малом увеличении) подтверждает инфекционный процесс в легких и свидетельствует о пригодности образца мокроты для бактериологического исследования. Если материал для посмертного культурального исследования и для гистологических срезов берется из одной и той же области, как и при исследовании мокроты, значимость выделенных культур оценивается в зависимости от наличия воспалительных изменений.

При оценке культур, выделяемых из других висцеральных органов, таких, как печень или почки, могут также возникать описанные выше проблемы. Рост микроорганизмов при исследовании этих образцов может быть результатом как инфекции, так и контаминации. Положительный результат посмертного микробиологического исследования печени или почек может быть также следствием бактериемии. В таких случаях следует ожидать роста тех же микроорганизмов при исследовании другого аутопсийного материала, например крови из сердца или селезенки.

Отрицательный результат исследования выдается при отсутствии роста на всех питательных средах в течение 3 (соответственно 5 или 8) суток.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ГРУДНОГО МОЛОКА

86. Микробиологическое исследование грудного молока проводится у женщин, переболевших любой формой мастита, при инфекционно-воспалительных заболеваниях с локализацией на молочной железе и вне ее после клинического выздоровления, у женщин имеющих детей на грудном вскармливании с упорными диареями и тяжелыми формами гнойно-септических заболеваний.

Чаще всего причиной маститов является *S.aureus*. Другими возбудителями могут быть коагулазонегативные стафилококки, бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Streptococcaceae*.

87. Отбор проб. В день отбора проб женщина принимает душ, надевает чистое белье. Перед сцеживанием молока она моет руки с мылом, тщательно обрабатывает соски и около сосковую область молочных желез тампонами, смоченными 70° этиловым спиртом или другим антисептиком (каждая железа обрабатывается отдельным тампоном). Первые 5-10 мл сцеженного молока выливаются, последующие 3-4 мл сцеживаются в стерильные контейнеры (для каждой железы отдельно). Контейнеры закрываются, маркируются и доставляются в лабораторию. От момента сцеживания молока до начала его исследования не должно пройти более 2-х часов.

88. Посев материала. Питательные среды: кровяной агар, ЖСА, среда Эндо (среда Мак-Конки).

Материал по 0,2 мл засевают на чашки с питательными средами. Распределяют при помощи стерильного шпателя по поверхности сред.

89. Культивирование: на кровяном агаре при 35-37°С, 5-10% CO₂, в течение 24-48 часов; среде Эндо (среде Мак-Конки) – при 35-37°С в аэробных условиях, в течение 24 часов; ЖСА – при 35-37°С в аэробных условиях, в течение 24-48 часов.

Подсчитывают выросшие колонии. Число выросших колоний умножается на 5 (при посеве 0,2 мл), т.к. массивность обсеменения выражается количеством колониобразующих единиц (КОЕ) в 1,0 мл исследуемого молока. Производят отсев выросших колоний для накопления чистой культуры и дальнейшей идентификации.

90. Оценка результатов.

В случае наличия в 1,0 мл молока 250 и более КОЕ микроорганизмов обсемененность характеризуется как массивная, в случае менее 250 КОЕ – как немассивная. При неоднородном росте регистрируется каждая разновидность колоний на каждой питательной среде. При отсутствии роста дают заключение на третьи сутки исследования: патогенная и условно-патогенная флора не выделена.

РАЗДЕЛ III МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

ГЛАВА 16 МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА STAPHYLOCOCCUS

91. Стафилококки (род *Staphylococcus*) входят в состав нормальной микрофлоры кожи и слизистых тела человека. Разделяются на виды: *S. aureus* (наиболее патогенный для человека), *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* и другие. Могут вызывать гнойно-воспалительные заболевания.

Стафилококки – грамположительные микроорганизмы сферической формы, диаметром до 1 мкм. В чистой культуре располагаются в виде скоплений, напоминающих гроздь винограда, а в биологическом материале – небольшими скоплениями кокков. Неподвижны, факультативные анаэробы.

92. Ход исследования.

92.1. Целью первичной идентификации является дифференциация стафилококков от микрококков и других аэробных каталазопозитивных кокков. В мазках, окрашенных по Граму, стафилококки располагаются по одиночке, парами или в виде скоплений (гроздей) неправильной формы. Для микрококков, помимо указанных вариантов, характерно также образование тетрад и пакетов. Размеры микробных клеток у микрококков, как правило, больше (диаметр 0,5-3,5 мкм), чем у стафилококков (диаметр 0,5-1,5 мкм). Признаки позволяющие дифференцировать стафилококки и микрококки представлены в приложении 11 к настоящей Инструкции.

Отличием стафилококков от микрококков является золотистая (от палевых до ярко-золотистых) или белая окраска колоний на кровяном агаре. Микрококки, как правило, окрашены в желтый (с различными оттенками – от желто-зеленого до оранжевого) или розовый (вплоть до красного) цвета.

Большинство штаммов *S. aureus* и некоторые штаммы *S. epidermidis* растворяют эритроциты, образуя прозрачную зону гемолиза вокруг колоний. Микрококки гемолитическими свойствами не обладают.

92.2. Определение ферментации глюкозы в анаэробных условиях.

Стафилококки являются факультативными анаэробами (способны расти и ферментировать глюкозу в анаэробных условиях), микрококки – облигатными аэробами (лишены этой способности).

Способность к ферментации глюкозы определяется в полужидкой среде (0,3% агар), содержащей 1% глюкозы с индикатором ВР или среде Хью-Лейфсона с индикатором бромтимоловым синим. Среда Хью-Лейфсона является более чувствительной, поскольку изменение ее

окраски на желтый цвет происходит при более высоких значениях рН, что позволяет выявить ферментацию глюкозы слабо активными штаммами вида *S. saprophyticus*. Если на среде с индикатором ВР штамм дал отрицательную реакцию, исследование следует повторить на среде Хью-Лейфсона. Среды разливают по 5 мл в пробирки и стерилизуют. Перед посевом пробирки со средой прогревают на водяной бане 15 минут и быстро охлаждают для удаления кислорода.

Ход исследования. Суточную агаровую культуру исследуемого штамма сеют в столбик среды уколom до дна пробирки, затем на поверхность агара наливают 1,5 мл стерильного вазелинового масла для создания анаэробных условий. Посев инкубируют при 35-37⁰С, в течение 5 суток, ежедневно регистрируя результаты. Реакция считается положительной, если происходит желтое окрашивание столбика среды, занимающее не менее чем 2/3 его высоты.

92.3. Окисление глицерина.

Принцип метода. Определение кислотообразования на среде с глицерином – стафилококки разлагают глицерин, микрококки не разлагают глицерин.

92.4. Видовая идентификация рода *Staphylococcus*. Тесты для идентификации видов рода *Staphylococcus* представлены в приложении 12 к настоящей Инструкции.

92.5. По наличию коагулазы все стафилококки разделяют на две группы: коагулазоположительные и коагулазоотрицательные. Основным представителем коагулазоположительных стафилококков является *S. aureus*, коагулазоотрицательных – *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*.

Если штамм не относится к виду *S. aureus* проводят его идентификацию для выяснения принадлежности культуры к видам *S. epidermidis* или *S. saprophyticus*, при необходимости, и к другим видам.

92.6. Определение лецитиназы.

Ход исследования. Для выявления лецитиназы достаточно инкубации посева в течение 18-24 часов при 35-37⁰С. Выявление пигмента у колоний иногда требует дополнительной инкубации в течение 18-24 часов при комнатной температуре. О наличии лецитиназы свидетельствует, образование вокруг колонии радужного венчика. Как правило, штаммы *S. aureus* обладают лецитиназой и пигментом, а культуры *S. epidermidis* и *S. saprophyticus* лишены их. Возможны, исключения: некоторые штаммы *S. aureus* не имеют пигмента или лецитиназы, а ряд штаммов *S. epidermidis* обладает лецитиназной активностью.

92.7. Идентификация *S. aureus* требует постановки теста на наличие плазмокоагулазы. Если после этого штамм идентифицировать не удастся, дополнительно определяют один из двух признаков: наличие ДНК-азы (что предпочтительнее) или способность ферментировать маннит в

анаэробных условиях. Схема идентификации *S. aureus* представлена в приложении 13 к настоящей Инструкции.

93. При наличии положительного результата в реакции плазмокоагуляции и хотя бы в одном из двух предварительных тестов (пигмент, лецитиназа) исследуемый штамм может быть отнесен к виду *S. aureus* (варианты 1-3). Отсутствие плазмокоагулазы и хотя бы одного из первых двух признаков дает основание считать, что штамм не принадлежит к *S. aureus* (варианты 5-7). Расхождения между результатами реакции плазмокоагуляции, с одной стороны, и двух предварительных тестов - с другой (варианты 4 и 8) требуют постановки одного из двух дополнительных тестов (ДНК-аза или ферментация маннита в анаэробных условиях). В случае совпадения результатов дополнительного теста с результатами реакции плазмокоагуляции штамм считается либо относящимся к виду *S. aureus* (при положительных результатах, варианты 4а и 4в), либо не относящимся к нему (при отрицательных результатах, варианты 8б и 8г). При расхождении результатов реакции плазмокоагуляции и дополнительного теста вопрос решается с учетом большинства положительных (принадлежность к виду *S. aureus*, варианты 8а и 8в) или отрицательных (принадлежность к другим видам, варианты 4б и 4г) результатов. Проводить идентификацию *S. aureus* лишь на основании результата одного теста не рекомендуется.

94. Реакция плазмокоагуляции.

Принцип. Под действием фермента плазмокоагулазы активируется естественная система свертывания крови (плазминогенпротромбин).

Реактивы. Плазма кроличья, сухая, цитратная для реакции плазмокоагуляции, готовая.

Ход исследования. В пробирку вносят 1 петлю суточной агаровой культуры исследуемого штамма, которую суспендируют в плазме, помещают в термостат при 35-37⁰С и регистрируют результаты реакции через 1, 2, 4 и 18 часов инкубации.

Оценка результатов. Появление на дне пробирки студнеобразного сгустка любого размера считается положительным результатом реакции. Положительным результатом следует считать наличие плазмокоагуляции в первые 4 часа инкубации. Отсутствие свертывания плазмы в течение 18 часов расценивается как отрицательный результат.

95. Определение белка А.

Наличие белка А определяют в реакции слайд-агглютинации. Наличие белка А у *S. aureus* кореллирует с наличием фермента коагулазы. Реакция ставится в соответствии с инструкцией к соответствующему латекс-тесту.

96. Определение ДНК-азы.

Принцип. Под действием ДНК-азы (далее – дезоксирибонуклеазы) добавленная в плотную среду высокополимерная ДНК распадается на

низкополимерные фрагменты. При этом мутная среда, содержащая высокополимерную ДНК, становится прозрачной.

Ход исследования. Суточную агаровую культуру исследуемого штамма засевают коротким (1-1,5 см) штрихом на поверхность подсушенного агара. На одну чашку можно посеять до 16 штаммов. После 18-24 часовой инкубации при 35-37⁰С поверхность агара заливают небольшим количеством (5-7 мл) 3 моль/л раствора HCl. Через 2-3 минуты кислоту сливают и регистрируют результаты.

Оценка результатов. Появление вокруг культуры прозрачной зоны (деполимеризация ДНК), которая в 4 и более раз превосходит по ширине зону микробного роста (ширина последней должна превышать 2-3мм), свидетельствует о положительной реакции на ДНК-азу. Меньшая зона депполимеризации ДНК расценивается как сомнительная реакция и учету не подлежит.

97. Определение ферментации маннита в анаэробных условиях.

Определение проводят аналогично определению ферментации глюкозы в анаэробных условиях, но в качестве субстрата используют 1% раствор маннита.

98. Лизоцимная активность.

Для определения наличия в культуре лизоцима используют культуру *Micrococcus lysodeiticus*. Смыв этой культуры (2 млрд. микробных клеток на 1 мл среды) подвергают 20-минутному кипячению и добавляют к расплавленному агару. Перемешивают и разливают в чашки Петри. После подсушивания агара делают посев исследуемой культуры и инкубируют при 35-37⁰С 24-48 часов. При наличии лизоцима вокруг посева образуется зона просветления.

99. Идентификация *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*.

Те штаммы, которые признаны не относящимися к *S. aureus*, подвергаются дальнейшей идентификации для установления их видовой принадлежности. Дифференциацию *S. epidermidis* от *S. saprophyticus* рекомендуется проводить в трех тестах: определение устойчивости к новобиоцину, определение фосфатазы, определение способности окислять маннит. Дифференциальные признаки *S. epidermidis* и *S. saprophyticus* представлены в приложении 14 к настоящей Инструкции.

Для штаммов *S. epidermidis* характерны: чувствительность к новобиоцину, наличие фосфатазы, неспособность окислять маннит, для штаммов *S. saprophyticus* – противоположные свойства. Поскольку не все стафилококки по своим характеристикам укладываются в указанную схему, такие штаммы следует обозначать *Staphylococcus spp.*

100. Определение устойчивости к новобиоцину.

Принцип. Антибиотик новобиоцин в избранной концентрации подавляет рост штаммов *S. epidermidis*, но не влияет на рост естественно устойчивых к нему штаммов *S. saprophyticus*.

Ход исследования. Одну каплю суточной бульонной культуры исследуемого штамма засевают с помощью петли на поверхность агара (на одну чашку можно сеять не менее 25 штаммов). Посевы инкубируют 24 часа при 35-37⁰С, регистрируют результаты. Рост штамма в виде крупной бляшки свидетельствует о его устойчивости к новобиоцину. Полное отсутствие роста или наличие небольшого числа отдельных мелких колоний дает основание считать штамм чувствительным к новобиоцину.

Может быть использован метод диффузии в агар с применением бумажных стандартных дисков с новобиоцином.

101. Определение окисления маннита.

Принцип. При окислении маннита в аэробных условиях, образуется уксусная кислота, которая закисляет среду, что выявляется с помощью индикатора.

Ингредиенты. Для постановки опыта рекомендуется плотная (1,8% агара) среда с индикатором ВР и среда Хью-Лейфсона, содержащие 1% маннита. Среду разливают в чашки Петри.

Ход исследования.

Суточные агаровые культуры исследуемых штаммов сеют на среду бляшками (не более 16 штаммов на одну чашку). Посевы инкубируют при 35-37⁰С, результаты регистрируют через одни сутки. Появление желтого окрашивания вокруг макроколонии свидетельствует о положительной реакции.

102. Идентификацию стафилококков возможно осуществлять на коммерческих тест-системах с визуальным учетом или с использованием автоматических и полуавтоматических микробиологических анализаторов.

ГЛАВА 17 МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА STREPTOCOCCUS

103. Род *Streptococcus* объединяет группу грамположительных, факультативно анаэробных кокков, облигатным признаком которых является отрицательный каталазный тест. Род объединяет несколько десятков видов, различающихся по антигенным, биохимическим свойствам, патогенности в отношении человека.

Бактерии рода *Streptococcus* вызывают поражения дыхательных путей (пневмония, скарлатина, фарингит, ангина, отит, мастоидит и др.), сердечно-сосудистой системы (эндокардит и др.), гнойно-воспалительные заболевания кожи и подкожной клетчатки (рожа, флегмона, стрептодермии, целлюлит и др.), инвазивные формы (некротический фасциит, инфекционный миозит), генерализованные формы (сепсис, синдром токсического шока), центральной нервной системы (менингит,

послеродовые и детские инфекции, воспалительные заболевания полости рта и др.), постстрептококковые хронические заболевания (ревматизм, гломерулонефрит).

104. Ход исследования.

104.1. Тщательно наносят исследуемый материал на 1/6 поверхности (приблизительно 2×3 см) около края чашки с кровяным агаром. Затем стерильной петлей материал штрихом разносится через первый участок примерно на 1/4 поверхности чашки Петри, чашку поворачивают на 90° и стерильной петлей производят посев штрихом через участок вторичной инокуляции на третий квадрант. Чашку вновь поворачивают на 90° и стерильной петлей рассеивают материал с третьего квадранта на четвертый, последними несколькими штрихами, не возвращаясь к третьему квадранту. Используют 3-4 серии штрихов для получения отдельных колоний. Следует сделать проколы вглубь агара в нескольких местах (как в засеянных, так и незасеянных участках чашки) без прожигания петли. Рост в толще кровяного агара сопровождается максимально выраженной гемолитической реакцией.

104.2. Идентификация начинается с изучения колоний в первичных посевах материала на чашках с кровяным агаром.

Для дифференциации стрептококков от других организмов (*Haemophilis*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *Moraxella*, *Branhamella*) из колоний готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. В препаратах, стрептококки располагаются парами, короткими цепочками, иногда образуют скопления, напоминающие гроздь стафилококков. Морфологические свойства стрептококков, особенно в первых генерациях, характеризуются выраженным полиморфизмом. Наряду с шарообразными формами в мазках содержатся вытянутые в длину грубые кокки разной величины, даже в пределах одной цепочки. Пневмококки представляют собой ланцетовидные диплококки с заостренными наружными концами, каждая пара кокков или несколько пар заключены в капсулу, образуя цепочки.

104.3. Стрептококки вызывают 4 типа гемолиза на кровяном агаре при инкубации 5-10% CO₂:

α-гемолиз – частичный лизис окружающих колонию эритроцитов, вызывающий зеленовато-серое или коричневое окрашивание среды. Зеленыящие стрептококки растут в виде мелких, 1,0-1,5 мм в диаметре, колоний серовато-зеленоватого цвета, с гладкой или шероховатой поверхностью. Этот тип колоний характерен для многих стрептококков вегетирующих постоянно на слизистой полости рта (группы *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. mitis* и др.), для отдельных штаммов *S. agalactiae*. Колонии пневмококка на кровяном агаре полупрозрачные, плоские с приподнятым краем и блюдцеобразным центром, вокруг колоний зеленыящая зона гемолиза. R-формы образуют сферические колонии с неровными краями. Колонии пневмо-

кокка иногда имеют вид серовато-мутных, слизистых колоний до 2 мм в диаметре, склонных к слиянию между собой. При просмотре в стереомикроскопе (в проходящем свете) в зоне гемолиза вокруг колоний и местах проколов петлей видны редкие или даже единичные эритроциты;

α-прим – узкая зона интактных эритроцитов, непосредственно прилегающих к колонии с зоной полного гемолиза, окружающей зону интактных эритроцитов. Этот тип гемолиза иногда принимают за β-гемолиз. Он также называется «широкозонный α-гемолиз»;

β-гемолиз – полный лизис окружающих колонию эритроцитов (полное просветление среды), шириной от десятых долей до нескольких миллиметров. В свою очередь эти колонии могут быть: слизистыми (мукоидные) – прозрачные, правильной круглой формы, напоминающие капельки росы, диаметром 0,5-2,0 мм, такие колонии образуют штаммы *Streptococcus pyogenes*; матовые (шероховатые) – круглые колонии серовато-белого цвета диаметром 0,5-2 мм с характерным слегка приподнятым центром, такие колонии также образуют штаммы *Streptococcus pyogenes*; гладкие – мелкие сферической формы с ровным краем и блестящей влажной поверхностью, диаметром до 1 мм, такие колонии образуют слабовирулентные или авирулентные штаммы *S. pyogenes*, этот же тип колоний характерен и для *S. agalactiae* и некоторых штаммов энтерококков. При просмотре в стереомикроскопе (в проходящем свете) в зоне гемолиза вокруг колоний и местах проколов петлей эритроциты отсутствуют полностью;

γ-гемолиз – гемолиз и изменение цвета окружающей колонию среды отсутствуют. Штаммы этих стрептококков выделенные от человека обычно слабо вирулентные, в большинстве случаев не имеют практического значения и обычно называются «негемолитические».

Если после инкубации в течение 24 часов гемолиз отсутствует, посе-вы оставляют в термостате еще на 24 часа.

104.4. Тест на каталазу. Стрептококки дают отрицательную каталазную реакцию (не обладают ферментом каталаза).

104.5. При обнаружении стрептококков в препарате оставшийся от микроскопического исследования материал колоний снимают петлей и инокулируют в питательный бульон с сывороткой крупного рогатого скота (10%) или глюкозы (0,2%), или в питательный бульон для стрептококков и высевают на сектор кровяного агара, на который накладывают диск, содержащий 0,04 ЕД бацитрацина и диск с котримаксозолом, содержащий 23,75 мкг сульфаметоксазола и 1,25 мкг триметаприма. Инкубируют при 35-37°C, 5-10% CO₂. На жидких питательных средах рост различных видов стрептококков имеет свои особенности. Характер роста определяется длиной цепочек: придонно-пристеночный рост, с образованием мелкозернистого осадка, с сохранением полной прозрачности среды (*S. pyogenes*); придонный рост в

виде пушистого рыхлого осадка с сохранением прозрачности и равномерным более или менее интенсивным помутнением надосадочного слоя (*S. pneumoniae*); диффузный рост с интенсивным помутнением бульона и образованием небольшого гомогенного осадка (*E. faecalis*, *E. faecium*, некоторые штаммы *S. pyogenes* и *S. agalactiae*).

Результат бактериологического обследования, ограничивающийся только выделением β -гемолитических стрептококков недостаточен для постановки этиологического диагноза. Необходимо определение серогрупповой и видовой принадлежности.

104.6. Серогруппирование.

В соответствии с классификацией стрептококков, предложенной Лэнсфилд, выделяют 17 серогрупп (А-О). Антигены можно легко извлечь из клеточной стенки стрептококков и идентифицировать с помощью реакции преципитации, используя специфические антисыворотки. Реакция взаимодействия антигена с антителом учитывается по видимой агглютинации либо по другим изменениям в зависимости от конкретной тест-системы. Исследование и оценка результата проводится в соответствии с инструкцией на конкретную тест-систему. Большая часть стрептококков, выделенных от человека, относится к группам А, В, С, D и G.

105. Наибольшее значение в этиологии стрептококковых инфекций имеют стрептококки группы А (*S. pyogenes*), группы В (*S. agalactiae*) и пневмококки (*S. pneumoniae*).

105.1. Идентификация *S. pyogenes* (группа А).

Стрептококки группы А (пиогенный стрептококк), часто вызывают инфекционные заболевания у человека и обладают способностью вызывать специфическую интоксикацию – скарлатину, которая отличается высокой контагиозностью и отдаленными осложнениями – ревматизмом и гломерулонефритом.

