

**ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ
ДИАГНОСТИКЕ АНАЭРОБНОЙ ИНФЕКЦИИ**

Практические рекомендации ассоциации ФЛМ

Москва

•2021

«Практические рекомендации по лабораторной диагностике анаэробной инфекции».
Федерация лабораторной медицины, Москва 2021

РАЗРАБОТАНЫ:

Федеральным государственным бюджетным учреждением «Государственный Научный Центр колопроктологии им А.Н. Рыжих» Министерства здравоохранения Российской Федерации (М.А. Сухина, Ю.А. Шелыгин);

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью Минздрава России (С.М. Юдин, А.В. Загайнова, В.В. Макаров);

Федеральным государственным бюджетным учреждением «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (И.С. Тартаковский).

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

В.Г. Жуховицкий (Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

С.В. Жилина (ЦКДЛ ГБУЗ «Морозовская ДГКБ ДЗМ»).

Практические рекомендации могут быть использованы для микробиологической диагностики анаэробных инфекций в микробиологических лабораториях лечебно-профилактических учреждений, а также в лабораториях научно-исследовательских институтов клинического и научного профиля.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	5
1.1. Этиология	7
Грамположительные облигатно анаэробные бактерии	8
Спорообразующие облигатно анаэробные грамположительные бактерии.....	8
<i>Clostridioides difficile</i>	10
Грамположительные неспорообразующие облигатно-анаэробные микроорганизмы	10
Грамнегативные облигатно анаэробные бактерии	12
Эпидемиология	13
2. СПИСОК ИСПОЛЪЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	15
3. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ И ОБОСНОВАНИЕ НЕОБХОДИМОСТИ ВНЕДРЕНИЯ ДАННОГО МЕТОДА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ	15
4. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ, ОРГАНИЗАЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ; ОБЕСПЕЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ.....	17
4.1. Требования к специалистам и вспомогательному персоналу.....	17
4.2. Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала.....	18
4.3. Требование к материально-техническому обеспечению выполнения исследований.....	18
5. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ, ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	19
5.1. Необходимые расходные материалы, реагенты и оборудование.	19
5.1.1. Необходимое оборудование и расходные материалы	19
5.1.2. Питательные среды.....	22
Основа кровяного агара	23
Основа колумбийского агара	23
Среда тиогликолевая жидкая	24
Агар Шадлера.....	24
Агар для выделения <i>Clostridioides difficile</i>	24
Агар анаэробный	25
Агар TSN	25
Желчно-эскулиновый агар для бактероидов.....	25
Агар для клостридий усиленный	26
Агар для бифидобактерий	26
Среда Вилкинса-Чалгрена (<i>Wilkins Chalgren Medium</i>).....	27
5.2. Сбор, хранение и доставка образцов биологического материала.....	29
5.3. Биоматериал для проведения исследования при подозрении на анаэробную инфекцию	31
5.4. Транспортные среды, используемые для сбора и доставки биоматериала при подозрении на анаэробную инфекцию	33

5.5. Транспортировка биологического материала	34
5.6. Маркировка материала для лабораторного исследования	35
5.7. Оценка пригодности образцов.....	35
5.8. Пробоподготовка и первичный посев	36
5.9. Сроки инкубации облигатно анаэробных бактерий	39
5.10. Выделение на искусственных питательных средах	39
5.11. Идентификация облигатно анаэробных бактерий на основе морфологических и биохимических свойств.....	41
5.12. Идентификация облигатно анаэробных микроорганизмов, с применением молекулярно-генетических методов.....	52
5.13. Изучение чувствительности облигатно анаэробных микроорганизмов к антибактериальным препаратам.....	57
6. ИССЛЕДОВАНИЕ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ОТСУТСТВИИ БЕСКИСЛОРОДНЫХ ГАЗОВ	60
7. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	62
7.2. Внутрелабораторный контроль качества исследования	63
7.3. Внешняя оценка качества исследования.....	65
ПРИЛОЖЕНИЯ	67
Приложение 1. ____ Таблицы с числовыми значениями пограничных критериев определения чувствительности.....	67
Приложение 2. ____ Материально-техническое оснащение, необходимое для выполнения исследования	71
Приложение 3. Идентификация облигатно анаэробных микроорганизмов	73
Приложение 4. Окраска мазков по Граму в модификации Копелова	81
Приложение 5. Проведение масс-спектрометрической идентификации облигатно анаэробных микроорганизмов	82
Приложение 6. Проведение прямого выявления <i>Clostridioides difficile</i> в просветных фекалиях с применением картриджа Xpert CD.....	86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	87