Чувствительность к бацитрацину .

Постановка теста. Провести посев одной или нескольких морфологически сходных колоний β -гемолитического стрептококка, подозрительного на *S. pyogenes*, штрихом на сектор кровяного агара. Поместить диски с бацитрацином 0,04 МЕ на засеянную поверхность и инкубировать 18-24 часа при 35-37⁰С в атмосфере 5-10 % CO₂.

Оценка результата. Зона ингибиции роста стрептококков вокруг диска с бацитрацином или ее полное отсутствие позволяют отнести штамм: к β -гемолитическим стрептококкам, предположительно из серогруппы А по бацитрацину; к β -гемолитическим стрептококкам, предположительно не из серогруппы А по бацитрацину.

Стрептококки групп С и G так же чувствительны к бацитрацину.

Контроль качества дисков с бацитрацином. Контрольные штаммы: положительный контроль – *S. pyogenes* ATCC 19615 (зона задержки роста

≥ 12мм); отрицательный контроль – *S.aureus* ATCC 25923 (зона задержки роста 6 мм).

РҮR–тест.

Постановка теста. С помощью пинцета диск импрегнированный РҮR переносят на стерильную чашку Петри, диск увлажняют стерильной водой, избегая попадания избытка воды. С помощью стерильной палочки переносят несколько колоний с кровяного агара на поверхность диска и ждут 2 минуты, добавляют одну каплю реагента и наблюдают за изменением цвета.

Оценка результата. Положительная реакция – появление красного окрашивания в течение 1 минуты. Отрицательная реакция – изменение цвета не происходит. Слаборозовое окрашивание оценивается как отрицательный результат. Положительный результат дает только *S.pyogenes*. Фермент пирролидонилпептидаза имеется только у *S.pyogenes*.

Серологический метод идентификации *S.pyogenes*.

Основан на выявлении группового полисахарида клеточной стенки. Реакция взаимодействия антигена с антителом учитывается по видимой агглютинации либо по другим изменениям в зависимости от конкретной тест-системы. Исследование и оценка результата проводится в соответствии с инструкцией на конкретную тест-систему.

Точная идентификация *S.pyogenes* требует проведения как минимум двух подтверждающих тестов при выделении β-гемолитических, каталазоотрицательных, грамположительных кокков, располагающихся в мазке парами и цепочками: определение чувствительности к бацитрацину, выявление группового антигена А или РҮR–тест.

105.2. Идентификация *S. agalactiae* (группа В).

Представитель нормальной микрофлоры человека, обитающий в урогенитальном и желудочно-кишечном тракте. Обычно присутствует во влажной флоре 1/3 здоровых женщин. В большинстве случаев тяжелые формы инфекций, вызываемых стрептококками группы В, регистрируются в перинатальном периоде. Инфекция у рожениц может протекать в форме хориоамнионита, септического аборта, а также родового сепсиса. *S. agalactiae* является одной из причин сепсиса и менингита у новорожденных.

Фенотипические методы идентификации.

САМР – тест (Christiae, Atcins, Munch-Petersen, 1944 год, Австралия). Большая часть стрептококков группы В продуцирует экстрацеллюлярный протеин (САМР – фактор), который при взаимодействии с β-лизинном золотистого стафилококка вызывает синергическое усиление лизиса эритроцитов.

Постановка теста. Через центр чашки с кровяным агаром сплошной линией наносят суточную бульонную культуру β-гемолитического

S.aureus. Испытуемые штаммы суточной бульонной культуры стрептококка наносят отдельными штрихами параллельными друг другу и перпендикулярными по отношению к линии посева стафилококка не доходя до нее 2мм. На одну чашку высевает не более четырех штаммов стрептококка. Реакцию учитывают через 18-24 часа культивирования при 35-37⁰С. Положительный результат – образование «клина» гемолиза между посевами стрептококка и стафилококка. В качестве контрольных используют штаммы *S.agalactiae* (положительный контроль) и отрицательный контроль – *S.pyogenes*.

Гидролиз гиппурата натрия. Определение ферментативного гидролиза гиппурата натрия с образованием бензойной кислоты помогает дифференцировать β-гемолитические стрептококки группы В от β-гемолитических стрептококков группы А. Постановка теста. Петлю культуры суспендируют в 0,4 мл 1% водного раствора гиппурата натрия. Через 2 часа инкубации при 35-37⁰С вносят 0,2 мл раствора нингидрина (3,5 г нингидрина в 100 мл смеси ацетона и бутанола в равном соотношении и инкубируют 10 мин. Появление сине-пурпурного окрашивания свидетельствует о положительной реакции. Результаты гидролиза гиппурата натрия у референс-штаммов представлены в приложении 15 к настоящей Инструкции.

Серологический метод идентификации *S.agalactiae* основан на выявлении группового полисахарида клеточной стенки, аналогичен такому же методу идентификации *S.pyogenes*.

Точная идентификация *S.agalactiae* также требует проведения как минимум двух подтверждающих тестов. Основные биологические свойства стрептококков представлены в приложении 16 к настоящей Инструкции.

106. Идентификация *S. pneumoniae*.

Пневмококк – микроорганизм, колонизирующий верхние отделы дыхательных путей и являющийся одним из основных возбудителей менингита, среднего отита, синусита, внебольничной пневмонии у детей и взрослых.

Грамположительные, каталаза- и оксидазаотрицательные кокки, овальной или ланцетовидной формы, в мазках из клинического материала располагаются парами, каждая из которых окружена толстой капсулой. Факультативные анаэробы. Характерно наличие мощной полисахаридной капсулы. Существует около 90 различных капсульных типов *S.pneumoniae*, но большинство инвазивных заболеваний вызывается 23 серотипами входящими в полисахаридную пневмококковую вакцину.

S. pneumoniae – α-гемолитический стрептококк, который по морфологическим признакам трудно отличить от других α-гемолитических (зеленящих) стрептококков. Характерные морфологические особенности роста пневмококка – сероватый оттенок

колоний, выпуклая поверхность и влажная «метанообразная» консистенция, что существенно облегчает его идентификацию. При длительной инкубации (48 часов) центральная часть колоний может опускаться, что объясняется действием пневмококковых аутолизинов. Колонии некоторых штаммов могут полностью уплощаться, образуя поверхность «шляпки гвоздя». На жидких питательных средах *S. pneumoniae* растет в виде придонного пушистого, рыхлого осадка с сохранением прозрачности или незначительного помутнения надосадочного слоя.

Идентификация пневмококков.

106.1 Чувствительность к оптохину. Используют диски содержащие 5мкг оптохина. Метод основан на способности оптохина селективно подавлять рост пневмококка в отличие от остальных других зеленеющих стрептококков.

Постановка теста. Произвести посев одной колонии α -гемолитического стрептококка, подозрительного на пневмококк штрихом на сектор кровяного агара. Поместить диск с оптохином на засеянную поверхность и инкубировать в течение 18-24 часов при температуре 35-37⁰С в атмосфере 5-10% CO₂.

Оценка результата. Зона задержки роста >14мм (диск диаметром 6мм) или >16мм (диск диаметром 10мм) свидетельствует о наличие *S. pneumoniae*. Зона задержки роста <14мм (<16мм) требует подтверждения испытуемой культуры на принадлежность к *S. pneumoniae* в тесте с желчью. Крайне редко встречаются штаммы пневмококков, резистентные к оптохину, а рост других «зеленеющих» стрептококков подавляется оптохином (с образованием узкой зоны задержки роста).

Контроль качества дисков с оптохином. Контрольные штаммы: положительный контроль – *S. pneumoniae* ATCC 49619; отрицательный контроль – *S. salivarius* ATCC 13419 (или любой «зеленеющий» стрептококк).

106.2. Тест с желчью.

Основан на способности 10% желчи лизировать колонии *S. pneumoniae* на агаре или в бульоне. В две пробирки с 2-3 мл сывороточного бульона с 10% раствором желчи и без нее добавляют 0,5-1 мл испытуемой бульонной культуры и выдерживают 1 час при 35-37⁰С.

Оценка результата. Просветление жидкости в пробирке «тест» по сравнению с пробиркой «контроль» свидетельствует о принадлежности культуры к *S. pneumoniae*.

Можно использовать диски, пропитанные 20% раствором желчи. Диски накладывают на выросшую культуру и инкубируют в термостате 1-2 часа. По окружности диска на расстоянии 1-2 мм пневмококки лизируются, а *S. ruogenes* остаются без изменений.

106.3. Серологический метод.

Один из альтернативных и самых распространенных. Тест основан на выявлении пневмококковых полисахаридных антигенов с использованием поливалентной специфической пневмококковой сыворотки. Постановка теста проводится согласно инструкции прилагаемой к тест-системам.

Латекс–агглютинационный тест может использоваться для ускоренного выявления пневмококка непосредственно с чашки первичного посева.

106.4. Можно использовать реакцию Нейфельда (набухание капсулы) – увеличение капсулы пневмококков в присутствии иммунной сыворотки.

На двух предметных стеклах делают мазки из чистой культуры пневмококка. На один мазок наслаивают диагностическую поливалентную сыворотку, на другой физиологический раствор, добавляют по одной капле раствора метиленового синего. Выдерживают при 35-37⁰С от 10 минут до 1 часа. Микроскопируют и сравнивают опытный мазок с контрольным, где вместо сыворотки использован физиологический раствор. При отсутствии диагностических сывороток и оптохина пневмококки можно идентифицировать с помощью теста лизиса в присутствии солей желчных кислот в сочетании с культуральными и морфологическими свойствами.

107. Стрептококки групп С и G.

Вызывают те же инфекции, что и стрептококки группы А: фарингит, бактериемия, пневмония, целлюлит, инфекция мягких тканей, септический артрит и эндокардит. Бактериемия, вызванная данными возбудителями, отмечается у пожилых больных, неспособных ухаживать за собой, или у больных-хроников.

108. Стрептококки группы D.

S. bovis – главный возбудитель в данной группе. Эндокардит, вызванный *S. bovis*, связан с новообразованиями и другими поражениями пищеварительного тракта. В отличие от энтерококков *S. bovis* высокочувствителен к пенициллину, являющемуся в данном случае препаратом выбора.

109. Стрептококки группы viridans.

Группа включает множественные разновидности α -гемолитического стрептококка. Они представляют собой часть нормальной микрофлоры полости рта, но могут быть причиной гнойной инфекции (абсцессы в брюшной полости, ЦНС), бактериального эндокардита.

110. Идентификацию стрептококков возможно осуществлять на коммерческих тест-системах с визуальным учетом или с использованием автоматических и полуавтоматических микробиологических анализаторов.

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРОБОВ РОДА ENTEROCOCCUS

111. Общая характеристика бактерий рода *Enterococcus*. Энтерококки, ранее относимые к стрептококкам группы D — многочисленная группа бактерий рода *Enterococcus*, включающая виды *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. raffinosus* и другие. В клиническом материале от человека чаще встречаются *E. faecalis* и *E. faecium*. Энтерококки содержат групповой антиген, который реагирует с антисывороткой стрептококков серогруппы D по Лэнсфилд.

Энтерококки вызывают оппортунистические инфекции мочевыводящих путей, бактериемию, сепсис, подострый септический эндокардит, инфекции желчных путей, абсцессы в брюшной полости.

112. Ход исследования.

112.1. Просматривают первичные посевы на чашках с кровавым агаром. Выделенные штаммы дифференцируют с гемолитическими и зелеными стрептококками. Энтерококки образуют мелкие кремовые или белые, круглые, с ровными краями глянцевые колонии с α -, β -гемолизом или негемолитические. Из колоний с признаками, характерными для энтерококков, бактериологической петлей берут небольшое количество материала и готовят мазки для окраски по Граму. При микроскопическом исследовании энтерококки представляют собой грамположительные полиморфные кокки, располагающиеся короткими цепочками или небольшими скоплениями, что определяет необходимость дифференцировать их с гемолитическими и зелеными стрептококками. Колонии, характерные для энтерококков, высевают в сывороточный питательный бульон для получения чистой культуры, необходимой для дальнейшей идентификации.

Суточную бульонную культуру энтерококка пересевают на желчно-щелочной агар (далее – ЖЩА) и в молоко с 0,1% метиленового синего.

На ЖЩА растут только энтерококки, колонии их круглые, блестящие, синеватого цвета, слегка выпуклые, в ряде случаев появляются на третьи сутки инкубирования при 35-37⁰C. В пробирках с молоком энтерококки редуцируют метиленовый синий, вследствие чего уже через 16–20 часов после посева в термостате цвет среды изменяется с голубого на кремовый.

Способность микробных культур к росту на ЖЩА и редуцированию 0,1% метиленового синего в молоке указывает на принадлежность исследуемой культуры к энтерококкам.

112.2. Видовая дифференциация энтерококков.

Внутри рода энтерококки делятся по ферментативным, редуцирующим и гемолитическим свойствам на ряд видов и подвидов.

Бульонные культуры энтерококков для установления их видовой принадлежности высевают параллельно на 3 среды: на энтерококковую дифференциально-диагностическую среду (далее – ЭДДС) для определения гемолитической, протеолитической активности и способности редуцировать 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид (далее – ТТХ); на сахарно-дрожжевой агар для испытания резистентности исследуемой культуры к теллуриду калия; в столбик с 0,2% агаром для определения подвижности энтерококков.

Через 15-18 часов предварительно учитывают гемолитическую активность энтерококков, ввиду того, что при инкубации в термостате многие штаммы энтерококков вырабатывают кислые продукты метаболизма со снижением рН питательной среды до 3,8-4,2, разрушением гемоглобина и появлением вокруг колоний зон бурого цвета.

При учете ферментативной (гемолитической и протеолитической) активности определяется 4 возможных варианта изменения ЭДДС: гемолитически активные штаммы энтерококков образуют вокруг колоний белые зоны, соответствующие цвету молочного агара; у протеолитически активных штаммов появляются четко выраженные темно-красные или бурые зоны вокруг колоний; при наличии обоих (гемолитического и протеолитического) ферментов среда вокруг колоний просветляется, приобретая вид обычного питательного агара; штаммы энтерококков, не продуцирующие этих ферментов, сред не изменяют.

В конце первых суток инкубации учитывают на этой же среде способность исследуемых культур к редукции ТТХ. *E. faecalis*, восстанавливающие ТТХ, растут в виде вишнево-красных колоний с белыми ободками. *E. faecium* не восстанавливает ТТХ-колонии его бесцветны или окрашены в слабо-розовый цвет.

Подвижные формы энтерококков (*E.gallinarum*), обладая слабой редуцирующей активностью, образуют (особенно в первичном посеве материала) карликовые колонии розовых оттенков разной интенсивности.

На сахарно-дрожжевом агаре с теллуридом калия (0,07%) растут только штаммы вида *E. faecalis*, устойчивые к высоким концентрациям теллурида калия. В процессе роста они восстанавливают теллурид калия, образуя при этом черные колонии, окруженные узким бесцветным ободком.

В полужидком (0,2%) агаре, засеянном уколом, подвижные формы энтерококков вызывают диффузное помутнение всего столбика среды, тогда как неподвижные виды (*E. faecium*, *E. faecalis*) растут только по ходу прокола.

Таким образом, основными тестами дифференциации видов *E. faecalis*, *E. faecium* являются редукция ТТХ и устойчивость к теллуриду калия.

Основным диагностическим признаком подвижных энтерококков, позволяющим дифференцировать их от всех остальных видов этой группы, является подвижность.

113. Идентификацию энтерококков возможно осуществлять на коммерческих тест-системах с визуальным учетом или с использованием автоматических и полуавтоматических микробиологических анализаторов.

ГЛАВА 19

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА NEISSERIA И КОККОВЫХ ВИДОВ РОДА MORAXELLA

114. Род *Neisseria* объединяет группу грамотрицательных аэробных и факультативно-анаэробных кокков и коккобацилл, наиболее часто располагающихся парами и короткими цепочками, напоминающие «кофейные зерна». Это неподвижные, не образующих спор, оксидазапозитивные и каталазапозитивные микроорганизмы.

В род *Neisseria* включены следующие виды, которые выделяются от человека: патогенные виды – *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae* и непатогенные нейссерии – *N. mucosa*, *N. sicca*, *N. subflava*, *N. flavescens*, *N. lactamica*, *N. elongata* и другие.

115. *N. meningitidis* является возбудителем эпидемического цереброспинального менингита, менингококкцемии, менингоэнцефалита и назофарингита. Значительно реже менингококк является причиной пневмоний, эндокардитов, полиартрита и иридоциклитов. *N. gonorrhoeae* – возбудитель венерического заболевания гонореи. Гонококки могут быть причиной артритов, эндокардитов, конъюнктивитов, тонзиллитов.

Патогенные виды нейссерий мало жизнеспособны во внешней среде. Пересевы способствуют утрате специфических антигенов, что мешает правильной идентификации культур. Поэтому все дифференциально-диагностические признаки нейссерий желательно изучать одномоментно, у свежевыделенной или претерпевшей 1-2 пересева культуры. Менингококки требовательны к условиям культивирования. При росте требуют повышенной влажности и 5-10% содержания CO₂. Посев следует производить на свежеприготовленные среды, после предварительного подогрева их в термостате.

116. Инфекции респираторного тракта, вызванные *M. catarrhalis* включают средний отит, синусит, бронхит и пневмонию. Инфекции нижних дыхательных путей, вызванные *M. catarrhalis* преимущественно встречаются у пожилых и иммунокомпрометированных пациентов, особенно у лиц с хронической обструктивной легочной болезнью, бронхоэктазами, сердечной недостаточностью. *M. catarrhalis* также может быть изолирована от пациентов с первичной бактериемией, эндокардитами, менингитами, инфекциями глаз, урогенитальными инфекциями, раневыми

инфекциями, сепсисом, артритами, нозокомиальными инфекциями респираторного тракта, перитонитами.

117. Бактериоскопический метод.

Мазки из исследуемого клинического материала окрашивают по Граму. Отношение к окраске у нейссерий выражено недостаточно четко. Обнаружение в мазках грамотрицательных диплококков, расположенных внутри лейкоцитов, позволяет заподозрить патогенные виды нейссерий (менингококк или гонококк). Наличие в мазках из патологического материала грамотрицательных кокков или мелких овоидных палочек, расположенных парами или короткими цепочками, характерно для других представителей рода *Neisseria* и кокковых видов рода *Moraxella*.

118. Культуральный метод.

Патогенные нейссерии на кровяном и шоколадном агаре растут в виде непрозрачных, беловато-серых, крупных колоний, с блестящей поверхностью и ровными краями, маслянистой консистенции. Менингококки не лизируют эритроциты. Непатогенные нейссерии и моракселлы растут на поверхности кровяного и шоколадного агаров в виде круглых гладких серовато-белых колоний с ровными краями, блестящей поверхностью или шероховатых колоний неправильной формы с неровными краями с причудливо изрезанной поверхностью, некоторые имеют желтый пигмент.

На менингококкагаре и сывороточном агаре колонии менингококков бесцветные круглые с ровным краем, опалесцирующие, выпуклые имеют маслянистую консистенцию, легко снимаются петлей со среды.

В мазках при окраске по Граму из гладких колоний, подозрительных на представителей рода *Neisseria* и кокковые виды рода *Moraxella*, микробы имеют вид грамотрицательных бобовидных, округлых кокков, расположенных парами и довольно равномерно распределяющихся в поле зрения; в мазках из шероховатых колоний – грамотрицательные кокки располагаются в виде скоплений; клетки микробной популяции имеют однородное окрашивание у нейссерий, полиморфно окрашены у менингококков; у гонококков, вследствие лизиса части клеток, всегда имеются более светлоокрашенные особи.

Следующим этапом в изучении колоний является определение их каталазной и оксидазной активности. Микробы рода *Neisseria* и кокковых видов рода *Moraxella* обладают ферментом каталазой (за исключением *N. elongata subspecies elongate* и *nitroreducens*) и оксидазой.

Идентификация микроорганизмов рода *Neisseria* и кокковых видов рода *Moraxella*, основанная на комплексе морфологических, тинкториальных и биохимических признаков, проводится в соответствии с Инструкцией о методах микробиологической диагностики менингококковой инфекции и бактериальных менингитов, утвержденной Приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 13.02.2006 г., №81.

Исследования на гонорею необходимо проводить в соответствии с инструкцией по лабораторной диагностике этой нозологической формы.

119. Идентификацию возможно осуществлять на коммерческих тест-системах с визуальным учетом или с использованием автоматических и полуавтоматических микробиологических анализаторов.

ГЛАВА 20 МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА НАЕМОФИЛУС

120. Род *Haemophilus* относится к семейству Pasteurellaceae, которое также включает роды *Pasteurella* и *Actinobacillus*.

Наибольший удельный вес среди заболеваний человека, вызываемых гемофилами, принадлежит *H. influenzae*, выделяемой от больных при острых, реже хронических, заболеваниях верхних и нижних дыхательных путей (ринитах, синуситах, фарингитах, трахеитах, эпиглотитах, бронхитах, пневмониях, абсцессах, эмпиемах), гнойных менингитах, эндокардитах, сепсисе, воспалениях суставов. *H. aphrophilus* выделяется при подострых эндокардитах человека; *H. aegyptius* является причиной тяжелых остро протекающих конъюнктивитов; *H. parainfluenzae*, *H. haemolyticus*, *H. para-haemolyticus* - нормальные обитатели респираторного тракта человека, но при определенных условиях первые два вида могут вызывать эндокардиты, а после вирусных инфекций – вторичные острые заболевания ротовой полости, глотки, трахеи и бронхов. *H. ducreyi* вызывает мягкий шанкр – венерическое заболевание с четко выраженной клинической картиной. Микробы рода гемофилов, особенно *H. influenzae*, чаще являются причиной заболеваний детей раннего и лиц пожилого возраста, вторичных бактериальных инфекций у больных, ослабленных хроническими соматическими, онкологическими заболеваниями.

В целом все инфекции, обусловленные гемофильной палочкой, можно подразделить на два типа: инвазивные и неинвазивные. Инфекционные болезни, вызываемые *H. influenzae* представлены в приложении 17 к настоящей Инструкции.

Инвазивные инфекции, особенно менингит и эпиглотит имеют гематогенное происхождение. Неинвазивные инфекции возникают в процессе распространения микроорганизмов по слизистой оболочке дыхательных путей и, как правило, являются осложнениями вирусных инфекций, которые снижают местный иммунитет и нарушают мукоцилиарный клиренс.

Основным возбудителем заболеваний у человека является гемофильная палочка – *H. influenzae*. Штаммы *H. influenzae* могут быть капсульными или бескапсульными.

Капсульные штаммы (имеющие полисахаридную капсулу) подразделены на 6 серовариантов в зависимости от антигенных свойств капсулы: a, b, c, d, e, f. Наличие капсулы имеет большое клиническое значение, так как она является основным фактором вирулентности. Большинство инвазивных инфекций вызывается штаммами *H.influenzae* типа b (Hib), относящаяся к I биотипу.

Бескапсульные штаммы обозначаются как нетипируемые. Обычно эти штаммы *H.influenzae* принадлежат к биотипам II и III. Эти возбудители также могут быть причиной менингитов, бактериемий и других инвазивных инфекций взрослых и детей. Наиболее распространённые формы заболеваний, обусловленных бескапсульными штаммами *H.influenzae* – средний отит, в этиологии которого этот микроорганизм занимает второе место, уступая только пневмококкам. Некапсульные штаммы *H.influenzae* часто обнаруживаются при бронхитах, синуситах, пневмониях и т.д. Вторую группу составляют инфекции (обычно хронические), в этиологии которых *H.influenzae* играет вторичную роль, будучи в составе микробных ассоциаций. *H.influenzae* наряду с *S.pneumoniae* – наиболее частые агенты вторичных суперинфекций, осложняющих респираторную инфекцию или течение хронической бронхопатии.

121. Морфология. Клетки сферические, овальные или палочковидные, обычно менее 1 мкм в ширину и различные по длине, вплоть до нитевидных форм. Характеризуются заметным плеоморфизмом. Грамотрицательные, неподвижные. Морфология клеток в культуре зависит от возраста культуры и состава среды. На богатых средах через 8 часов культивирования преобладают палочки с типичной морфологией. Позже проявляется плеоморфизм: длинные палочки, нитевидные формы. В молодых культурах клетки сохраняют капсулу, в старых культурах капсулы выявляются плохо, так как быстро растворяются аутолитическими ферментами.

122. Культуральные свойства. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы. Обладают окислительным и бродильным типом метаболизма. Температурный оптимум 35-37°C, хотя возможен рост от 25-40°C.

При культивировании на искусственных питательных средах гемофилы нуждаются в факторах X и V, источником которых является свежая кровь человека и животных. По потребностям в указанных факторах при росте на искусственных питательных средах различные представители гемофилов дифференцируются внутри рода. Фактор крови X – гемин, активизирует пероксидазы, чем стимулирует рост гемофильных бактерий. Фактор крови V – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (NADH) содержится преимущественно в эритроцитах, являясь составной

частью витаминов группы В, принимает участие в окислительно-восстановительных процессах при росте клеток.

Наиболее физиологичными средами для гемофилов являются среды с горячей кровью (шоколадный агар). Более пышный рост гемофилов на средах с горячей кровью объясняется тем, что нагревание крови способствует освобождению из эритроцитов факторов роста и разрушению присутствующих в ней ингибиторов V фактора.

123. Ход исследования.

123.1. Микроскопия. Предварительный диагноз инфекции, вызванной бактериями рода *Haemophilus* может быть сделан на основании исследования мазка клинического материала, окрашенного по Граму и метиленовым синим. При окраске по Граму бактерии рода *Haemophilus* выглядят как мелкие, бледно окрашенные грамотрицательные палочки, иногда формирующие тонкие филаменты. Небольшие размеры, клеточный полиморфизм и недостаточное прокрашивание сафранином могут существенно затруднять обнаружение гемофильной палочки. Поэтому наряду с окраской по Граму следует проводить окраску метиленовым синим. В этом случае микроорганизмы имеют синий цвет на серо-голубом фоне.

123.2. Обнаружение капсульного антигена *Hib*. Для быстрой диагностики инфекций, вызванных *H.influenzae* типа b, разработаны иммунологические методики обнаружения капсульного антигена в СМЖ, крови, плевральной жидкости и моче: латекс-агглютинация (далее – ЛА), коагглютинация со стафилококковым протеином А (далее – КОА), встречный иммуноэлектрофорез (далее – ВИЭФ) и иммуноферментный анализ. Наибольшее распространение получили ЛА и КОА с образцами СМЖ. Антитела (IgG) против капсульного антигена *Hib* наносят на частицы латекса (ЛА) или на стафилококковые клетки (КОА) в качестве «носителя». При взаимодействии антигена, содержащегося в клиническом материале, со специфическими антителами менее чем через 10 мин образуются видимые хлопья. Исследование проводится в соответствии с инструкцией производителя прилагаемой к набору.

123.3. Культуральный метод.

Исследуемый материал засевают на чашку с кровавым и шоколадным агаром, инкубируют при 35-37⁰С, 5-10% СО₂.

На кровавом агаре гемофилы растут в виде чрезвычайно мелких полупрозрачных колоний (диаметр 0,5 мм и менее), не имеющих характерных особенностей, их трудно дифференцировать от колоний других видов бактерий.

На шоколадном агаре гемофилы растут в виде полупрозрачных, сероватых, нежных, сочных колоний диаметром от 1 до 2 мм; в зависимости от состояний популяции могут формировать три вида колоний: крупные,

круглые слизистые колонии (M-форма); круглые, полупрозрачные голубоватые колонии размером до 1 мм (S-формы); очень мелкие, менее 1 мм в диаметре, непрозрачные колонии (R-форма). В мазках из M- и S-колоний, окрашенных по Граму, видны мелкие грамотрицательные палочки; для R-форм характерен полиморфизм, встречаются и нитевидные формы. При окраске тушью по Гинсу у M- и S-форм вокруг клеток видна капсула, хорошо выраженная у M-форм и небольшая у S-форм. При росте на шоколадном агаре культура *H. influenzae* обладает «мышинным» запахом, что является одним из характерных признаков этой группы микробов.

Для накопления биомассы, необходимой при идентификации культур по биохимическим тестам, после микроскопирования подозрительные колонии отсеивают штрихом в пробирки на шоколадный агар.

Одновременно проводят повторный высеивание подозрительных колоний на питательный агар без крови и дрожжевых добавок. Посевы помещают в термостат при 35-37°C, 5-10% CO₂ на 18-24 часа.

Отсутствие роста культуры на питательном агаре без крови и обнаружение в мазках из колоний, выросших на шоколадном агаре, мелких грамотрицательных палочек с капсулой или без нее, является первым этапом подтверждения выделения одного из видов гемофилов.

При росте на шоколадном агаре большого числа однотипных колоний культуру изучают на потребность в X- и V-факторах, наличие ферментов каталазы, оксидазы, бета-галактозидазы, сахаролитическую активность, определяют чувствительность к антибиотикам. Дифференциально-диагностические свойства видов рода *Haemophilus* согласно приложению 18 к настоящей Инструкции.

123.4. Биотипирование *H. influenzae*. На основании тестов на продукцию индола, уреазную и орнитиндекарбоксилазную активность выделяют 8 биотипов *H. influenzae*. Биотипирование *H. influenzae* согласно приложению 19 к настоящей Инструкции.

Из культур, выросших на шоколадном агаре, готовят мазки и окрашивают по Граму и Гинсу. Культуру идентифицируют до вида.

В ряде случаев при исследовании СПЖ, крови, особенно при отсутствии четких результатов при бактериоскопии, культуру гемофилов необходимо отдифференцировать от менингококков, нейссерий, пневмококков и других микроорганизмов. Основные дифференцирующие признаки *H. influenzae* от некоторых других микробов, возбудителей бактериальных инфекций человека одной локализации представлены в приложении 20 к настоящей Инструкции.

Регистрируют результаты реакции на ферменты каталазу, оксидазу, бета-галактозидазу и уреазу. Это позволяет уже на третий день исследования, т.е. через 48 часов, определить вид микроба.

Регистрируют результаты по дополнительным биохимическим тестам. На основании комплекса изученных биологических свойств прово-

дят окончательную идентификацию выделенных культур. Выдают окончательный ответ о выделении того или иного вида из рода *Haemophilus*.

124. Биохимические методы.

124.1. Определение потребностей в X- и V-факторах.

H. influenzae нуждаются в X- и V-факторах, что является одним из основных качеств, отличающих их от других представителей рода *Haemophilus*. Потребность *H. influenzae* в X- и V-факторах определяется с помощью полосок или дисков с X- и V-факторами. Для этого необходимо приготовить суспензию чистой суточной культуры в питательной среде, при этом избегать переноса вместе с колониями гиминсодержащей среды, что может привести к ложным результатам. С помощью томпона инокулировать поверхность простого питательного агара в чашке Петри. Поместить на поверхность агара диски или полоски, содержащие X-, V- и XV-факторы, на расстоянии 2 см друг от друга. Инкубировать 18-24 часа при 35-37⁰C, 5-10% CO₂. *H. influenzae* вырастает только вокруг диска с XV-факторами. При их отсутствии можно воспользоваться тестом с сапонином или определением способности к сателлитному росту (метод «кормушек»).

124.2. Тест с сапонином основан на способности сапонины лизировать эритроциты. Сапонин приводит к высвобождению находящихся в эритроцитах X- и V-факторов, что обеспечивает рост гемофильной палочки. Диск с сапонином помещают на поверхность кровяного агара, инокулированного испытуемой культурой (суспензией в изотоническом растворе хлорида натрия). Результаты теста учитывают через 24-48 ч инкубации при 35-37⁰C, 5-10% CO₂. Рост колоний вокруг дисков с сапонином и его отсутствие вне зоны гемолиза служит дифференциальным признаком принадлежности исследуемого микроорганизма к роду *Haemophilus*.

124.3. Тест на способность к сателлитному росту (метод «кормушек»). Принцип метода «кормушек» аналогичен методу дисков с сапонином. Поверхность кровяного агара инокулируют суспензией тестируемой культуры в изотоническом растворе хлорида натрия, после чего наносят две параллельные линии гемолитического штамма *S. aureus* (расстояние между линиями – 5-6мм). После инкубации при 35-37⁰C, 5-10% CO₂ в течение 18-24 ч рост колоний (в виде валика) в зоне гемолиза, вызванного *S. aureus*, указывает на принадлежность исследуемого микроорганизма к *Haemophilus* spp.

124.4. Определение потребностей в X и V факторах крови также можно проводить с использованием *S. aureus* (в качестве дополнительного метода).

Чашки Петри с простым агаром и с кровяным агаром засевают: одну половину – исследуемой культурой, другую – исследуемой культурой в смеси с взвесью *S. aureus*. Если наблюдается рост на агаре с кровью, то

исследуемый микроб требует только X фактора. Если рост наблюдается на кровяном агаре совместно со стафилококком, то исследуемый микроб требует X и V факторов. Если наблюдается рост вместе со стафилококком на простом агаре, то микробы требуют V фактора. Если наблюдается рост на простом агаре на секторе без стафилококка, то исследуемая культура не относится к гемофилам.

124.5. Определение β -галактозидазы. Важным диагностическим тестом для идентификации *H. influenzae* является тест на наличие β -галактозидазной активности. Гемофильная палочка не обладает этим ферментом и на основании данного теста она может быть дифференцирована от других видов гемофилов, нуждающихся в X- и V-факторах. Для постановки теста необходимы готовые коммерческие диски, пропитанные ONPG. Приготовить густую суспензию исследуемого микроорганизма (эквивалентную стандарту мутности 2 по Мак Фарланду) в 0,5-1,0 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Внести в пробирку диск с ONPG, инкубировать при 35-37⁰С. Предварительный учет реакций возможен через 1 час. Положительная реакция – появление желтого окрашивания.

124.6. Определение индолообразования.

Принцип. Метод основан на способности микроорганизмов расщеплять аминокислоту триптофан с образованием индола.

Ход исследования. В пробирку с питательным бульоном засевают петлю культуры, добавляют 2-3 капли инактивированной лошадиной сыворотки. Пробкой прижимают тест-полоску на индол, пропитанную пара-(диметиламино)-бензальдегидом. Инкубируют при 35-37⁰С 18-24 часа. При наличии индола тест-полоска приобретает розово-малиновую окраску. Для определения индолообразования *Haemophilus influenzae* необходимо использовать «шоколадный» бульон.

124.7. Определение уреазы.

Принцип. Метод основан на способности микроорганизмов, обладающих ферментом уреазой, расщеплять мочевины до аммиака, за счет которого происходит изменение рН среды в щелочную сторону, что определяется по изменению цвета индикатора.

124.8. Определение орнитиндекарбоксилазы. При определении орнитиндекарбоксилазы используются коммерческие диски с орнитином. Диск помещают в пробирку с 0,3-0,5 мл физиологического раствора и добавляют несколько капель суточной бульонной культуры *H. influenzae*, после чего заливают стерильным вазелиновым маслом и инкубируют в течение 18-24 часов при 35-37⁰С. При положительной реакции появляются синее или интенсивное зеленое окрашивание. Для определения орнитиндекарбоксилазы у *H. influenzae* используют культуру, выращенную на «шоколадном» бульоне.

124.9. Для определения ферментов оксидазы, уреазы, бета-галактозидазы, образования индола, ферментации углеводов можно использовать систему индикаторных бумажек (далее – СИБ).

125. Идентификацию гемофилов возможно осуществлять на коммерческих тест-системах с визуальным учетом или с использованием автоматических и полуавтоматических микробиологических анализаторов.

ГЛАВА 21 МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *CORYNEBACTERIUM*

126. Род *Corynebacterium* объединяет большое число видов грамположительных неподвижных, не образующих спор палочек. *C. diphtheriae* – вид, патогенный для человека, вызывает системное бактериально-токсическое заболевание – дифтерию зева, носа, трахеи, реже – глаз, ушей, половых органов, кожи. Нетоксигенные *C. diphtheriae* могут вызывать эндокардиты, артриты и остеомиелиты. Таксономически близкими виду *C. diphtheriae* являются *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis* (*C. ovis*). Данные микроорганизмы – природные патогены крупного и мелкого рогатого скота, лошадей. Отмечена способность этих видов бактерий вырабатывать токсин, подобный дифтерийному. Известны случаи выделения токсигенных *C. ulcerans* при клинической картине заболевания, сходной с дифтерией. *C. pseudotuberculosis* могут вызывать абсцессы с язвенно-некротическими очагами, язвенные лимфадениты. *C. minutissimum* описана как возбудитель эритразмы, характерных кожных поражений человека, *C. jeikeium* – как возбудитель инфекции мочеполовых путей у женщин. Другие виды коринебактерий обычно выделяются со слизистых и кожи здорового человека, но иногда являются причиной инфекционно-воспалительных процессов. *C. enzymicum* – очень редко тяжелых абсцедирующих бронхопневмоний, *C. pyogenes*, *Arcanobacterium haemolyticum* – язвенно-некротических поражений в виде фарингитов, тонзиллитов, гингивитов, стоматитов, уретритов. *C. xerosis* – обитатель слизистой слезного канала, может быть причиной длительно и вяло протекающих конъюнктивитов.

Для подтверждения этиологической значимости в патологическом процессе *C. xerosis* необходимо провести повторное исследование материала с количественным учетом числа выросших колоний. Для *C. pseudodiphtheriticum*, которая обычно обитает на слизистых носа, глотки, слухового канала и поверхности кожи, возможность вызывать воспалительные процессы в местах обычного обитания не доказана. Этот вид рассматривается как представитель нормальной микрофлоры слизистых и кожи человека. При повторном выделении из крови, спинномозговой жидкости и

других, обычно стерильных субстратов, все перечисленные виды коринебактерий следует оценивать как потенциальных возбудителей.

127. Ход исследования.

127.1. Первый день. Все поступившие материалы засевают на поверхность кровяного агара и одной из плотных питательных сред, в соответствии с Инструкцией «Лабораторная диагностика дифтерии», Приложение 2 к Приказу Министерства Здравоохранения Республики Беларусь от 09 февраля 2002 г. № 42.

Посев от одного лица производят на одну чашку, используя при этом половину поверхности среды для посева материала из ротоглотки, а вторую – для посева материала из носа. При посеве материала из других мест добавляют еще одну чашку. Не допускается посев материала от нескольких лиц на одну чашку. При посеве материал втирают в среду со всех сторон тампона на участке площадью $2 \times 1 \text{ см}^2$, затем этим же тампоном или стеклянной стерильной палочкой засевают остальную поверхность. Посев производят частыми перекрывающимися штрихами, не отрывая тампон от поверхности питательной среды и не изменяя положения тампона.

Одновременно с посевами из поступившего материала готовят 2-3 мазка, один из которых окрашивают по Граму. Мазки просматривают под микроскопом с иммерсией. Обнаружение грамположительных палочек с характерной морфологией и расположением позволяет заподозрить наличие коринебактерий. Для уточнения проводят микроскопию мазков, окрашенных щелочным раствором метиленового синего. Если в мазках видны слегка изогнутые изящные палочки с булавовидными утолщениями на концах, располагающиеся в виде войлока, пакета булавок, цифры V, содержащие темно-окрашенные зерна на концах, то следует заподозрить наличие *C. diphtheriae*, о чем срочно сообщить лечащему врачу и далее вести исследование в соответствии с Инструкцией «Лабораторная диагностика дифтерии», Приложение 2 к Приказу Министерства Здравоохранения Республики Беларусь от 09 февраля 2002г., № 42.

У других видов коринебактерий палочки более толстые, короткие, обычно располагаются в виде частокола, реже встречаются булавовидные утолщения и темно-окрашенные зерна, расположенные на одном конце.

При микроскопии первичных мазков, особенно приготовленных из гнойного отделяемого, можно наблюдать своеобразную морфологию клеток, напоминающую по расположению коринеформные бактерии: грамположительные длинные тонкие или короткие толстые палочки с утолщениями на одном конце. В отличие от коринебактерий четко видны или ветвящиеся формы, или раздвоение на концах палочек, коккобациллярные клетки, располагающиеся парами или цепочками. Такая морфология микробов характерна для микробов родов *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*. Эта группа грамположительных, не образу-

ющих спор палочек, включает микроаэрофильные и облигатноанаэробные формы. Поэтому при посеве материала на кровяной агар, рост культур этих микроорганизмов или отсутствует, или может появиться на 3-5 сутки инкубации в виде очень мелких сероватых крошковидных колоний (*Actinomyces israelii*, *Propionibacterium acne*).

127. 2. Второй день. Через 20-24 часа все посеы просматривают на наличие роста культуры. На кровяном агаре можно наблюдать рост колоний, которые, в зависимости от вида коринебактерий, имеют некоторые особенности строения и своеобразную морфологию клеток.

Колонии, размером от 1 до 2-3 мм, чаще круглые, непрозрачные, сероватые (S-форма) или шероховатые, крошковидные, исчерченные, с неровным краем (R-форма), и под ними зона полного гемолиза эритроцитов.

В мазках из выросших колоний, окрашенных по Граму, видны грамположительные прямые или слегка изогнутые полиморфные палочки, располагающиеся кучками в виде рассыпанных булавок или римской цифры V или буквы L. Палочки не ветвятся, клетки содержат метахроматические зерна (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*).

Колонии круглые, непрозрачные, маслянистые мелкие или крупные, кремовые, бледно-желтые, оранжево-коричневые, гладкие без зон гемолиза.

В мазках из крупных колоний равномерно окрашенные грамположительные палочки расположены частоколом. Встречаются редкие булаво-видные и зернистые с одного конца формы (*C. xerosis*, *C. pseudodiphthericum*). В мазках из мелких колоний видны полиморфные грамположительные булаво-видные, четкообразные палочки, иногда кокковидные формы с маленькой краевой капсулой (*C. enzymicum*).

Очень мелкие до 1мм или крупные 1-2 мм колонии, гладкие, круглые, непрозрачные, окруженные большой прозрачной зоной полного гемолиза эритроцитов. В мазках из описанных колоний видны мелкие грамположительные коккобациллы, которые расположены в виде разреженных цепочек или пунктира, они напоминают стрептококки, но это – дифтерийные формы коринебактерий (*C. pyogenes*, *C. haemolyticus*).

На кровяных теллуритовых средах через 48 часов роста колонии *C. diphtheriae* варианта *gravis*, как и колонии *C. ulcerans*, черные, матовые имеют радиальную исчерченность. Колонии *C. pseudodiphtheriticum* имеют характерный светлый ободок. Однако, встречаются штаммы *C. diphtheriae*, чувствительные к теллуриду калия, поэтому важным является проведение первичного посева и на кровяной, и на кровяно-теллуритовый агары.

Для выделения чистых культур и накопления биомассы колонии отсевают на 10% сывороточный агар.

Чашки с колониями, похожими на дифтерийные, отбирают для дальнейшей идентификации культуры по всем тестам. В случае роста

подозрительных однотипных колоний сразу же приступают к изучению их токсигенных свойств. Токсигенные свойства изучают не менее чем у 2 изолированных колоний путем посева одной половины каждой колонии на среду для определения токсигенности и, необожженной петлей, – на среду Пизу, а другой половины колонии – в пробирку со скошенным сывороточным агаром для сохранения и накопления культуры. При невозможности снять 1/2 колонии для посева на токсигенность и на среду Пизу используется материал целой колонии; посев на скошенный агар исключается и, в дальнейшем, используется культура из пробирки с пробой Пизу. Учитывая, что через 24 часа роста колонии имеют небольшие размеры и материала 1/2 или 1 колонии может быть недостаточно для накопления дифтерийного токсина в пробе на токсигенность, а также то, что в исследуемом материале могут находиться одновременно токсигенные и нетоксигенные разновидности коринебактерий дифтерии, необходимо изучить токсигенные свойства, по возможности, у максимального числа выросших колоний (20 и более), смешивая по 5-7 однотипных колоний в одну бляшку.