1. ВВЕДЕНИЕ

Анаэробные микроорганизмы составляют абсолютное большинство нормальной микробиоты человеческого тела. Кожа заселена анаэробами в десятки раз больше, чем аэробами. Главное место обитания анаэробов - пищеварительный тракт, где нет стерильных отделов. Микрофлора ротовой полости на 99% состоит из анаэробов, что близко к микробиоте толстой кишки. Толстая кишка — это основное место обитания облигатно анаэробных микроорганизмов вследствие отсутствия кислорода и очень низкого окислительно-восстановительного потенциала -250 мВ/. Современные достижения теоретической и клинической медицины значительно расширили наши знания об инфекционном процессе, в частности об анаэробной инфекции. Практически нет такого органа или анатомической области, где бы анаэробы не могли вызвать инфекционный процесс. Подобные потенциальные возможности облигатно анаэробных микроорганизмов объясняются тем, что они являются обычными представителями нормальной микробиоты слизистых кишечника, дыхательных и половых путей, ротовой полости и кожи. Поэтому инфекционный процесс при анаэробной инфекции является следствием патогенного действия не только клостридий, как было принято считать ранее, но и большой группы неспорообразующих бактерий (бактероидов, пептококков, пептострептококков, вейлонелл, фузо-бифидо-пропионибактерий, зубактерий, актиномицетов). Гнойно-воспалительные заболевания продолжают оставаться одной из актуальных проблем современной медицины. Только в структуре хирургической патологии на их долю приходится 30-80% случаев. Этиологическим фактором этих заболеваний являются не только стафилококки, стрептококки, грамотрицательные бактерии, но и облигатно анаэробные бактерии. Микрофлора патологического очага часто отражает видовой состав ее на

прилежащих слизистых оболочках. Возможные этиологические вариации анаэробного инфекционного процесса могут быть практически безграничны. Например, только в толстой кишке обитает более 500 видов микроорганизмов, принадлежащих к различным таксономическим группам. Вследствие различных причин (длительного применения иммунодепрессантов, антибактериальных препаратов, травмы, хирургического вмешательства) облигатные анаэробы попадают в кровяное русло, брюшную и другие закрытые полости, различные органы и ткани и становятся причиной тяжелых воспалительных процессов, сопровождающихся высокой смертностью, особенно при анаэробной бактериемии. Анаэробные микроорганизмы становятся причиной нозокомиальных инфекций (*Clostridioides difficile*).

Микробиологическая диагностика таких инфекций с учетом выделения облигатно анаэробных микроорганизмов в большинстве лечебных учреждений затруднена из-за отсутствия методических подходов к работе с анаэробными бактериями, недостаточной информацией о целевых питательных средах и анаэробной техники.

Это приводит к ошибкам в этиологической диагностике гнойно-воспалительных инфекций, что порождает большую группу нерегистрируемых инфекций и сказывается на качестве лечения больных, составляет проблему госпитальных инфекций. Поэтому, вопросы разработки и внедрения в практику доступных методов выделения строгих анаэробов, применение универсальных научно обоснованных схем микробиологического исследования с использованием соответствующих питательных сред и оборудования, направленных на выделение аэробных, факультативно-анаэробных и анаэробных возбудителей, является актуальной для практического здравоохранения.

Лабораторная диагностика анаэробной инфекции до настоящего времени не нашла должного отражения в нормативно-методических документах. Из современных рекомендаций существуют лишь «Клинические рекомендации национальной ассоциации специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и общероссийской общественной некоммерческой организации «Ассоциация колопроктологов России» по диагностике, лечению и профилактике *Clostridium difficile*-ассоциированной диареи (CDI)» [1].

Было принято решение о создании практических рекомендаций по диагностике анаэробной инфекции. В настоящих практических рекомендациях определен порядок проведения микробиологического исследования биологического материала при подозрении на анаэробную инфекцию. Практические рекомендации включают такие разделы, как культивирование, идентификацию, определение чувствительности к антибактериальным препаратам исследуемых облигатно анаэробных микроорганизмов. Приведено описание питательных сред для культивирования облигатных анаэробов, необходимого оборудования для создания бескислородной атмосферы.

1.1. Этиология

Под термином "анаэробы" подразумевают микроорганизмы, которые обладают бескислородным типом дыхания и чувствительны к токсическому действию молекулярного кислорода. Характерной особенностью метаболизма анаэробов является продукция летучих жирных кислот: пропионовой, изомасляной, масляной, изовалериановой, валериановой и/или капроновой. Аэробные бактерии летучих жирных кислот не продуцируют.