При невозможности постановки пробы на токсигенность классическим способом из-за недостаточной величины колоний, их изучают, смешивая однотипные колонии в нескольких бляшках. Не прожигая петли, производят посев в среду Пизу. Чашки с первичным посевом исследуемого материала вновь помещают в термостат на 24 часа и просматривают их повторно, на третьи сутки.

Если вырастает только одна колония, ее засевают на среду для определения токсигенности и, не обжигая петли, в столбик среды Пизу для определения цистиназы. Для дальнейшей идентификации используют культуру из пробирки с пробой Пизу или с бляшки через 48 часов роста, или через 24 часа роста при выявленных токсигенных свойствах культуры.

С целью выдачи предварительного ответа, в случае множественного роста подозрительных колоний, выполняют дополнительную пробу Заксе (3-5 однотипных колоний, учет через 30 минут инкубации) и пробу Пизу (5-6 однотипных колоний, учет через 3 часа инкубации). При характерной для коринебактерий дифтерии морфологии колоний, просмотренных с помощью бинокулярного стереоскопического микроскопа, морфологии клеток при микроскопии, отрицательной пробе Заксе, положительных результатах пробы Пизу, выдают предварительный ответ об обнаружении культуры, подозрительной на коринебактерии дифтерии.

127.3. Третий день.

Через 24 часа при появлении специфических линий преципитации на среде для определения токсигенности, положительной пробе на цистиназу, изучаемую культуру идентифицируют как токсигенные *S. diphtheriae* и выдают документированный предварительный ответ.

При отсутствии специфических линий преципитации на среде для определения токсигенности, чашки инкубируют еще 24 ч.

Из культур, выросших на сывороточном агаре, делают мазки, окрашивают по Граму для подтверждения наличия грамположительных палочек, характерных по морфологии и расположению для коринебактерий. Культуру используют для идентификации по тестам. Биохимические свойства микробов рода *Corynebacterium* согласно приложению 21 к настоящей Инструкции. При необходимости культуру используют для оценки чувствительности к антибиотикам.

Наблюдение за посевами крови, которые выдерживают в термостате, ведут ежедневно. При выявлении роста и обнаружении в мазках, окрашенных по Граму, клеток, характерных для коринебактерий, делают высев на 10% сывороточный агар. Идентификацию выделенных культур проводят по этапам, описанным выше.

127.4. Четвертый день. Повторно, через 48 часов, учитывают результаты теста Элека, поставленного на 2-й день исследования. Одновременно проводят учет биохимической активности в пробах, поставленных в 3-й день исследования В соответствии с данными приложения 18 к настоящей инструкции дают ответ о выделенном из исследуемого материала виде коринебактерий. Для потенциальных возбудителей заболевания указывают чувствительность культур к антибиотикам.

128. Приготовление питательных сред, окрашивание мазков, определение токсигенности и биохимическую идентификацию коринебактерий проводят в соответствии с Инструкцией «Лабораторная диагностика дифтерии», Приложение 2 к Приказу Министерства Здравоохранения Республики Беларусь от 09 февраля 2002 г., №42.

129. Идентификацию коринебактерий возможно осуществлять на коммерческих тест-системах с визуальным учетом или с использованием автоматических и полуавтоматических микробиологических анализаторов.

ГЛАВА 22

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ СЕМЕЙСТВА ENTEROBACTERIACEAE

130. Семейство *Enterobacteriaceae* объединяет грамотрицательные анаэробные и факультативно анаэробные бактерии, не образующие спор, капсульные и бескапсульные, подвижные или неподвижные, хорошо растущие на обычных питательных средах. Обязательным признаком является ферментация глюкозы с образованием кислых или кислых и газообразных продуктов. Отношение к другим углеводам может варьировать. Для энтеробактерий характерна способность восстанавливать нитраты, проявлять каталазную активность, отсутствие фермента цитохромоксидазы.

Роды семейства Enterobacteriaceae, имеющие медицинское значение: *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Morganella*, *Yersinia*, *Hafnia*, *Serratia*, *Erwinia*, *Kluyvera*. Клиническая значимость других родов и видов семейства Enterobacteriaceae мало изучена.

131. Ход исследования.

131.1. Идентификация энтеробактерий начинается с изучения колоний на пластинчатых средах (среда Эндо, агар с эозин – метиленовым синим (далее – ЭМС-агар), среда Мак-Конки и других). При исследовании кишечного содержимого могут быть использованы дополнительно среды Плоскирева, висмут-сульфит агар, слабощелочной агар и кровяной агар.

На среде Эндо колонии представителей семейства Enterobacteriaceae обычно выпуклые с правильными очертаниями, более или менее опалесцирующие, иногда слизистые, могут быть окрашены в красный цвет с наличием металлического блеска или без него (лактозоположительные энтеробактерии), бесцветными (лактозоотрицательные), могут приобретать розоватый или сероватый оттенок с более или менее выраженным темным центром, особенно у более крупных колоний. Диаметр и окраска колоний могут варьировать не только в зависимости от родовой принадлежности, но и от массивности роста. В среднем диаметр колоний составляет 1-2 мм, мелкие бесцветные колонии – росинки – характерны в 1 сутки роста для иерсиний (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*), такие чашки необходимо дополнительно инкубировать при комнатной температуре еще 18-20 часов.

P. vulgaris и *P. mirabilis* обычно дают вуалеобразный рост («роение»), а представители родов *Klebsiella* и *Enterobacter* чаще образуют сочные слизистые розовые колонии диаметром 2-3 мм. Шигеллы, сальмонеллы, гафнии, нероящиеся представители рода протеев обычно образуют более «нежные» колонии небольших размеров. Часть штаммов серраций дает розово-красные, с фиолетовым оттенком пигментированные колонии.

Намеченные для дальнейшего изучения колонии засевают на одну из комбинированных сред для первичной идентификации (Клиглера, Олькеницкого, трехсахарный агар с солями железа (далее – TSI) и другие). Эти среды позволяют после 18-20-часовой инкубации их при 35-37⁰С составить предварительное заключение о возможной родовой принадлежности выделенных культур и определить набор необходимых тестов для идентификации рода и вида. Для иерсиний дополнительная и параллельная инкубация посевов при комнатной температуре обеспечивает более четкое проявление биохимических реакций.

131.2. Ферментация глюкозы проявляется в изменении окраски столбика среды (цвет зависит от используемого в среде индикатора, а также интенсивности кислотообразования).

131.3. Газообразование устанавливают по появлению пузырьков, разрывам агара или его отслоению от стенок пробирки. Образование сероводорода устанавливают по почернению среды, обычно в средней части столбика, при значительной продукции H_2S можно наблюдать почернение всей среды. В среде Олькеницкого при росте культуры, гидролизующей мочевины, происходит подщелачивание, вследствие чего среда приобретает диффузный, яркий красно-малиновый цвет. В этом случае учёт ферментации углеводов невозможен. При интенсивном образовании сероводорода, когда чернеет целиком вся среда, учёт ферментации углеводов в средах Клиглера и Олькеницкого затруднён. Следует помнить, что образование сероводорода может происходить лишь в кислой среде, которая создаётся за счёт ферментации глюкозы, присущей всем энтеробактериям. Кроме того, при просмотре среды в проходящем свете видны на общем чёрном фоне участки пожелтевшего агара, что свидетельствует о ферментации углеводов.

131.4. Образование сероводорода, свойственно представителям рода *Salmonella*, видов *S. freundii*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *Edwardsiella* и некоторым представителям рода *Erwinia*.

131.5. Способность ферментировать лактозу (а в трех – сахарной среде и сахарозу) оценивают по изменению окраски скошенной части комбинированной среды. Обычно лактозоположительными бывают представители родов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*. Ферментация лактозы нередко коррелирует с ферментацией сахарозы. В неясных случаях следует проверить эти свойства путем посева культур в среды Гисса с соответствующими углеводами.

Сходное сочетание биохимических реакций (отношение к лактозе, глюкозе, мочеvine, образование сероводорода) может наблюдаться одновременно у нескольких родовых групп семейства *Enterobacteriaceae*, и для их дифференциации необходимо использовать дополнительные тесты, минимально необходимые для установления родовой, а, в ряде случаев, и видовой принадлежности. Известно немало рекомендаций по составу таких минимальных наборов дифференциальных тестов для определения рода в семействе *Enterobacteriaceae*. Тесты необходимые для дифференциации родов семейства *Enterobacteriaceae* по биохимическим свойствам представлены в приложении 22 к настоящей Инструкции.

131.6. OF-тест.

При возникновении сомнений в принадлежности изучаемой культуры к семейству *Enterobacteriaceae* следует использовать тесты, позволяющие дифференцировать энтеробактерии от других грамотрицательных микроорганизмов. Тип утилизации глюкозы: окисление (O), ферментация (F) или отсутствие активности (-); определение ферментов цитохромоксидазы; нитратредуктазы (редукция нитратов в нитраты). Для постановки OF-теста изучаемую культуру высевают уколом в столбик среды Хью-

Лейфсона (одновременно в две пробирки), в одну из пробирок затем вносят 0,5-1 мл стерильного вазелинового масла. Посевы делают небольшой петлей, не доводя ее до дна пробирки на 5-6 мм, инкубируют при 35-37⁰С в течение 1-4 суток. Изменение цвета среды на желтый в обеих пробирках указывает на расщепление глюкозы путем ферментации (F), появление желтой окраски среды только в одной пробирке, не залитой вазелиновым маслом – об окислительном процессе (O), а сохранение исходного неизменного цвета в обеих пробирках – об отсутствии активности в отношении глюкозы (-).

131.7. Микроскопия (окраска по Граму).

В сомнительных случаях является первоочередной, так как при этом могут быть выявлены морфологические особенности (например, кокковая форма), исключающие необходимость использования других тестов.

131.8. Тест с КОН.

Нечёткие результаты окраски по Граму у некоторых штаммов микроорганизмов родов (*Acinetobacter*, *Moraxella*, *Bacillus*) могут быть уточнены при использовании пробы с гидроксидом калия (далее – КОН). Для этого культуру суспензируют в капле 3% раствора КОН на предметном стекле. При положительной реакции, свойственной грамотрицательным микроорганизмам, жидкость в капле становится вязкой, нити тянутся за петлёй на 0,5–2 см. Учёт этой пробы более удобен на чёрном фоне.

131.9. Тест на цитохромоксидазу.

Можно проводить по методу Эрлиха, для чего на поверхность роста 18-20 часовой агаровой культуры наносят каплю 1% водного раствора диметил-пара-фенилендиамина и добавляют каплю 1% спиртового раствора альфа-нафтола. При положительной реакции через 1-3 минуты появляется ярко-синее окрашивание. Тест можно воспроизвести также с помощью диска на цитохромоксидазу из бумажной индикаторной системы (далее – СИБ). Наличие цитохромоксидазы можно выявить по методу Ковача (известен как тест на оксидазу), являющемуся модификацией метода Эрлиха. По методу Ковача на культуру наносят несколько капель 1% водного раствора тетра-пара-фенилендиамина. При положительной реакции через 20-30 секунд появляется стойкое темно-красное окрашивание.

131.10. Тест на редукцию нитратов.

Проводят путем посева одной петли суточной агаровой культуры в питательную среду, содержащую нитрат калия и инкубируют при 35-37⁰С до 4 суток с ежедневным учетом реакции. Для выявления восстановленных нитритов в пробирку с культуральной жидкостью вносят по 1 мл реактивов для определения редукции нитратов. При положительной реакции на нитраты появляется красное окрашивание, при отрицательной реакции на нитраты – цвет среды.

В клинической микробиологии идентификация энтеробактерий обычно завершается определением рода и вида выделенной культуры и, лишь при наличии эпидемиологических показаний, и иногда для утверждения этиологической значимости, она дополняется определением биоваров, а в некоторых родовых группах условно патогенных энтеробактерий – определением сероваров (*Escherichia*, *Citrobacter*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*). Определение рода и вида энтеробактерий основывается на изучении совокупности биохимических тестов.

Если по предварительным данным не исключена принадлежность культуры к родам *Hafnia* или *Yersinia*, целесообразно сделать посев в 2 пробирки со средой Кларка, одну из которых оставить до следующего дня при комнатной температуре, а другую – при 35-37⁰С, с последующим воспроизведением тестов с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра. Дополнительным признаком в пользу выделения *Hafnia* может быть особенно бурное (в сравнении с другими энтеробактериями) выделение кислорода в пробе на каталазу.

Культуры, отнесённые по данным учёта минимального ряда к родам *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella* и *Enterobacter*, *Proteus*, *Yersinia* и другим подвергают дальнейшему изучению с целью определения вида. При внутривидовой дифференциации требуются различные наборы биохимических тестов для разных родов. Расширенная характеристика биохимических свойств родовых групп *Enterobacteriaceae* приведена в приложении 23 к настоящей Инструкции.

При наличии показаний и возможностей в этот же день культуры, отнесенные к родам *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*, испытывают в реакциях агглютинации с родовыми и групповыми агглютинирующими сыворотками. Для серологического изучения используют суточные культуры на скошенном питательном агаре, засеваемом одновременно с посевами на минимальный ряд родовых тестов.

132. Идентификацию энтеробактерий возможно осуществлять на коммерческих тест-системах с визуальным учетом или с использованием автоматических и полуавтоматических микробиологических анализаторов.

ГЛАВА 23 МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕФЕРМЕНТИРУЮЩИХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ (НГ ОБ)

133. НГ ОБ – группа условно-патогенных бактерий, неспособных ферментировать глюкозу. Широко распространены в природе, основные места их обитания – вода, почва; многие виды паразитируют в организме здоровых людей и животных: на коже, слизистых оболочках верхних дыхательных путей, нижних отделов мочевыводящего тракта, некоторые

представители входят в состав нормальной микрофлоры толстой кишки. НГОб способны вызывать вспышки госпитальных инфекций. Экзогенным источником инфекции часто служит ингаляционное оборудование, хирургический инструментарий, растворы для ингаляционного введения, катетеры, пищевые трубки. Инфекция чаще возникает у лиц с предрасполагающими факторами (иммунодефициты, предшествующая антибиотикотерапия, искусственная вентиляция легких, злокачественные новообразования и др.). Основная роль в патологии принадлежит *P.aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *S. maltophilia*, *B. cereacia*. Типичные заболевания, при которых выделяют НГОб: инфицирование цистостом, трахеостом, нагноение ран, пиелонефрит, госпитальная пневмония, сепсис, септикопиемия при ожогах, менингит, поражение глаз.

Наибольшее клиническое значение имеют бактерии рода *Pseudomonas*. Род состоит из большого числа видов, многие из которых являются свободноживущими бактериями и распространены повсеместно. Типовой вид - *P. aeruginosa*. Кроме того, можно выделить из различного патологического материала и другие псевдомонады, такие как *P. fluorescens*, *P. putida* и другие, которые являются возбудителями различных гнойных поражений.

134. Ход исследования.

134.1. Тест на цитохромоксидазу (метод Эрлиха или Ковача). Большинство видов, входящих в род *Pseudomonas* оксидазоположительны.

134.2. Тест на каталазу. Микроорганизмы рода *Pseudomonas* каталазоположительны.

134.3. Определение индолообразования. Псевдомонады дают отрицательную реакцию на индол.

134.4. Морфология (окраска по Граму).

При просмотре мазков выявляются грамотрицательные палочки размером 1,5-3,0 x 0,4-0,6 мкм, располагающиеся одиночно, парами или короткими цепочками, не образующими спор, но продуцирующие слизь, окружающую микробную клетку тонким слоем.

Различают пять морфологических типов колоний: плоские колонии неправильной формы; колонии, напоминающие кишечную палочку; складчатые («цветок маргаритки»); слизистые, редко дающие пигментацию при первичном выделении, образующие слизистый налет, со временем приобретающий зеленую окраску; карликовые, которые появляются только через 18 часов. На кровяном агаре вокруг колоний видны зоны гемолиза. Очень часто можно наблюдать феномен «радужного лизиса» культур, который характеризуется наличием нежного блестящего металлического налета и зон лизиса. На среде Эндо культуры синегнойной палочки образуют бледно-розовые колонии небольших размеров. Культуры синегнойной палочки образуют синий или зеленовато-синий или фиолетовый пигменты, проникающие в субстраты. Один из них – пиоцианин,

дающий синюю или сине-зеленую окраску. Другой – флюоресцеин – дает зеленовато-желтое окрашивание, флюоресцирующее в проходящем свете. Иногда, какой-либо из пигментов может утрачиваться совсем.

Пиоцианин образуют только штаммы синегнойной палочки, другие представители рода *Pseudomonas* могут образовывать флюоресцеин.

Можно идентифицировать примерно 75% выделенных культур синегнойной палочки по морфологии колоний, образованию сине-зеленого пигмента (пиоцианина) и специфическому запаху жасмина или земляничного мыла.

134.5. Среда Кинг А.

Используется для усиления способности синегнойной палочки продуцировать сине-зеленый пигмент пиоцианин, однако, он может и отсутствовать (беспигментные культуры). Некоторые штаммы синегнойной палочки образуют на этой среде другой пигмент – пиорубин, дающий красное окрашивание.

134.6. Среда Хью-Лейфсона (с глюкозой или другими углеводами). Применяют для определения способности псевдомонад окислять глюкозу до глюконовой кислоты только в аэробных условиях. Посев производят уколом в 2 столбика агара, один из которых заливают 1 мл стерильного вазелинового масла. Посевы инкубируют в термостате в течение 18-24 часов при 35-37⁰С. Если микроорганизм принадлежит к роду *Pseudomonas*, то окисление глюкозы происходит только в аэробных условиях, а в анаэробных условиях цвет среды не меняется.

134.7. Ацетамидный агар является дифференциальной средой для синегнойной палочки, поскольку она обладает способностью использовать ацетамид в качестве единственного источника азота и углерода.

134.8. Рост при 42⁰С и 5⁰С на питательном агаре

Рост культур на ацетамидном агаре, способность культур расти при температуре 42⁰С и отсутствие роста при 5⁰С позволяет отнести выделенную культуру к виду *P. aeruginosa*. Если культура выросла на ацетамидном агаре, но не выросла при 42⁰С, то она принадлежит к виду *P. putida*. *P. fluorescens* характеризуется неспособностью утилизировать ацетамид и расти при 42⁰С, но хорошо растет при 5⁰С. Основные дифференциальные признаки флюоресцирующих псевдомонад приведены в приложении 24 к настоящей Инструкции.

135. Ввиду биохимической инертности грамотрицательных неферментирующих бактерий, их идентификация с использованием традиционных (ручных) лабораторных тестов затруднена. Для диагностических целей видовая идентификация редко встречающихся неферментирующих бактерий с недоказанным клиническим значением не всегда является необходимой. В данном случае ответ должен содержать информацию: «Обнаружен рост неферментирующих грамотрицательных бактерий, не *Pseudomonas aeruginosa*».

136. При необходимости определить видовую принадлежность выделенных грамотрицательных неферментирующих бактерий следует использовать коммерческие тест-системы, предназначенных для этих целей.

ГЛАВА 24

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *LISTERIA*

137. Род *Listeria* объединяет короткие палочки, морфологию и размеры которых определяют условия культивирования. В молодых культурах листерии представлены палочками или коккобациллами 1-2 x 0,5 мкм, в старых достигают в длину 5 мкм или принимают нитчатую форму. Спор и капсул не образуют, кислотоустойчивы, перитрихи. Молодые культуры, выращенные при 20-25⁰С, подвижны. В старых культурах листерии теряют жгутики. Культивирование при 37⁰С приводит к резкому снижению подвижности, вплоть до ее полной потери. Грамположительны, но через 2-5 суток начинают терять устойчивость к окрашиванию и в старых культурах грамотрицательны. Из шести известных видов листерий (*L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L.welshimeri*, *L.grayi*, *L.ivanovii* и *L.seeligeri*), только *L.monocytogenes* патогенен для человека и животных, а *L.ivanovii* – для животных.

Листерииоз – природно-очаговое заболевание с множественными источниками инфекции, протекающее в большинстве случаев с поражением нервной системы или в виде ангинозно-септической формы.

138. Ход исследования.

138.1. Материалом для исследования являются: кровь, СМЖ, слизь из зева, пунктаты лимфатических узлов, секционный материал, у новорожденных меконий, пупочная кровь. При подозрении на листериозный сепсис производят посев крови, при менингите и менингоэнцефалите – СМЖ, при заболевании новорожденных – меконий. От женщины, родившей мертвого или с признаками листериоза ребенка, исследуют околоплодную жидкость, плаценту, отделяемое родовых путей.

138.2. Микроскопия исследуемого материала. Предварительный лабораторный диагноз некоторых клинических форм листериоза может быть поставлен на основании результатов бактериоскопического исследования окрашенных по Граму мазков осадка СМЖ и амниотической жидкости. Клетки *Listeria* spp. в окрашенных по Граму мазках СМЖ следует дифференцировать с клетками стрептококков, коринебактерий и *Haemophilus influenzae*. В мазках культур, выращенных на плотных питательных средах, клетки *Listeria* spp. выглядят как грамположительные кокки и коккобациллы. В мазках бульонных культур – как короткие палочковидные бактерии, иногда похожие на клетки коринебактерий.

138.3. Культуральный метод. Для выделения клинически значимых видов *Listeria spp.* из стерильных биологических жидкостей (СМЖ, кровь, амниотическая жидкость) и биоптатов тканей не требуется специальных сред и условий культивирования. При первичном посеве *Listeria spp.* хорошо растут на кровяном агаре, шоколадном агаре (применяется для бактериологического анализа СМЖ), МПБ с 1% глюкозы, МПА с 1% глюкозы, ТСБ с дрожжевым экстрактом, триптон-соевом агаре с дрожжевым экстрактом, триптиказо-соевом бульоне, триптиказо-соевом агаре, тиогликолевой среде. Частота выделения клинически значимых видов *Listeria spp.* увеличивается при проведении бактериологического анализа клинического материала, забранного из нестерильных полостей, участков тела человека, с использованием селективного обогащения и селективных питательных сред для выделения культур (Палкам агар с селективными добавками, Оксфорд агар с селективными добавками).

Посевы инкубируют при 35-37⁰С, с ежедневным просмотром, в течение 5-7 дней, при отсутствии роста наблюдение за посевами проводят в течение двух недель. При бактериологическом анализе крови проводят высевы на кровяной агар. Посев на селективные среды делают как непосредственно из клинического материала, так и из накопительной культуры бульона обогащения. Посевы инкубируют в течение 24-48 часов при 35-37⁰С. Может быть проведено холодное обогащение при 4⁰С в триптонном бульоне с глюкозой или том же бульоне с тиоцианатом калия (конечная концентрация 3,75%). Но так как холодное обогащение продолжается от 2 до 6 месяцев, то не всегда результаты такого исследования могут иметь клиническое значение.

На кровяном агаре колонии клинически значимых видов *Listeria spp.* вырастают в течение 1-2 дней инкубации при 35-37⁰С. Колонии маленькие, менее 1 мм в диаметре, сферические, гладкие, полупрозрачные, зона β-гемолиза узкая, β-гемолиз лучше виден при удалении колонии с поверхности агара.

На Палкам агаре через 24 часа инкубирования листерии формируют мелкие серовато-зеленые или оливково-зеленые колонии с черным ореолом диаметром от 1,0 до 1,5 мм, иногда с черным центром. Через 48 часов колонии диаметром 1,5-2,0 мм приобретают зеленую окраску с углубленным центром окруженным черным ореолом. Кокковая микрофлора образует выпуклые желтые колонии диаметром от 1,0 до 4,0 мм.

На Оксфорд агаре колонии листерий через 24 часа инкубирования – мелкие, диаметром 1мм, сероватые, окруженные черным ореолом и углубленным центром.

На МПА с 1 % глюкозы листерии имеют вид мелких сероватых полупрозрачных колоний, на триптон-соевом агаре с дрожжевым экстрактом и трипказо-соевом агаре типичные колонии листерий от 1,0 до 2,0мм в диаметре, выпуклые, бесцветные, непрозрачные. На всех средах вид коло-

ний напоминает капли росы. Рост листерий на жидких средах характеризуется равномерным помутнением среды.

Предполагаемые колонии листерий, выросшие на агаризованных средах пересевают на одну из агаризованных сред (МПА с 1% глюкозы, триптон-соевый агар с дрожжевым экстрактом, трипказо-соевый агар), и одну из жидких сред (МПБ с 1% глюкозы, ТСБ с дрожжевым экстрактом, ТСБ), инкубируют 24 часа при 35-37⁰С.

139. Для подтверждения принадлежности культуры к роду *Listeria*, проводят микроскопическое исследование, выявляют каталазную активность и определяют подвижность культуры при 22⁰С и 37⁰С, нитрат-редуцирующие свойства.

139.1. Микроскопическому исследованию подвергают 16-24-часовую культуру, мазки окрашивают по Граму, культуры листерий – грамположительные тонкие, короткие, неспорообразующие полиморфные, чаще палочковидные бактерии. В старых культурах листерии могут приобретать форму диплококков или дифтероидов.

139.2. Проба на каталазу.

К суточной бульонной культуре добавляют равный объем свежеприготовленной 5% перекиси водорода, при исследовании агаровой культуры в пробирку вносят несколько капель перекиси водорода. При наличии фермента каталазы перекись водорода разлагается с образованием пузырьков газа. Бактерии рода *Listeria* – каталазоположительны.

139.3. Подвижность культур.

Определяют при посеве уколом в полужидкий МПА. И при 22⁰С и 37⁰С в течении 48 часов. Бактерии рода *Listeria* подвижны при 22⁰С, образуют характерный рост вокруг линии укола, похожий на зонтик, и не подвижны или слабоподвижны при 37⁰С.

139.4. Тест восстановления нитратов до нитритов.

Носит факультативный характер и мало эффективен. Все представители рода *Listeria* не восстанавливают нитрат до нитрита, за исключением непатогенной *L. gravi*, подвид *murray*. Этот тест необходим для дифференциации подвидов внутри непатогенного вида *L. gravi*. Для постановки реакции исследуемую культуру засевают в нитратную среду (питательный бульон с 1% KNO₃ и 0,17% агара) и инкубируют при 30⁰С не менее 48 часов. В качестве индикаторных растворов используют раствор А (NN- диметил-1 нафтиламиндигидрохлорид – 0,6 г, 5N уксусная кислота – 100 см³) и раствор Б (сульфаниловая кислота – 0,8 г, 5N уксусная кислота – 100 см³), для обнаружения нитритов в культуру добавляют по 0,2 мл раствора А и Б. Появление красно-фиолетовой окраски указывает на восстановление нитратов в нитриты.

140. Для подтверждения принадлежности культуры рода *Listeria*, к виду *L. monocitogenes* у выделенных микроорганизмов определяют фермен-

тативные свойства, β -гемолитическую активность. Основные характеристики, используемые для дифференциации *L. monocytogenes* от других видов листерий представлены в приложении 25 к настоящей Инструкции.

140.1. Ферментация углеводов.

Для определения ферментативных свойств чистую культуру пересевают уколом в среды Гисса (маннит, ксилозу, рамнозу), инкубируют при 35-37⁰С до 7-10 суток.

Данный тест позволяет дифференцировать три гемолитических вида листерий. *L. monocytogenes* ферментирует рамнозу и не ферментирует ксилозу и маннит. *L. ivanovi*, и *L. seeligeri* не ферментируют рамнозу и маннит, но ферментируют ксилозу.

140.2. Определение β -гемолитической активности.

Культуру высевают на кровяной агар и инкубируют при 35-37⁰С в течение 24 часов. Чашки просматривают в проходящем свете и отмечают образование зон β -гемолиза. Культуры *L. monocytogenes* образуют вокруг места укола узкие зоны гемолиза, у *L. ivanovi* зона гемолиза значительно шире и более четкая. Культуры других видов листерий зоны гемолиза не образуют.

140.3. CAMP-тест.

Вспомогательный метод для подтверждения гемолитической активности (метод Christie-Atkins-Munch-Peterson). Для постановки теста используют β -гемолитические штаммы *Staphilococcus aureus* ATCC 25923 и *Rhodococcus equi* NCTC 1621. Двухсуточную культуру стафилококка и родококка высевают на кровяной агар с 5% бараньей крови вертикально и параллельно напротив друг друга. Между этими параллельными штрихами засевают исследованные культуры на расстоянии друг от друга не менее 1см и от вертикальных штрихов *Staphilococcus aureus* и *Rh. equi* – 0,5см. Инкубацию проводят при 35⁰С и просматривают чашки через 24 и 48 часов, отмечая расширение зоны гемолиза в зонах, прилегающих к вертикальным штрихам *S. aureus* и *Rhodococcus equi*. *L. monocytogenes* и *L. seeligeri* дают положительный КАМП-тест (расширение зоны гемолиза) с культурой *S. aureus* и отрицательную КАМП-реакцию (отсутствие изменения зоны гемолиза) с культурой *Rhodococcus equi*. *L. ivanovi* дает положительный КАМП-тест с культурой *Rhodococcus equi* и отрицательный с *S. aureus*.

141. Для идентификации листерий в качестве дополнительных тестов используют агглютинацию с поливалентной листериозной сывороткой или антительным латексным диагностикумом и фаготипирование с помощью диагностического набора типовых листериозных бактериофагов (L2A и L4A), лизирующих 60-80% выделенных культур листерий.

142. Идентификацию листерий возможно осуществлять на коммерческих тест-системах с визуальным учетом или с использованием автоматических и полуавтоматических микробиологических анализаторов.

ГЛАВА 25 МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ДРОЖЖЕВЫХ И ДРОЖЖЕПОДОБНЫХ ГРИБОВ

143. Грибы относятся к царству Fungi (Mycetes, Mycota). Широко распространены в природе. Различают гифальные и дрожжевые формы грибов. Дрожжевые грибы в основном имеют вид отдельных овальных клеток, могут образовывать псевдогифы и ложный мицелий. Наибольшее клиническое значение имеют дрожжевые грибы рода *Candida*, являющиеся частью нормальной микрофлоры кожи и слизистых. При нарушении факторов иммунитета грибы рода *Candida* способны вызывать кандидозы слизистых и кожи, а также системные заболевания.

144. Схема микробиологической диагностики дрожжевых и дрожжеподобных грибов представлена в приложении 26 к настоящей Инструкции.

145. Основные морфологические и биохимические характеристики для дрожжевых и дрожжеподобных грибов представлены в приложении 27 к настоящей Инструкции.

146. Основные морфологические и биохимические характеристики грибов рода *Candida*, наиболее часто встречающихся в клинической практике представлены в приложении 28 к настоящей Инструкции.

147. Микроскопия с добавлением индийских чернил. Нанести на предметное стекло каплю индийских чернил, внести микробиологической петлей исследуемую колонию и перемешать; накрыв покровным стеклом микроскопировать на небольшом увеличении. Способность культуры к образованию капсулы проявляется наличием светлого четко очерченного ореола вокруг дрожжеподобной клетки на основном темном (за счет индийских чернил) фоне. Диаметр капсулы может колебаться в пределах от 2 до 10 мкм или более. Некоторые виды криптококков могут терять способность к образованию капсул *in vitro*. Обнаружение капсул в препарате не гарантирует подтверждения принадлежности исследуемой культуры к роду *Cryptococcus*, так как некоторые виды дрожжеподобных грибов родов *Rhodotorula* и *Torulopsis* могут образовывать капсулы.

148. Проростковая проба – тест на способность образовывать герминативные (проростковые или зародышевые) трубки. Несколько однотипных по морфологическим признакам колоний дрожжевых грибов внести в пробирку с 0,5-1 мл сыворотки (кроличьей, бычьей, лошадиной, человеческой), термостатировать в течение 3 часов при $(35\pm 2)^\circ\text{C}$. По истечении инкубации приготовить препарат (нанести каплю смеси на предметное

стекло и прикрыть покровным) и микроскопировать при небольшом увеличении. Обнаружение в препарате зародышевых трубок (предшественников истинных гиф) свидетельствует о принадлежности дрожжевого гриба к *C. albicans*. 10-15% культур *C. albicans*, выделяемых из клинического материала может не образовывать зародышевые трубки при проведении данной методики. *C. tropicalis*, также образует герминовые трубки с характерным сужением в основании, то есть в том месте, где она формируется из материнской. Схема посева культур дрожжевых грибов для оценки морфологических особенностей представлена в приложении 29 к настоящей Инструкции.

149. Тест на уреазу. Несколько однотипных по морфологическим признакам колоний дрожжевых грибов вносят в пробирку с уреазным бульоном (агаром) Кристенсена и инкубируют при 25-30°C до 4 дней. Уреазопозитивные микроорганизмы изменяют рН в щелочную сторону (розово-красный цвет среды). Тест положителен для *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp. вариабелен для *Candida* spp., *Trichosporon* spp.; негативен для *Geotrichum* spp., *Blastoschizomyes capitatus*.

150. Рост на среде с циклогексимидом (актодионом). Тестируемую культуру засевают на питательную среду с 0,1% циклогексимидом и инкубируют при 25°C в течение 48-72 часов. Тест отрицателен (отсутствует рост) для *Cryptococcus* spp., *Saccharomyces* spp., *Torulopsis* spp., *Geotrichum* spp. и вариабелен для *Candida* spp. и *Trichosporon* spp., *Rhodotorula* spp.

151. Тест на способность к формированию специфических репродуктивных структур или элементов мицелия. Тестируемую культуру засевают на кукурузный (рисовый) агар с твином 80 и накрывают покровным стеклом и инкубируют при 25°C в течение 24-48 часов. По истечении инкубации чашку исследуют под микроскопом (20-кратном увеличении), обращая внимание на образование псевдогиф, истинных гиф, артроконидий и бластоконидий.

Псевдогифы – цепочки почкующихся клеток размером напоминающие истинную гифы, формирующие ответвления и имеющие более меньшие по размеру терминальные клетки; гифы – трубчатые или нитевидные структуры у грибов, способные формировать мицелий; бластоконидии (собственно дрожжевые клетки), образующиеся вдоль гифы или псевдогифы в результате почкования; артроконидии – образующиеся при фрагментации гифы прямоугольные с закругленными концами или эллипсоидные участки.

152. Тесты ферментации углеводов – определение способности дрожжевого гриба сбрасывать определенные сахара. Тестируемую культуру засевают в пробирку содержащую 1% пептонный агар, углевод и индикатор. Инкубируют при 25°C до 10-14 дней, просматривая через 48 часов на наличие газообразования и изменения цвета в пробирке.

РАЗДЕЛ IV
ОБЩИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 26
МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ (ОКРАСКА ПРЕПАРАТОВ)

153. Метиленовый синий.

Реактивы. 1% раствор метиленового синего (1г метиленового синего растворяют в 100 мл холодной дистиллированной воды, фильтруют через бумажный фильтр).

Ход исследования. Материал наносят на чистые обезжиренные предметные стекла, растирают его тонким равномерным слоем по поверхности стекла, или на обезжиренное стекло наносят каплю воды, в которой суспендируют культуру. Препарат высушивают на воздухе и фиксируют погружением на 3 минуты в 96% этиловый спирт. Фиксированный препарат высушивают, затем наносят 1% раствор метиленового синего на 1-10 минут, тщательно смывают краситель струей холодной воды, высушивают. Смотрят с иммерсией: объектив x 90 иммерсионный, окуляр x 7 или x10.

Оценка результатов. Препарат синего цвета. Ядра клеток окрашены в синий цвет, протоплазма – в голубой цвет разной интенсивности. Бактериальная флора прокрашивается в синий цвет разной интенсивности.

154. Окраска по Граму.

Принцип. В зависимости от химической структуры бактерии обладают способностью удерживать краситель кристаллический фиолетовый или обесцвечиваться в спирте.

Реактивы: карболовый раствор кристаллического фиолетового. Растирают в ступке 1 г кристаллического фиолетового с 2 г фенола (карболовой кислоты) до кашицеобразной консистенции, прибавляют небольшими порциями 10 мл спирта и окончательно разводят 100 мл дистиллированной воды, сливают во флаконы, оставляют на сутки, фильтруют через бумажный фильтр; раствор Люголя. Йодистого калия 2г растворяют в 300 мл дистиллированной воды, в полученном растворе растворяют 1 г кристаллического йода, фильтруют через бумажный фильтр; разведенный фуксин Циля. Растирают в ступке 1 г фуксина, прибавляют, растирая, 5 г фенола (карболовой кислоты) и 10 мл спирта 96%, затем при постоянном помешивании небольшими порциями доливают 100 мл дистиллированной воды. Раствор краски фильтруют через влажный бумажный фильтр. Фуксин Циля очень стойкий и может храниться долгое время во флаконе темного стекла с притертой пробкой. К 1 мл фуксина Циля добавляют 9 мл дистиллированной воды. Раствор очень нестойкий, поэтому его готовят непосредственно перед употреблением в необходимых количествах.

Ход исследования. На обезжиренное стекло наносят каплю воды, в которой суспендируют культуру. Препарат высушивают и фиксируют над пламенем горелки. На фиксированный мазок накладывают кусочек фильтровальной бумаги и на нее наливают карболовый раствор кристаллического фиолетового на 0,5-1 мин. Сливают краситель и, не смывая, наливают раствор Люголя приблизительно на 1 мин. до почернения мазка. Сливают раствор Люголя и прополаскивают препарат в спирте 96% в течение 1/2-1 мин, пока не перестанут стекать фиолетовые струйки красителя. Затем препарат промывают струей водопроводной воды и дополнительно докрашивают в течение 1/2-1 мин водным раствором фуксина Циля. Краситель сливают, препарат промывают и высушивают.

Микроскопируют с иммерсией: объектив x90 иммерсионный, окуляр x7 или x10. Грамположительные микробы окрашиваются в сине-фиолетовый цвет, грамотрицательные – в розовый и красный.

При правильной окраске препарат оранжево-красного цвета на тонких участках, лилово-фиолетового на толстых участках. Высокое качество окраски обеспечивается своевременным прекращением обесцвечивания мазков. При недообесцвечивании мазков грамотрицательные бактерии могут сохранять фиолетовую окраску, а в переобесцвеченных мазках грамположительные микробы могут быть окрашены в оранжево-красный цвет.

155. Окраска по Цилю–Нильсену.

Принцип. Метод основан на способности микобактерий туберкулеза после окрашивания их фуксином удерживать краситель даже после длительного обесцвечивания в серной кислоте.

Реактивы: 1% раствор основного фуксина. 1 г основного фуксина растирают с 2-3 каплями глицерина, добавляют по капле 10 мл 96% этилового спирта и 90 мл 5% раствора фенола. Раствор оставляют на сутки, затем фильтруют через бумажный фильтр. Хранят в темном месте при комнатной температуре в хорошо закрытой посуде; 5% раствор фенола (карболовой кислоты); 20% серная кислота; этиловый спирт 96%; соляная кислота, концентрированная; 0,025% раствор метиленового синего (0,25 г метиленового синего на 1 л дистиллированной воды); 3% солянокислый спирт (3 мл концентрированной соляной кислоты доводят до 100 мл этиловым спиртом); глицерин.

Ход исследования. Материал готовят путем растирания его между двумя стеклами или на обезжиренное стекло наносят осадок исследуемого материала. Препарат высушивают и фиксируют над пламенем горелки.

Окрашивание мазка. На фиксированный препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги размером немного меньше предметного стекла, но так, чтобы она закрывала мазок полностью. Наливают на нее раствор карболового фуксина, и нагревают препарат над пламенем горелки до появления паров. Остудив препарат, снимают пинцетом бумажку и смывают остатки краски водой. Мазок обесцвечивают в 20% серной кис-

лоте или в 3% солянокислом спирте до слегка розовато - сероватого цвета и тщательно промывают водой. Обесцвеченный мазок подкрашивают в течение 30 секунд 0,025% раствором метиленового синего. Микроскопируют с иммерсией.

Микобактерии туберкулеза окрашиваются в красный цвет, а другие микробы и клеточные элементы – в голубой.

156. Окраска по Романовскому.

Принцип. Окраска позволяет выявить ядерные элементы и волютинные гранулы бактериальной клетки за счет сродства к основным краскам.

Реактивы: краситель Гимзы (готовый реактив); метиловый спирт или смесь Никифорова (смесь равных объемов этилового спирта и эфира этилового); дистиллированная вода, рН 7,2.

Ход исследования. Препарат фиксируют метиловым спиртом или смесью Никифорова 5 мин. Высушивают на воздухе и окрашивают рабочим раствором красителя Гимзы (2 капли на 1 мл дистиллированной воды, имеющей рН 7,2), 20 мин. Промывают дистиллированной водой и после просушивания микроскопируют.

При микроскопировании ядерные элементы имеют красно-фиолетовый цвет, цитоплазма – слабо-розовый. В более молодых культурах цитоплазма окрашивается в сине-фиолетовый цвет. У бактериальных палочек ядра окрашены в темный красно-фиолетовый цвет, волютин – в вишнево - красный.

157. Окраска по Гинсу.

Принцип. Капсула микроба обнаруживается в виде неокрашенной каймы вокруг окрашенного фуксином тела микроба на черном фоне.

Реактивы. Тушь, раствор «водного фуксина».

Для приготовления «водного фуксина» фуксин Циля разводят в 10 раз дистиллированной водой. Разведенный фуксин очень нестойкий, его готовят непосредственно перед окрашиванием препарата.

Ход исследования. Тушь разводят в 10 раз дистиллированной водой. На предметное стекло наносят каплю туши, исследуемую культуру тщательно перемешивают с тушью и, пользуясь покровным или шлифованным стеклом, готовят тонкий мазок по типу мазков крови. После подсушивания мазка на воздухе, фиксируют на пламени и докрашивают «водным фуксином» (5-10 мин). Бактерии окрашиваются в красный цвет, капсулы остаются неокрашенными, они резко выделяются на черно-коричневом фоне.

158. Окраска щелочным раствором метиленового синего по Леффлеру.

Реактивы: дистиллированная вода – 99 мл; 1% раствор КОН – 1 мл, метиленовый синий – 3 г, спирт 96% – 30 мл.

Для приготовления раствора 3 г метиленового синего растворяют в 30 мл спирта 96%, смешивают с 1 мл 1% раствора КОН и добавляют 99 мл дистиллированной воды.

Ход исследования. Исследуемый материал наносят на чистые обезжиренные предметные стекла, растирают его тонким равномерным слоем по поверхности стекла, высушивают на воздухе. Препарат фиксируют 3 мин в 96% спирте, высушивают, затем наносят каплю щелочного раствора метиленового синего и окрашивают в течение 3-10 минут, смывают оставшийся краситель струей холодной воды и высушивают.

ГЛАВА 27 ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

159. Кровяной агар (питательный агар с 5% крови). В качестве основы могут быть использованы МПА, казеиново-соевый агар, Колумбийский агар, другие варианты питательной среды для роста широкого спектра микроорганизмов, включая требовательные.

Приготовление среды. К расплавленному и охлажденному до 45⁰С агару добавляют 5% дефибринированной бараньей, лошадиной или кроличьей крови, цитратной или дефибринированной крови человека без антибактериальных препаратов. Смесь тщательно перемешивают, и разливают по 20 мл в стерильные чашки Петри.

160. Кровяной агар для постановки САМР-теста.

К 2% питательному агару, рН 7,4-7,6, добавляют 0,2% глюкозы и эритроциты барана или крупного рогатого скота. Эритроциты из цитратной крови трижды промывают изотоническим раствором хлорида натрия с целью удаления антигемолизина, который может содержаться в сыворотке, затем ресуспендируют их в том же растворе до первоначального объема крови. К агару добавляют 5% взвеси эритроцитов.

161. Шоколадный агар.

Состав: 2% мясопептонный агар (МПА), 10% крови и 5% дрожжевого экстракта от объема МПА, рН 7,4-7,6.

Приготовление. К охлажденному до 75⁰С МПА асептически добавляют половину необходимого объема крови, тщательно перемешивают и нагревают в течение 3-5 минут на водяной бане при 80⁰С, непрерывно помешивая. Остужают при комнатной температуре до 75⁰С, добавляют вторую часть крови и снова нагревают в течение 3-5 минут, непрерывно помешивая. Остужают при комнатной температуре до 45- 50⁰С и добавляют дрожжевой экстракт (5 г на 1 л основы). Агар тщательно перемешивают и разливают в чашки Петри.

Недостатком шоколадного агара является невозможность наблюдать гемолитические свойства гемофильных бактерий, которые

позволяют дифференцировать *H. haemolyticus* и *H. parahaemolyticus* от *H. influenzae* и *H. parainfluenzae*. Для селективного выделения гемофильных бактерий из клинического материала нижних дыхательных путей могут быть использованы питательные среды, содержащие бацитрацин. Высокая концентрация этого антибиотика подавляет рост большинства других микроорганизмов, являющихся представителями микрофлоры дыхательных путей (стафилококков, микрококков и стрептококков), что позволяет получить рост гемофильной палочки из сильно контаминированного клинического материала.

162. Селективная среда для выделения и дифференцирования *H. influenzae* и *H. parainfluenzae* (Taylor D.C. и др.). Состоит из гемин- и НАД-обогащенного сердечно-мозгового агара, сахарозы (10 мг/мл), индикатора фенолового красного (100 мкг/мл) и бацитрацина (300 мкг/мл). На этой среде колонии *H. parainfluenzae* имеют желтую окраску в связи с их способностью продуцировать кислоту из сахарозы, а колонии *H. influenzae* – бесцветные, так как не ферментируют сахарозу. Недостаток данной среды состоит в невозможности наблюдать гемолитические свойства гемофилов.

Вместо содержащих антибиотик сред при выделении гемофильной палочки из контаминированного материала могут быть использованы коммерческие диски с бацитрацином (10ЕД) или сапонинобацитрациновые диски. Природноустойчивые к бацитрацину гемофильные палочки будут расти вокруг диска.

163. Шоколадный бульон.

Состав: основа питательный бульон рН 7,4-7,6.

Приготовление аналогично приготовлению «шоколадного» агара.

Пример: на 180 мл питательного бульона добавляют 18 мл крови (9 мл эритроцитарной крови и 9 мл сыворотки крупного рогатого скота) и 9 мл дрожжевого экстракта.

164. Сахарный бульон.

Приготовление среды. К 100 мл питательного бульона, рН 7,2-7,4, прибавляют 1 г глюкозы. Стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 минут или при 0,5 атмосферы 30 минут.

165. Сывороточный бульон.

Приготовление среды. К питательному бульону, добавляют 20% мл лошадиной или бычьей сыворотки. Среду разливают в пробирки по 5 мл, выдерживают 2 суток в термостате для контроля стерильности, а затем хранят в холодильнике.

166. Сывороточный агар.

Приготовление среды. К расплавленному и охлажденному 45-50°C питательному агар прибавляют 15-20% лошадиной или бычьей инактивированной при температуре 56°C в течение 30 минут сыворотки. После пе-

ремешивания среду разливают в чашки. Среда годна к употреблению только в течение 48 часов при хранении ее в холодильнике. Перед посевом чашки, хранившиеся в холодильнике, должны быть подогреты до температуры 37°C.

167. Желточно-солевой агар.

Приготовление среды. В качестве основы используют элективный солевой агар для стафилококков. К расплавленному и охлажденному до 45–50°C агару, добавляют 20% желточной взвеси (асептически извлеченный из яйца желток взбалтывают с 200 мл изотонического раствора хлорида натрия). Смешивают тщательно агар с желточной взвесью, разливают по 20 мл в чашки Петри. Хранят в холодильнике в течение двух недель.

168. Среда Хью-Лейфсона.

Принцип. Среда позволяет уловить изменения рН даже при слабом окислении углеводов, что достигается заменой аминокислот питательной среды пептоном. В этой среде отсутствуют щелочные продукты расщепления аминокислот, которые могут нейтрализовать кислые продукты при утилизации углеводов.

Ингредиенты:

Пептон	– 2,0 г
Натрий хлористый	– 5,0 г
Калий фосфорнокислый двузамещенный (K ₂ HPO ₄)	– 0,3г
Глюкоза	– 10,0 г
Агар	– 3,0 г
Бромтимоловый синий	– 0,03 г
Дистиллированная вода	– 1000,0 мл

Приготовление среды. К воде прибавляют пептон, натрий хлористый и агар. Смесь подогревают до расплавления агара. Затем добавляют калий фосфорнокислый двузамещенный и глюкозу. Продолжают кипятить 2-3 минуты. Смесь подщелачивают 20% раствором NaOH до рН 7,4-7,5, доводят объем среды до первоначального и добавляют 3 мл 1% водного раствора бромтимолового синего. Среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по 10-15 мл в стерильные пробирки. Стерилизуют при 0,5 атм. 20 минут. Цвет среды до стерилизации – синий, после автоклавирования – травянисто-зеленый, рН 7,1-7,2. При кислом рН среда желтеет.

169. Среда Сабуро.

Приготовление. На 1 л дистиллированной воды 10,0 г пептона, 18,0 г агар-агара. Нагревают до расплавления агара, добавляют 40,0 г глюкозы, рН 5,8, стерилизуют при 0,5 атм. 30 минут.

170. Индикатор Андресе.

Рецепт №1. Посуда должна быть химически чистой с притертой пробкой. К 160 мл 1N едкого натрия добавить 2,5г кислого фуксина. Раствор оставить при 37°C на 1-2 суток, периодически встряхивая. Долить

до 1,0 л и сутки выдерживать на свету при комнатной температуре. Окраска раствора – соломенно-желтого цвета или слегка розового оттенка. Хранить в темном месте.

Рецепт №2. Состав:

Фуксин кислый	– 5,0
NaOH 1 N раствор	– 150,0–180,0
Дистиллированная вода	– 1000,0

Приготовление. Кислый фуксин растворяют в воде и добавляют раствор щелочи, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 24 часа, периодически встряхивая. Цвет должен измениться от красного до коричневого. Если цвет не изменился, то добавляют еще 10,0 мл щелочи и выдерживают индикатор еще 1 сутки. По другой прописи смешанные ингредиенты выдерживают 24 часа в термостате при 37⁰С и затем 48 часов при комнатной температуре на свету. Хранят готовый индикатор в бутылки темного стекла с притертой пробкой в обычных условиях.

171. Дрожжевой автолизат.

1000,0 г хлебопекарных дрожжей разводят в 1 дм³ питьевой воды и помещают в термостат (сушильный шкаф) при температуре 55±1⁰С на 72 часа. Полученную суспензию переносят в стерилизатор и выдерживают при температуре 115-37⁰С 15 минут. Автолизат фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Осадок промывают таким количеством питьевой воды, чтобы общее количество фильтрата составило 4 дм³. Фильтрат нейтрализуют раствором с массовой долей гидроокиси натрия 20% до рН (6,8±0,1), разливают в пробирки диаметром 21 мм по (32±3) см³, закрывают ватной пробкой и стерилизуют при температуре 121-37⁰С в течение 20 минут.

172. Питательные среды при исследовании на гемокультуру.

172.1. «Двойная среда» состоит из скошенного во флаконе 150 мл 1,7-2% питательного агара и 150 мл полужидкой среды, приготовленной на питательном бульоне с добавлением 15 г глюкозы и 0,15 г агара. Кровь засевают в жидкую часть среды. Инкубируют в термостате при 35-37⁰С. Флаконы ежедневно просматривают, при этом, наклоняя флакон, смачивают поверхность скошенного агара бульоном. Это исключает необходимость высева на плотные питательные среды и уменьшает риск загрязнения при пересевах.

172.2. «Среда для контроля стерильности». Эту среду следует обогатить, добавив 15-20 г дрожжевого экстракта и 4,25-5,0 г агара на 1 литр. В качестве индикатора анаэробноза добавляют 0,001 г резазурина, который краснеет в присутствии кислорода. В случае покраснения более 20% верхней части столбика среду регенерируют, прогреванием в течение 20 минут в кипящей водяной бане. Регенерацию можно провести лишь однократно.

172.3. Жидкая среда Сабуро. Приготовление: на 1 литр дистиллированной воды берут 10 г пептона, 25 г хлористого натрия, 40 г глюкозы. Разливают во флаконы по 150-200 мл, стерилизуют при 0,5 атмосфер 20 минут (рН 5,5).

173. Питательные среды для дифференциальной диагностики стафилококков.

173.1. Глицериновый агар. 10,0 г пептона ферментативного, 5,0 г хлористого натрия, 5,0 г отмытого агар-агара для микробиологических целей, 1000,0 мл дистиллированной воды, рН 7,2-7,4, кипятят до растворения ингредиентов, добавляют 20,0 мл глицерина, 10,0 мл индикатора Андрее. Разливают в стерильные пробирки по 5-6 мл. Стерилизуют при 112⁰С 20 мин. Скашивают.

173.2. Среда для определения лецитиназы. Основой среды является 1,8% питательный агар, содержащий 7,5 г NaCl на 100 мл среды. К 200 мл растопленного и охлажденного до 50⁰С агара добавляют молочно-желточную смесь, которую готовят следующим образом: во флаконе с 20 мл стерильного снятого молока эмульгируют 2 мл яичного желтка. После добавления смеси в агар среду тщательно перемешивают и разливают по 20 мл в чашки Петри. Готовая среда содержит примерно 10% молока и 1% яичного желтка.

174. Питательные среды для дифференциальной диагностики энтерококков.

174.1. ЖЩА. Сухой питательный агар – 35,0 г; дрожжевой автолизат – 20,0 мл; глюкоза – 10,0 г; дистиллированная вода – 600 мл. Агар расплавляют, профильтровывают, добавляют свежей бычьей желчи – 400,0 мл и карбонат натрия – 5,0 г. Стерилизуют готовую среду автоклавированием при 112⁰С в течение 15 минут. Перед разливкой в чашки к среде прибавляют 50,0 мл свежей крови (барана, кролика или человека), 12,5 мл 0,01% раствора кристаллического фиолетового и 20 мл раствора КОН.

174.2. Молоко с метиленовым синим. Свежее молоко доводят до кипения, оставляют на сутки, освобождают от сливок, вторично кипятят, снова оставляют на сутки и вторично снимают верхний слой. Обезжиренное таким образом молоко фильтруют через толстый слой ваты, подщелачивают 10% раствором карбоната натрия до рН 7,2. К 100 мл молока прибавляют 2,0 мл 1% водного раствора метиленового синего. Приготовленную таким образом среду разливают по 5,0 мл в стерильные пробирки, стерилизуют текучим паром 3 дня по 30 минут.

174.3. ЭДДС. Сухой питательный агар – 35г, автолизат дрожжевой для приготовления питательных сред – 20 мл, глюкоза – 10г, дистиллированная вода – 800 мл. Расплавляют при нагревании, профильтровывают, стерилизуют при 112⁰С 15 минут, рН 7,2-7,4.

Перед разливкой в чашки в питательную среду добавляют ТТХ – 0,1 г; водного раствора кристаллического фиолетового 0,01% – 12,5 мл; нали-

диксовой кислоты – 0,1 г; стерильного обезжиренного молока, подогретого до 44-45⁰С – 200 мл; свежей дефибрированной крови (животных или человека) – 50 мл. Содержимое тщательно размешивают и разливают по чашкам по 7 мл.

174.4. Сахарно-дрожжевой питательный агар с теллуридом калия. Сухой питательный агар – 35г, дрожжевой автолизат – 20 мл, глюкоза – 10г, дистиллированная вода – 1000 мл. Приготовленную смесь расплавляют при нагревании, добавляют лимоннокислого натрия – 5,0 г. Стерилизуют среду при 112⁰С в течение 15 минут, рН 7,2-7,4. Перед разливкой среды в стерильные чашки добавляют 50 мл лошадиной сыворотки, 0,1 г налидиксовой кислоты и 0,7 г (35 мл 2% водного раствора) теллурида калия, тщательно размешивают.

174.5. Питательный бульон с глюкозой. К 100 мл питательного бульона, рН 7,2-7,4, прибавляют 0,2 г глюкозы. Приготовленную среду стерилизуют дробно 3 дня подряд по 20 минут или однократно 15 минут при 0,5 атм. в автоклаве.

175. Питательные среды для дифференциальной диагностики гемофилов.

175.1. Среда Гисса (определение сахаролитических ферментов). Ингредиенты: индикатор Андрее, пептон, натрий хлористый, углеводы (глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза, фруктоза).

Для приготовления индикатора Андрее берут кислого фуксина – 1,0г, 1 моль/л едкого натра – 64 мл, дистиллированной воды – 400 мл.

Приготовление среды. К 100 мл дистиллированной воды прибавляют 1 г пептона, 0,5г натрия хлористого, 2 мл индикатора Андрее, нагревают до 80⁰С, рН 7,2. Затем среду кипятят 5 минут, фильтруют и доливают до первоначального объема дистиллированной водой. Добавляют 1 г одного из углеводов. Стерилизуют 3 дня текучим паром по 30 минут или при 0,5 атм. 15 минут.

Ход исследования. В пробирки после посева культуры добавляют 2-3 капли инактивированной сыворотки лошади или крупного рогатого скота для более активного расщепления углеводов. При расщеплении углеводов среда из бесцветной становится красной.

176. Питательные среды для дифференциальной диагностики псевдомонад.

176.1. ЦПХ-агар. К питательной основе добавляют 0,2% N-цетилпиридиния хлорида – катионного поверхностно-активного вещества, подавляющего рост микроорганизмов, возможных ассоциантов псевдомонад в клиническом материале.

Ингредиенты:

Пептон ферментативный	– 20,0 г
Калий сернокислый	– 7,0 г
Магний хлористый	– 1,5 г

Магний сернокислый	– 1,5 г
N-цетилпиридиний хлорид	– 2,0 г
Агар-агар	– 10,0 г
Вода дистиллированная	– 1000,0 мл
рН среды – 6,8-7,0	

Приготовление. Все ингредиенты смешивают, среду доводят до кипения, кипятят 2-3 минуты до расплавления агара и разливают в чашки Петри. Активность среды сохраняется в течение 1 месяца при хранении при 4⁰С.

176.2. Среда Кинг А.

Ингредиенты:

Пептон	– 20,0 г
Глицерин	– 10,0 г
Калий сернокислый	– 10,0 г
Магний хлористый	– 1,4 г
Вода дистиллированная	– 1000 мл
Агар-агар	– 20,0 г

Приготовление. Все ингредиенты смешивают, кипятят до расплавления агар-агара, разливают во флаконы и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм. в течение 20 минут.

176.3. Среда с ацетамидом.

Ингредиенты:

Натрий хлористый	– 5,0 г
Магний сернокислый	– 0,2 г
Аммоний фосфорнокислый однозамещенный	– 1,0 г
Калий фосфорнокислый двузамещенный	– 1,0 г
Ацетамид	– 20,0 г
Агар-агар	– 15,0 г
Вода дистиллированная	– 1000 мл
рН среды – 6,7-6,8	

Приготовление. Все ингредиенты смешивают, кипятят до расплавления агар-агара, разливают во флаконы и стерилизуют в автоклаве при 1 атм. 20 минут.

176.4. Питательная желатина.

Ингредиенты:

Питательный бульон	– 100 мл
Желатина	– 12,0 г
Натрий двууглекислый – 10% раствор	
рН – 7,0	

Приготовление. К 100 мл питательного бульона добавляют 12 г измельченной желатины. Ставят для набухания на 1 час при комнатной температуре, затем на водяную баню при температуре 40-45⁰С для растворе-

ния. С помощью 10% раствора натрия двууглекислого устанавливают рН 7,0. Стерилизуют при 0,5 атм. 20 мин.

177. Питательные среды для дифференциальной диагностики листерий

177.1. Лецитин-агар с активированным углем и без угля. К питательной среде ГРМ № 1 перед стерилизацией добавляют 0,5% активированного угля, растертого до порошкообразного состояния. Желток куриного яйца разводят в 150 см³ физиологического раствора и добавляют в количестве 5% по объему к стерилизованной и охлажденной до 40-45⁰С питательной среде. Разливают в чашки Петри не более 20 см³ на чашку и подсушивают при 35-37⁰С. Аналогично готовят среду с добавлением желтка, но без добавления активированного угля.

177.2. Среда для определения подвижности. 20 г гидролизата казеина ферментативного, 6 г пептона мясного ферментативного, 5 г агара растворяют в 1 000 см³ дистиллированной воды, устанавливают рН 7,3±0,2, разливают в пробирки по 5-7 см³ автоклавируют при 121⁰С 15 минут.

178. Питательные среды, выпускаемые промышленностью.

Мясо-пептонный агар (МПА), мясо-пептонный бульон (МПБ), триптиказо-соевый бульон, триптиказо-соевый агар, эритрит-агар, среда Эндо, среда МакКонки, ЕМВ-агар (агар с эозином и метиленовым голубым), агар с эозин-метиленовым синим (ЭМС-агар), висмут-сульфит агар, агар с бриллиантовым зеленым, SS-агар (сальмонелла-шигелла агар), трехсахарный агар с солями железа (TSI), среда Левина, агар Симонса, агар Кристенсена, энтерококкагар, азидный агар с эскулином и желчью, среда Клиглера, среда Олькеницкого, XLD агар (ксилозо-лизин-дезоксихолатный), TCBS-агар (тиосульфат-цитрат-желчно-сахарозный агар), CLED-агар, селенитовый бульон, питательная среда для накопления сальмонелл – магниевая среда, основа агара Байэрд-Паркера, среда для определения чувствительности к антибиотикам (Мюллер-Хинтон агар), агар ацетатный, агар элективный солевой (агар для стафилококков), солевой агар с маннитом, среда Сабуро, среды Гисса с углеводами, основа тетрационатного бульона, эритритагар, агар Шедлера, бульон Шедлера, Колумбийский бульон, Колумбийский агар, «Среда для контроля стерильности» (СКС), тиогликолевая среда, агар с цетримидом (Цетримид агар) – сухие промышленные питательные среды, состав и способ приготовления указаны на этикетке.

179. Допускается использование других коммерческих питательных сред, систем идентификации и диагностических препаратов, предназначенных для целей описываемых методов зарегистрированных в Республике Беларусь в установленном порядке. При их применении руководствоваться рекомендациями производителя.

ГЛАВА 28

БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ, СОЗДАНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

180. Тест на каталазу.

Принцип. Метод основан на способности микроорганизмов, имеющих фермент каталазу, расщеплять перекись водорода, образуя воду и газообразный кислород.

Реактивы. 3% раствор перекиси водорода.

Ход исследования. На предметное стекло наносят каплю 3% перекиси водорода, в нее вносят стеклянной палочкой культуру и растирают круговыми движениями. При положительной реакции происходит пенообразование. Не следует использовать для тестирования культуры старше 24 часов, так как фермент присутствует только в живых микроорганизмах и может быть получен ложноотрицательный результат. Каталаза присутствует в эритроцитах, поэтому может наблюдаться ложноположительный результат при заборе колоний со среды, содержащей кровь.

Контроль качества реактива. Контрольные штаммы: положительный контроль *S.aureus* ATCC 25923; отрицательный контроль *S.pyogenes* ATCC 19615. Контролю подлежит каждая новая партия реактивов.

181. Цитохромоксидазный тест.

Принцип. Метод основан на способности микроорганизмов, образующих фермент цитохромоксидазу, изменять цвет реактива из бесцветного в синий.

Реактивы (метод Эрлиха).

1. 1% водный раствор диметил-пара-фенилендиамин гидрохлорид.
2. 1% спиртовой раствор альфа-нафтола.

Ход исследования. Приготовить смесь, состоящую из 3-х частей 1% водного раствора диметил-пара-фенилендиамина гидрохлорида и 2-х частей 1% спиртового раствора альфа-нафтола.

Приготовленную смесь нанести каплями на выросшие на чашке колонии. Микроорганизмы, образующие фермент цитохромоксидазу, в течение 20-30 секунд окрашиваются в темно-синий цвет. Тест может быть выполнен с помощью готовых индикаторных бумажек на оксидазу. Суточную агаровую культуру наносят в виде штриха платиновой петлей или стеклянной палочкой на диски или полоски фильтровальной бумаги, пропитанные реактивом на оксидазу, при положительной реакции появляется синее окрашивание в течение 30 секунд.

Наличие цитохромоксидазы можно выявить по методу Ковача (известен как тест на оксидазу), являющемся модификацией метода Эрлиха. По методу Ковача на культуру наносят несколько капель 1% водного раствора тетра-пара-фенилендиамина. При положительной

реакции через 20-30 секунд появляется стойкое темно-красное окрашивание.

Контроль качества: проводят в день постановки теста с культурами *P.aeruginosa* ATCC 27853 (положительный контроль) и *E.coli* 25922 (отрицательный контроль).

182. Определение ДНК-азы.

Принцип. Под действием ДНК-азы (далее-дезоксирибонуклеазы) добавленная в плотную среду высокополимерная ДНК распадается на низкополимерные фрагменты. При этом мутная среда, содержащая высокополимерную ДНК, становится прозрачной.

Реактивы. Сухая высокополимерная ДНК; 2 моль/л раствор едкого натра (NaOH), 3 моль/л раствор соляной кислоты (HCl), стерильный 10%-ный раствор хлористого кальция (CaCl_2), 50 мг, 100 мг или 200 мг высокополимерной ДНК растворяют в 3-5 мл дистиллированной воды, подщелоченной 4-5 каплями 2 моль/л NaOH. К 100 мл расплавленного 1,8% мясопептонного агара (pH 8,6) добавляют приготовленный раствор ДНК и прогревают среду 20 минут в кипящей бане. Затем в слегка охлажденный агар вносят 0,5 мл стерильного 10% раствора CaCl_2 , среду тщательно перемешивают и разливают тонким слоем в чашки Петри (по 10-12 мл на чашку), в зависимости от взятой дозы. Содержание ДНК в готовой среде составляет 0,5; 1,0 или 2,0 мг/мл.

183. Определение устойчивости к новобиоцину.

Принцип. Антибиотик новобиоцин в избранной концентрации подавляет рост штаммов *S.epidermidis*, но не влияет на рост естественно устойчивых к нему штаммов *S.saprophyticus*.

Ингредиенты. Из стерильного водного раствора новобиоцина (10 мг в 10 мл дистиллированной воды) берут 0,5 мл и вносят в пробирку с 3 мл стерильного физиологического раствора. Содержимое пробирки переносят во флакон с 250 мл расплавленного и охлажденного до 50°C 1,8% питательного агара, перемешивают и разливают среду в чашки Петри. Конечная концентрация новобиоцина в среде составляет 2 мкг/мл.

184. Тест на фосфатазу.

Принцип. Фермент фосфатаза отщепляет фосфатную группу от фосфорорганического соединения. Образующийся в результате продукт реакции либо уже является окрашенным, либо приобретает окраску при добавлении соответствующего реактива.

Реактивы. Динатриевая соль пара-нитрофенилфосфата (1-й метод); фенолфталеинфосфат натрия, 25% раствор аммиака (2-й метод).

Ход исследования. Определение фосфатазы можно проводить двумя методами, дающими совпадающие результаты, с использованием двух разных реактивов.

1-й метод. 50 мг пара-нитрофенилфосфата (динатриевая соль) растворяют в 3 мл стерильной дистиллированной воды, раствор добавляют к

100 мл расплавленного и охлажденного 1,8% питательного агара, перемешивают и разливают в чашки Петри. Конечная концентрация реактива в среде составляет 0,05%. Суточные агаровые культуры исследуемых штаммов с помощью петли сеют на среду (не более 16 штаммов на одну чашку). Учет результатов проводят после 18-24 часовой инкубации при 35-37⁰С. Реакция считается положительной, если в толще среды вокруг выросшей колонии видна зона интенсивного желтого окрашивания.

2-й метод. Фенолфталеинфосфат натрия добавляют к агару в концентрации 0,01%. Посев и инкубация осуществляется также как и в предыдущем методе. По окончании инкубации на крышку чашки Петри наливают 5-6 капель 25% раствора аммиака, выдерживают чашку в перевернутом состоянии 5-10 минут, подвергая выросшую культуру воздействию паров аммиака, после чего регистрируют результаты. О положительной реакции свидетельствует появление розового окрашивания макроколоний.

185. Определение индолообразования.

Принцип. Метод основан на способности микроорганизмов расщеплять аминокислоту триптофан с образованием индола.

Реактивы: пара-(диметиламино)-бензальдегид, ортофосфорная кислота, чда, хч, концентрированная, спирт 96%.

Для приготовления индикаторных бумажек берут пара-(диметиламино)-бензальдегида – 5 г; ортофосфорной кислоты концентрированной – 10 мл; спирта 96% – 50 мл. Раствором смачивают фильтровальную бумагу.

186. Определение уреазы.

Принцип. Метод основан на способности микроорганизмов, обладающих ферментом уреазой, расщеплять мочевины до аммиака, за счет которого происходит изменение рН среды в щелочную сторону, что определяется по изменению цвета индикатора.

Для постановки пробы используют два реактива. Реактив А: стерильная дистиллированная вода – 4 мл, этиловый спирт 96% – 2 мл, мочевины – 2 грамма. Реактив В: 0,2 % раствор фенол-рот – 1 мл, КН₂РО₄ – 0,1грамм, К₂НРО₄ – 0,1 грамм, NaCl – 0,5 граммов, дистиллированная вода – 100мл. Реактив А хранить при температуре 4-10⁰С (не автоклавировать). Реактив В стерилизовать при 1,5 атм. 30мин. Перед употреблением их в терморе смешать 1 часть реактива А и 19 частей реактива В. Смесь разлить в пробирки по 0,1 мл и внести несколько капель исследуемой культуры. Пробирки поставить в термостат на 30 мин. Уреаза расщепляет мочевины, изменяя рН среды, что приводит к её покраснению. Учет отрицательной реакции возможен после 24 часов инкубации.

187. Гидролиз гипсурата натрия.

Определение ферментативного гидролиза гиппурата натрия с образованием бензойной кислоты помогает дифференцировать β -гемолитические стрептококки группы В от β -гемолитических стрептококков группы А.

Ингредиенты: хлорид железа 12,0 г, дистиллированная вода 94,6 мл, соляная кислота концентрированная 5,4 мл.

Ход приготовления: добавить 75 мл дистиллированной воды в мерную колбу на 100 мл, затем не касаясь стенок колбы добавить 5,4 мл соляной кислоты. Добавить 12,0 г хлорида железа, растворить его, осторожно подогреть колбу и тщательно перемешивая ее содержимое. Довести объем до 100 мл дистиллированной водой. Готовый раствор имеет оранжевую окраску.

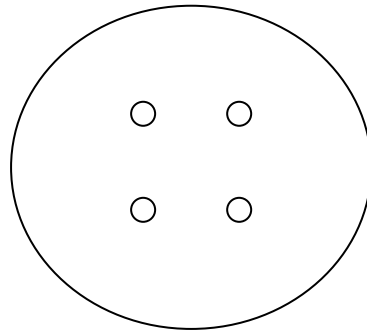
188. Для создания условий культивирования микроорганизмов, растущих при повышенном содержании CO_2 используется термостат – CO_2 инкубатор, создающий параметры среды – $T 37^\circ\text{C}$, влажность – 95%, CO_2 – 6% или коммерческие газогенераторные системы.

Можно использовать сосуд с притертой крышкой, например, эксикатор. Засеянные чашки помещают внутрь эксикатора вверх дном, там же укрепляют зажженную свечу высотой 2-3 см и закрывают крышкой. К моменту затухания свечи в сосуде создается повышенная концентрация CO_2 (7-10%). После этого сосуд с посевами помещают в термостат.

Для создания анаэробных условий культивирования возможно использование анаэробных боксов или специальных газогенераторных пакетов.

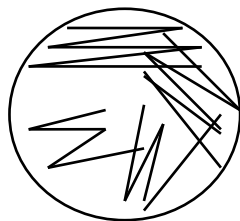
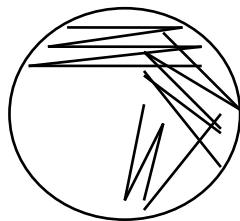
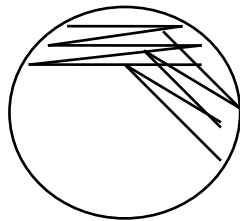
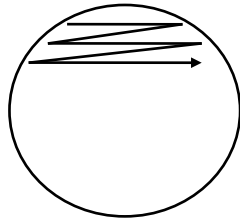
Приложение 1
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Схема посева ликвора



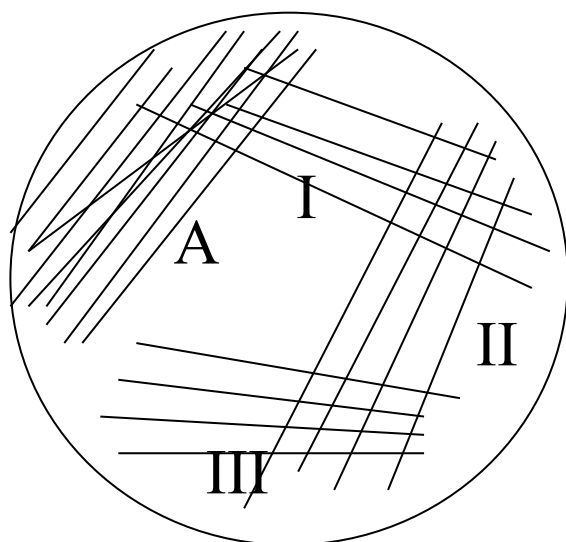
Приложение 2
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Схема посева материала полуколичественным методом



Приложение 3
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Схема посева мочи методом секторных посевов



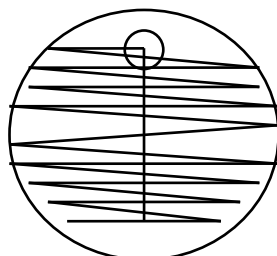
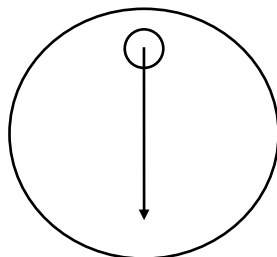
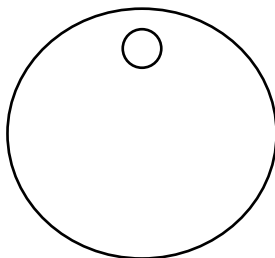
Приложение 4
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Определение степени бактериурии по количеству выделенных колоний

А	Количество колоний в секторах			Количество бактерий в 1 мл мочи
	I	II	III	
1-6	-	-	-	Менее 1000
8-20	-	-	-	3000
20-30	-	-	-	5000
30-60	-	-	-	10000
70-80	-	-	-	50000
100-150	5-10	-	-	100000
не сосчитать	20-30	-	-	500000
не сосчитать	40-60	-	-	1 000000
не сосчитать	100-140	10-20	-	5 000000
не сосчитать	не сосчитать	30-40	-	10 000000
не сосчитать	не сосчитать	60-80	единичные колонии	100 000000

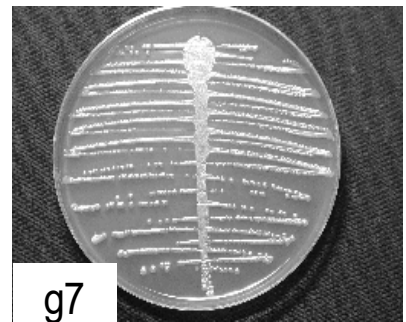
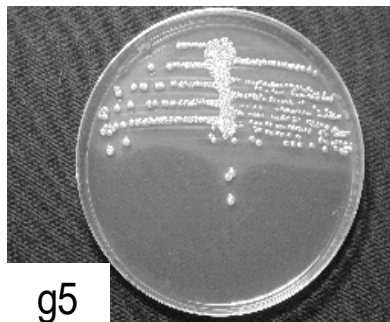
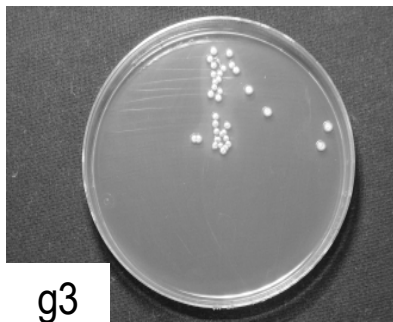
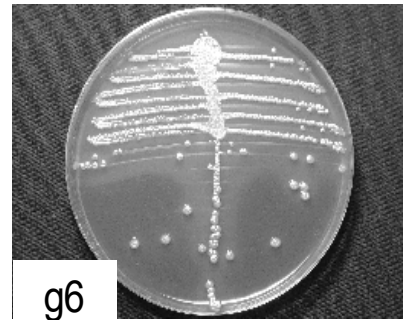
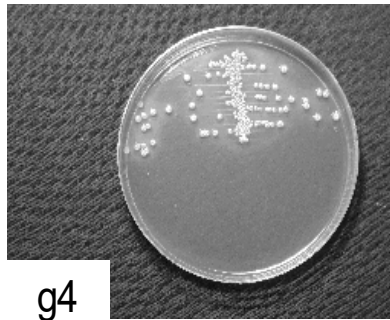
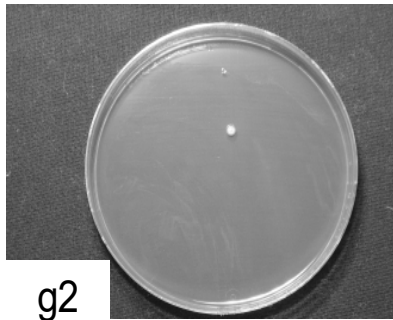
Приложение 5
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Схема посева мочи альтернативным методом



Приложение 6
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

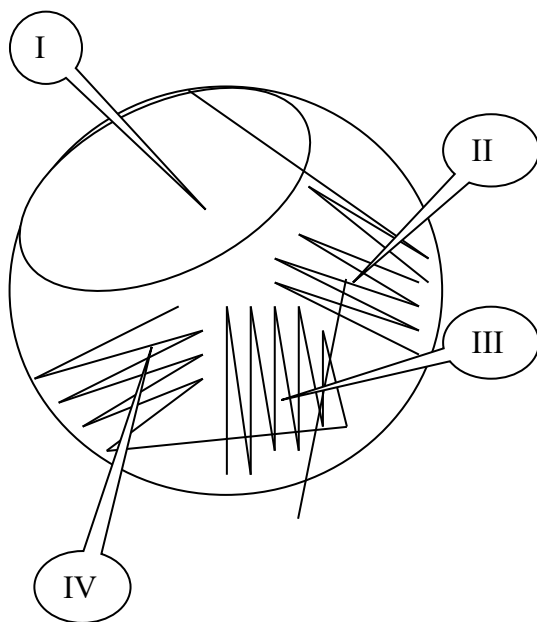
Определение степени бактериурии



Inoculum : 10 μ l

Приложение 7
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Схема посева материала,
собранного с помощью микробиологического тампона



Приложение 8
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Основные возбудители при разных нозологических формах инфекций
нижних дыхательных путей

Локализация	Возбудитель	Примечание
Обострение хронического бронхита	Вирусы H. influenzae	особенно у курильщиков
Внебольничная пневмония	S.pneumoniae, H. influenzae Moraxella (Branhamella) catarrhalis Mycoplasma pneumoniae	в возрасте от 5 до 25 лет чаще, чем в других возрастных группах
	Грамотрицательные бактерии Грибы рода Candida	возрастает роль для пожилых пациентов
Госпитальная пневмония	K.pneumoniae, Enterobacter spp., E.coli, Pseudomonas spp., S.aureus	интубированные больные
Аспирационная пневмония	Анаэробы ротовой полости в чистом виде или в сочетании с грамотрицательными бактериями	
Атипичная пневмония	Mycoplasma pneumoniae Ch. pneumoniae, Ch. psitacci Legionella pneumophila, вирусы	
Пневмония у больных с иммунодефицитами	Pneumocystis carinii, микобактерии, Nocardia spp., грибы, цитомегаловирусы	считаются маркерами ВИЧ-инфекции

Приложение 9
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Критерии оценки качества материала
собранного из нижних отделов дыхательного тракта

Тип клеток и их количество	Оценка
Нейтрофиллы	
<10	0
10-25	+1
>25	+2
Присутствие слизи	+1
Эпителиальные клетки	
10-25	-1
>25	-2

Приложение 10
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Взятие, транспортировка и хранение клинического материала
при инфекциях уrogenитального тракта

Биоматериал	Правила взятия материала	Условия транспортировки и хранения
Микроскопический метод исследования		
<p>Отделяемое из уретры (мужчины) Взятие материала проводится не ранее 2-3 часов после мочеиспускания</p>	<p>Пробоподготовка: пациент слегка массирует уретру скользящими движениями от основания пениса к его головке; область наружного отверстия уретры очищается с помощью стерильного марлевого тампона (крайнюю плоть отвести назад). Отбор материала: осторожно ввести инструмент в наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 1-2 см); слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал.</p>	<p>Каждое стекло: маркируется, помещается в контейнер для транспортировки; сопровождается направлением помещенным в полиэтиленовый пакет. При необходимости хранения</p>
<p>Отделяемое из уретры (женщины) Взятие материала проводится не ранее 2-3 часов после мочеиспускания</p>	<p>Пробоподготовка: наружное отверстие уретры очистить с помощью стерильного тампона; при отсутствии свободных выделений провести легкий массаж уретры. Отбор материала: ввести инструмент в наружное отверстие мочеиспускательного канала (на глубину 0,5-2 см); слегка нажимая на переднюю стенку уретры собрать материал.</p>	<p>материала более 24 часов после высушивания каждый образец отдельно фиксируют 960 этиловым спиртом в течение 3 минут. В направлении должно быть указание на проведенную фиксацию препарата.</p>

Отделяемое из цервикального канала	<p>Пробоподготовка: ввести гинекологическое зеркало; очистить наружное отверстие цервикального канала от выделений при помощи стерильного тампона.</p> <p>Отбор материала: ввести инструмент в цервикальный канал (на глубину 2 см) и вращая его, собрать материал.</p> <p>У беременных для исследования собираются свободно истекающие выделения из цервикального канала.</p>	
Отделяемое из влагалища (девочки препубертатного возраста)	Отбор материала: при наличии выделений используется стерильный тампон. При отсутствии выделений ложка Фолькмана. Инструмент осторожно вводится через гименальное отверстие и материал берется из преддверия влагалища.	
Культуральный метод исследования		
Отделяемое из уретры (мужчины)	См. Микроскопический метод исследования	Материал доставляется на исследование не позднее 2-х часов. Допускается хранение при комнатной температуре в течение 24-х часов при использовании транспортных сред.
Содержимое предстательной железы	Отбор материала: получение материала рекомендуется проводить после мочеиспускания; провести ректальный массаж предстательной железы; материал для исследования собрать из наружного отверстия уретры.	
Отделяемое из уретры (женщины)	См. Микроскопический метод исследования	
Отделяемое из цервикального канала	См. Микроскопический метод исследования	
Отделяемое из влагалища (девочки препубертатного возраста)	См. Микроскопический метод исследования	

Дифференциация стафилококков и микрококков

Свойства	Стафилококки	Микрококки
Размеры клеток	до 1 мкм	0,5 – 2 мкм
Окраска колоний	от золотистого до белого	от белого до розово- красного, оранжевого
Ферментация глюкозы в анаэробных условиях	+	-
Гемолиз	+	-
Окисление глицерина	+	-

Приложение 12
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Биохимическая идентификация рода *Staphylococcus*

Микроорганизм	Плазма	Ферментация маннита		Гемолиз	Лецитиназа	Лизоцимная активность	Определение ДНКазы
		аэробно	анаэробно				
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	-	+ -	-	+ -	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	-	+ -	-	-	-	-	-

Приложение 13
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Схема идентификации *S. aureus*

№ варианта	Наличие				Фермента- ция маннита (анаэробно)	Принад- лежность штамма к виду
	пиг- мента	лецитина- зы	коагулазы	ДНК- азы		
1	+	+	+			Да
2	-	+	+			Да
3	+	-	+			Да
4	-	-	+			?
4а	-	-	+	+		Да
4б	-	-	+	-		Нет
4в	-	-	+		+	Да
4г	-	-	+		-	Нет
5	-	-	-			Нет
6	-	+	-			Нет
7	+	-	-			Нет
8	+	+	-			?
8а	+	+	-	+		Да
8б	+	+	-	-		Нет
8в	+	+	-		+	Да
8г	+	+	-		-	Нет

Приложение 14
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Дифференциальные признаки *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*

Группа	Устойчивость к новобицину	Фосфатаза	Окисление маннита
<i>S. epidermidis</i>	-	+	-
<i>S. saprophyticus</i>	+	-	+

Приложение 15
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Результаты гидролиза гиппурата натрия у референс-штаммов

Штаммы микроорганизмов	Рост	Гидролиз гиппурата натрия
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	обильный	-
<i>S.agalactiae</i> ATCC 4768	обильный	+
<i>S.pyogenes</i> ATCC 19615	обильный	-

Приложение 16
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Основные биологические свойства стрептококков

Свойства	Групповая принадлежность		
	А (<i>S.pyogenes</i>)	В (<i>S.agalactiae</i>)	С и G
Вид гемолиза на кровяном агаре	β	β, α	β
Гидролиз гиппурата натрия	-	+	-
САМР тест	-	+	-
Наличие PYR	+	-	-
Чувствительность к бацитрацину	+	-	-

Приложение 17
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Инфекционные болезни, вызываемые *H.influenzae*

Инфекции	Возрастная группа	Штаммы
Инвазивные:		
Менингит, эпиглоттит, пневмония, септический артрит, остеомиелит, целлюлит, бактериемия	90% - дети до 4 лет; 10% - дети старшего возраста и взрослые	90% - тип b 10%- нетипируемые 1% - типы e и f
Сепсис	Новорожденные, роженицы	>90% нетипируемые
Неинвазивные:		
Средний отит, синусит, конъюнктивит, обострение хронического бронхита	Дети и взрослые	>90% нетипируемые

Приложение 18
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Дифференциально-диагностические свойства видов рода *Haemophilus*

Вид	Потребность		Каталаза	Оксидаза	ONPG	Гемолиз*	глюкоза	сахароза	лактоза	манноза
	X и V факторах	CO ₂								
<i>H. influenzae</i>	x,v	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>H. influenzae</i> биовар <i>aegypticus</i>	x,v	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	x,v	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	V	-	+	+	+	-	+	+	-	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	V		+	+	+	+	+	+	-	-
<i>H. aphrophilus</i>	h	+	-	-	+	-	+	+	+	+
<i>H. paraphrophilus</i>	V	+	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>H. segnis</i>	V	-	+	-	+	-	W	W	-	-
<i>H. ducreyi</i>	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: ONPG — тест на β -галактозидазу; h — для первичной изоляции нуждается в гемине; w — слабая реакция; + - — признак варьирует.

* — на лошадиной крови.

Приложение 19
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Биотипирование *H.influenzae*

Биотип	Индол	Уреаза	Орнитиндекарбоксилаза
<i>H. influenzae</i> I	+	+	+
<i>H influenzae</i> II	+	+	-
<i>H. influenzae</i> III	-	+	-
<i>H. influenzae</i> IV	-	+	+
<i>H. influenzae</i> V	+	-	+
<i>H. influenzae</i> VI	-	-	+
<i>H. influenzae</i> VII	+	-	-
<i>H influenzae</i> VIII	-	-	-

Приложение 20
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Основные дифференцирующие признаки *N. influenzae*
от некоторых других микробов, возбудителей бактериальных инфекций
человека одной локализации

Наименование	Рост на агаре		Морфология клеток (окраска по Граму)	каталаза	оксидаза	В-галактозидаза	уреаза
	без крови	шоколадный агар					
<i>N. influenzae</i>	-	+ ¹	Грамотрицательные мелкие палочки	+	-	-	+
<i>N. meningitidis</i>	-	+	Грамотрицательные бобовидные дипло- кокки	+	+	-	-
<i>Neisseria spp.</i>	+	+	Грамотрицательные крупные кокки	+	+	-	-
<i>Branhamella</i>	+	+	Грамотрицательные крупные кокки	+	+	-	-
<i>Moraxella</i>	-	+	Грамотрицательные кокко-бациллы	+	+	-	-
<i>Acinetobacter</i>	+	+	Грамотрицательные кокко-бациллы	+	-	-	+,-
<i>S. pneumoniae</i>	-	+ ²	Грамположительные диплококки	-	-	+	-

Примечание:

¹ – характерный "мышинный" запах; ² – вокруг колоний цвет среды зеленеет.

Приложение 21
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Биохимические свойства микробов рода *Corynebacterium*

	расщепление							Редукция нитратов
	пиразин-амида	цистина	глюкозы	мальтозы	сахара - розы	крахмала	мочевины	
<i>C. accolens</i>	В	-	+	-	В	НД	-	+
<i>C. afermentans</i>	+	-	-	-	-	НД	-	-
<i>C. amycolatum</i>	+	-	+	В	В	НД	В	В
<i>C. argentoratense</i>	+	-	+	-	-	НД	-	-
<i>C. aurimucosum</i>	+	-	+	+	+	НД	-	-
<i>C. auris</i>	+	-	-	-	-	НД	-	-
<i>C. bovis</i>	-	-	+	-	-	-	В	-
<i>C. confusum</i>	+	-	(+)	-	-	НД	-	+
<i>C. coyleae</i>	+	-	(+)	-	-	-	-	-
CDC group F-1	+	-	+	+	+	-	+	В
CDC group G	+	-	+	В	В	-	-	В
<i>C. diphtheriae gravis</i>	-	+	+	+	-	+	-	+
<i>C. diphtheriae intermedius</i>	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>C. diphtheriae mitis</i>	-	+	+	+	-	-	-	+
<i>C. diphtheriae belfanti</i>	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>C. durum</i>	+	-	+	+	+	НД	В	+
<i>C. falsenii</i>	(+)	-	(+)	В	-	НД	(+)	-
<i>C. freneyi</i>	+	-	+	+	+	НД	-	В
<i>C. glucuronolyticum</i>	+	-	+	В	+	НД	В	В
<i>C. imitans</i>	(+)	-	+	+	(+)	НД	-	В
<i>C. jeikeium</i>	+	-	+	В	-	-	-	-
<i>C. kroppenstedtii</i>	+	-	+	В	+	НД	-	-
<i>C. lipophiloflavum</i>	+	-	-	-	-	НД	-	-
<i>C. macginleyi</i>	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>C. matruchotii</i>	+	-	+	+	+	НД	-	+
<i>C. minutissimum</i>	+	-	+	+	В	НД	-	-
<i>C. mucifaciens</i>	+	-	+	-	В	НД	-	-

<i>C. "nigricans"</i>	B	-	+	+	(+)	НД	-	-
<i>C. propinquum</i>	B	-	-	-	-	НД	-	+
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>C. pseudotuberculosis</i>	-	+	+	+	-	-	+	B
<i>C. riegelii</i>	B	-	-	(+)	-	НД	+	-
<i>C. sanguinis</i>	+	-	(+)	-	-	НД	-	-
<i>C. singulare</i>	+	-	+	+	+	НД	+	-
<i>C. simulans</i>	B	-	+	-	+	НД	-	+
<i>C. striatum</i>	+	-	+	B	B	-	-	+
<i>C. sundsvallense</i>	B	-	+	+	+	НД	+	-
<i>C. thomssenii</i>	+	-	+	+	+	НД	+	-
<i>C. ulcerans</i>	-	+	+	+	-	+	+	-
<i>C. urealyticum</i>	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. xerosis</i>	+	-	+	+	+	-	-	+

Примечание: НД – нет данных; слабая или отложенная положительная реакция; В – реакция, переменная у разных штаммов. (Funke G & Bernard K.A., 2003 in Manual of Clinical Microbiology, edition 8.

Приложение 22
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Дифференциация родов семейства Enterobacteriaceae по биохимическим свойствам

Тест или субстрат		Escherichia	Shigella	Salmonella	Citrobacter	Klebsiella	Enterobacter	Hafnia	Serratia	Proteus	Yersinia	Edwardsiella	Erwinia	
1		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	
Комбинированная среда	Сероводород	-	-	+,-	+,-	-	-	-	-	+,-	-	+	-, +	
	Лактоза	+,-	-	-,+	x	+	+	-,+	-,+	-	-	-	x	
	Глюкоза (газ)	+,-	-	+,-	+	+	+	+,-	-,+	+,-	-	+	-	
	Мочевина	-	-	-	x	-	(+), -	-	x	+,-	(+), (+)	-	-	
Минимальный дифференцирующий ряд	Мочевина (по Преусу/Кристенсену)	-	-	-	x	(+), +	(+), -	-	x	+,-	+	-	-	
	Подвижность	+,-	-	+,-	+	-	+	x	+	+,-	-	+	+	
	Индол	+,-	-,+	-	-,+	-,+	-	-	-	+,-	x	+	-	
	Фенилаланиндезаминаза	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	x	
	Цитрат Симонса	-	-	+,-	+	+	+	x	+	x	-	-	+	
	Ацетат натрия	+, (+)	-	x	x	+	+	-, (+)	x	x	x	x	x	
	Лизиндекарбоксилаза	+,-	-	+,-	-	+	-,+	+	+	-	-	+	-	
	Орнитиндекарбоксилаза	x	-, +	+	x	-	+	+	+	-,+	x	+	-	
	Среда Кларка	реакция с метиловым красным	+	+	+	+	-,+	-	+	x	+	+	+	-
		реакция Фогеса-Проскауэра	-	-	-	-	+,-	-	+	x	+	+	+	-
	Сорбит	x	x	+	+	+	+	-	+	-,+	x	-	x	

Примечание: «+» - положительная реакция; «-» - отрицательная реакция; «+,(+)» - чаще положительная, реже замедленно положительная реакция; «-,(+)» - чаще отрицательная, реже замедленно положительная реакция; «-,+» - чаще отрицательная, реже положительная реакция; «+,-» - чаще положительная, реже отрицательная реакция; «(+),+» - чаще замедленно положительная, реже положительная реакция; «(+),-» - чаще замедленно положительная, реже отрицательная реакция; «x» - различные результаты реакции.

Приложение 23
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Расширенная характеристика биохимических свойств
родовых групп Enterobacteriaceae

Тест или субстрат	Escherichia	Shigella	Salmonella	Citrobacter	Edwardsiella	Klebsiella	Enterobacter	Hafnia	Serratia	Proteus	Yersinia	Erwinia
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Цитрат Симонса	-	-	+,-	+	-	+	+	x ¹ , + ²	+	x	-	+
Мочевина	-	-	-	x	-	(+), +	(+), -	-	x	+,-	+	-
Малонат натрия	-	-	-,+	-,+	-	+	+,-	x	-	-	-	x
Фенилаланиндезаминаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	x
Сероводород	-	-	+,-	+,-	+	-	-	-	-	+,-	-	+
Подвижность	+,-	-	+,-	+	+	-	+	x ¹ , + ²	+	+,-	- ¹ , + ²	+,-
Индол	+,-	-,+	-	-,+	+	-,+	-	-	-	+,-	-	-
Реакция с метиловым красным	+	+	+	+	+	-,+	-	+ ¹ , - ²	+ ¹	+	+	-
реакция Фогеса-Проскауэра	-	-	-	-	-	+,-	+	x ¹ , + ²	x ¹	-	-	x
Лизиндекарбоксилаза	+,-	-	+,-	-	+	+	-,+	+	+	-	-	-
Аргининдигидролаза	x	-,+	(+), +	x	-	-	+,-	-	-	-	-	-
Орнитиндекарбоксилаза	x	-,+	-	x	+	-	+	+	+	-,+	x	-
Глютаминовая кислота	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Желатин	-	-	-, (+)	-	-	-	-, (+)	-	+	x	-	+
KCN	-	-	-, (+)	+	-	+	+	+	+	+	-	x
Ацетат натрия	+, (+)	-	x	x	x	+	+	-, (+)	x	x	x	x
Цитрат Кристенсена	x	-	+	+	+	+	+	+	+	x	.	.
Целлобиоза	-	-	x	x	-	+	+	x	x	x	+	x
Газообразование из глюкозы	+,-	-,+	+,-	+	+	+	+	x	x	x	-	-
Адонит	-,+	-	-	-	-	+	x	-	x	-,+	x	-
Арабиноза	x	x	+	+	-	+	+	+	-	-	x	+
Глицерин	+	x	+	+	.	+	-,+	+	+	+	.	x
Дульцит	x	x	+,-	x	-	-,+	x	-	-	-	-	-
Инозит	-,+	-	x	-,+	-	+	-,+	-	x	-,+	x	.
Ксилоза	x	x	x	+	.	+	+	+	x	+,-	x	x

Лактоза	x	-, (+)	-,+	x	-	+	+	x	-,+	-	-	x
Мальтоза	x	x	+	+	.	+	+	+	+	+, -	+	+
Маннит	+	+, -	+	+	-	+	+	+	+	-, +	+	+
Рамноза	x	x	x	+	-	+	+	+	-	x	+, -	+
Раффиноза	x	x	-, +	x	-	+	+	-	-	-	-	
Салицин	x	-	-	x	-	+	x	x	+	x	+, -	x
Сахароза	x	-	-	+	-	+	+	x	+	x	-, +	x
Сорбит	x	x	+	+	-	+	+	-	+	-, +	x	x

Примечание: Приведены свойства, характерные для *K.pneumoniae*, *Erwinia herbicola*, рода *Yersinia* за исключением *Y.pestis*.

«»- не изучено; «+»- положительная реакция; «-»- отрицательная реакция; «+, (+)» - чаще положительная, реже замедленно положительная реакция; «-, (+)» - чаще отрицательная, реже замедленно положительная реакция; «-, +»- чаще отрицательная, реже положительная реакция; «+, -»- чаще положительная, реже отрицательная реакция; «(+), +»- чаще замедленно положительная, реже положительная реакция; «(+), -»- чаще замедленно положительная, реже отрицательная реакция; «x»- различные результаты реакции;

1 - инкубация при 37⁰С, 2 - инкубация при 22⁰С.

Приложение 24
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Основные дифференцирующие признаки
флюоресцирующих псевдомонад (*Pseudomonas*)

Тест или субстрат	Вид		
	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Ps. fluorescens</i>	<i>Ps. putida</i>
Цитохромоксидаза	+	+	+
Пигмент пиоцианин	+	-	-
Флуоресценция	+	+	+
Глюкоза	+	+	+
Рост на ацетамидном агаре	+	-	+
Рост при 5 ⁰ С	-	+	-
Рост при 42 ⁰ С	+	-	-
Желатиназа	+	+	-

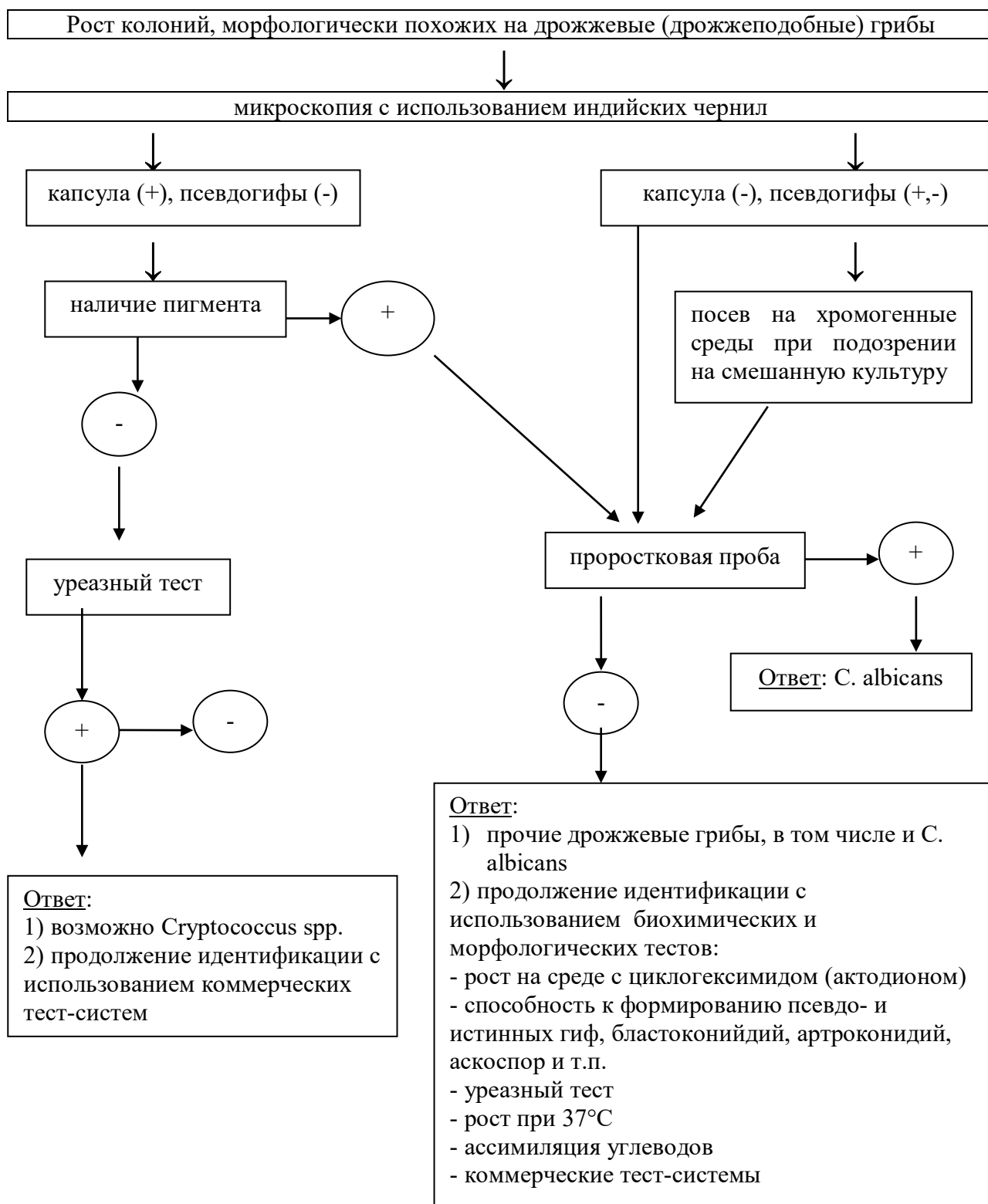
Приложение 25
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Основные характеристики, используемые для дифференциации
L. monocytogenes от других видов листерий

Признак	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivano-vii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
Ферментация маннита	-	-	-	-	-	+
Ферментация ксилозы	-	+	+	-	+	-
Ферментация рамнозы	+	-	-	+/-	+/-	+/-
Бета-гемолиз	+	+	+	-	-	-
САМР-тест – усиление гемолиза около штриха:						
<i>Rhodococcus equi</i>	-/+	+	-	-	-	-/+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-	-	-
Гидролиз лецитина без угля	-	+	-	-	-	-
Гидролиз лецитина с углем	+	+	-	-	-	-
Патогенность для человека	Высокая		Низкая		Отсутствует	

Приложение 26
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Схема микробиологической диагностики
дрожжевых и дрожжеподобных грибов



Приложение 27
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Основные морфологические и биохимические характеристики для дрожжевых и дрожжеподобных грибов

Микроорганизмы родов	Морфологические колоний особенности на рисовом агаре при 25°C				Наличие капсулы	Уреазный тест	рост при 25°C в присутствии циклогексимида	рост при 37°C
	псевдогифы	Истинные гифы	бластоконидии вдоль гифы	артроконидии				
Candida	+	некоторые	+	0	0	0 ^V	V	+
Torulopsis	0	0	-	0	0	0	0	+
Rhodoturola	0 ^R	0	-	0	V	+	0 ^V	+ ^V
Cryptococcus	0 ^R	0	-	0	+	+	0	V
Saccharomyces	V	0	-	0	0	0	0	+
Geotrihum	0	+	0	+	0	0	0	ПЛОХО
Trichosporon	+	+	+	+	0	+ ^V	+ ^V	+ ^V

Примечание:

+ - позитивный признак

0 - негативный признак

V - виды или штаммы вариабельны

R – редко, у некоторых рудиментарные формы

Приложение 28
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

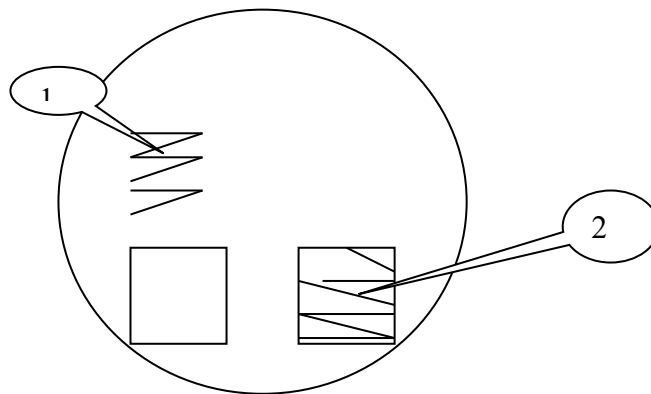
Основные морфологические и биохимические характеристики грибов рода *Candida*, наиболее часто встречающихся в клинической практике

Организм	Морфологические свойства колоний на рисовом агаре при 25°C в течение 24-48 часов	Рост в бульоне Сабу-ро при 25-30°C до 5 дней	рост при 25°C с цик-проростковая проба	уреазный тест	ферментация					
					глюкоза	мальтоза	сахароза	лактоза	трегалоза	
<i>C. albicans</i>	псевдогифы с терминальными хламидиоспорами; кластеры бластоконидий на септе	не образуют пленку на поверхности	+	+	0	+	+	0	0	+ ^v
<i>C. tropicalis</i>	бластоконидии вдоль псевдогифы	скудный пленочный рост с пузырьками	0	0	0	+	+	+ ^v	0	+ ^v
<i>C. parapsilosis</i>	бластоконидии вдоль закруглений псевдогифы; многократные разветвления с искривлением псевдогиф	не образуют пленку на поверхности	0	0	0	+	0	0	0	0
<i>C. lusitaniae</i>	короткие цепочки с удлинёнными бластоконидиями вдоль закруглений псевдогифы	не образуют пленку на поверхности	0	0	0	+	0	V	0	V
<i>C. guilliermondii</i>	довольно короткие, мелкие псевдогифы; кластеры бластоконидий на септе	не образуют пленку на поверхности	+	0	0	+	0	+ _w	0	+ _w
<i>C. krusei</i>	псевдогифы с многократно ветвящимися удлинёнными бластоконидиями	хороший поверхностный рост на поверхности бульона	0	0	+ ^v	+	0	0	0	0

Примечание: + - позитивный; 0- негативный; V – виды или культуры вариабельны; R – редко в виде рудиментарных форм; W- реакция может быть слабо выражена

Приложение 29
к Инструкции
«Микробиологические
методы исследования
биологического материала»

Схема посева культур дрожжевых грибов
для оценки морфологических особенностей



ОГЛАВЛЕНИЕ

Инструкция «Микробиологические методы исследования биологического материала»

	стр.
Раздел I	
Общие положения	
Глава 1	2
Глава 2	2
Раздел II	
Методы исследования биологического материала	
Глава 3	3
Глава 4	6
Глава 5	8
Глава 6	10
Глава 7	11
Глава 8	14
Глава 9	18
Глава 10	22
Глава 11	24
Глава 12	26
Глава 13	28
Глава 14	30
Глава 15	34
Раздел III	
Методы идентификации микроорганизмов	
Глава 16	35
Глава 17	40
Глава 18	47
Глава 19	49
Глава 20	51
Глава 21	57
Глава 22	62
Глава 23	66
Глава 24	69
Глава 25	73
Раздел IV	
Общие методы исследования	
Глава 26	75
Глава 27	78
Глава 28	86

Приложение 1	Схема посева ликвора	90
Приложение 2	Схема посева материала полуколичественным методом	91
Приложение 3	Схема посева мочи методом секторных посевов	92
Приложение 4	Определение степени бактериурии по количеству выделенных колоний	93
Приложение 5	Схема посева мочи альтернативным методом	94
Приложение 6	Определение степени бактериурии	95
Приложение 7	Схема посева материала, собранного с помощью микробиологического тампона	96
Приложение 8	Основные возбудители при разных нозологических формах инфекций нижних дыхательных путей	97
Приложение 9	Критерии оценки качества материала собранного из нижних отделов дыхательного тракта	98
Приложение 10	Взятие, транспортировка и хранение клинического материала при инфекциях урогенитального тракта	99
Приложение 11	Дифференциация стафилококков и микрококков	101
Приложение 12	Биохимическая идентификация рода <i>Staphylococcus</i>	102
Приложение 13	Схема идентификации <i>S. aureus</i>	103
Приложение 14	Дифференциальные признаки <i>S. epidermidis</i> и <i>S. saprophyticus</i> ..	104
Приложение 15	Результаты гидролиза гиппурата натрия у референс-штаммов ..	105
Приложение 16	Основные биологические свойства стрептококков	106
Приложение 17	Инфекционные болезни, вызываемые <i>H. influenzae</i>	107
Приложение 18	Дифференциально-диагностические свойства видов рода <i>Haemophilus</i>	108
Приложение 19	Биотипирование <i>H. influenzae</i>	109
Приложение 20	Основные дифференцирующие признаки <i>H. influenzae</i> от некоторых других микробов, возбудителей бактериальных инфекций человека одной локализации	110
Приложение 21	Биохимические свойства микробов рода <i>Corynebacterium</i>	111
Приложение 22	Дифференциация родов семейства <i>Enterobacteriaceae</i> по биохимическим свойствам	113
Приложение 23	Расширенная характеристика биохимических свойств родовых групп <i>Enterobacteriaceae</i>	114
Приложение 24	Основные дифференцирующие признаки флуоресцирующих псевдомонад (<i>Pseudomonas</i>)	116
Приложение 25	Основные характеристики, используемые для дифференциации <i>L. monocytogenes</i> от других видов листерий	117
Приложение 26	Схема микробиологической диагностики дрожжевых и дрожжеподобных грибов	118
Приложение 27	Основные морфологические и биохимические характеристики для дрожжевых и дрожжеподобных грибов	119
Приложение 28	Основные морфологические и биохимические характеристики грибов рода <i>Candida</i> , наиболее часто встречающихся в клинической практике	120
Приложение 29	Схема посева культур дрожжевых грибов для оценки морфологических особенностей	121