Первой анаэробной бактерией, открытой Луи Пастером в 1861 году, была *Clostridium butyricum* — спороносная палочка, вызывающая маслянокислое брожение углеводов. Анаэробы встречаются среди почти всех известных крупных систематических групп спорообразующих и неспорообразующих форм. Важным фактором для существования анаэробов является бескислородная атмосфера и наличие факторов роста. Аэробы покровительствуют анаэробам, они способствуют созданию бескислородной среды. облигатно анаэробные микроорганизмы обладают различными факторами патогенности. Гепариназа анаэробов способствует возникновению тромбофлебитов. Капсула анаэробов резко увеличивает их вирулентность и даже выводит на 1-е место в анаэробно-аэробных ассоциациях. По разным литературным данным, на долю анаэробных бактериемий приходится от 0,3% до 11% эпизодов выделения из гемокультуры облигатно анаэробных микроорганизмов.

Грампозитивные облигатно анаэробные бактерии

Эта группа анаэробных бактерий включает виды, далёкие друг от друга в систематическом отношении, но такое объединение широко используют в медицинской бактериологии для облегчения решения практических задач. Большинство видов прихотливо и растёт только на сложных питательных средах. Основной и быстро выявляемый дифференцирующий признак внутри анаэробных грамположительных бактерий — морфология бактериальных клеток. В соответствии с этим выделяют бактерии правильной (клостридии) и неправильной (актиномицеты и бифидобактерии) формы.

Спорообразующие облигатно анаэробные грампозитивные бактерии

Представлены классом *Clostridia* относятся к типу *Firmicutes*, порядку *Clostridiales*, включает роды *Clostridium*, *Caldicoprobacteraceae*, *Clostridiisalibacter*, *Hathewayia*, *Hungatella*, *Sporosalibacterium* и другие [2]. Наиболее многочисленный род, вызывающий гнойно-воспалительные заболевания — это род *Clostridium*. Представители которого образуют подвижные и (реже) неподвижные палочки. Отличительная особенность клостридий способность образовывать овальные или круглые эндоспоры. Споры могут располагаться центрально, субтерминально или терминально. Наиболее характерные признаки клостридии — способность вызывать масляно-кислое брожение и анаэробный распад углеводов с образованием масляной кислоты и газов (CO₂, водород, иногда метан). Токсины, вырабатываемые представителями рода *Clostridium*, относятся к наиболее опасным из известных. Примерами являются столбнячный токсин (тетаноспазмин), продуцируемый *C. tetani*, ботулинический токсин, продуцируемый *C. botulinum*. Окрашиваются по Граму положительно, при старении культуры переходят в грамтрицательные формы. Растут на многих органических средах. Ферментируют углеводы с образованием многоатомных спиртов, кислот, газов, аминокислот, пуриновых оснований и других соединений. Некоторые виды фиксируют молекулярный азот воздуха.

Clostridium sporogenes — палочки, обильно образующие споры. Споры овальные, субтерминальные. Колонии на твердых средах 2—6 мм в диаметре с приподнятым желтоватым центром, с изрезанными краями («голова медузы»). Продуцирует большое количество масляной, изомаляной, изовалериановой кислот и пропиловый, изобутиловый и изоамиловый спирты. Переваривает молоко. По своим культуральным, биохимическим и антигенным свойствам сходен с *Clostridium botulinum* типов А и В, но не продуцирует токсин.

Clostridioides difficile

Clostridium difficile-ассоциированная инфекция — заболевание, развивающееся при нарушении кишечного микробиома с избыточной колонизацией *Clostridioides difficile*, токсины которой вызывают воспаление и повреждение толстой кишки [3, 4, 5, 6]. Заселение кишечника и пролиферация токсигенных штаммов *Clostridioides difficile* обуславливает развитие инфекции, одной из основных причин нозокомиальной диареи. Ведущими факторами патогенности *C. difficile* являются экзотоксины А, В и бинарный токсин. Токсин А – энтеротоксин, действующий на энтероциты кишечника и вызывающий секрецию ими жидкости, воспаление и некроз слизистой оболочки. Токсин В – цитотоксин, блокирующий биосинтез белка на рибосомах энтероцитов и приводящий их к гибели [7, 8, 9]. Бинарный токсин *C. difficile* риботипа NAP1/BI/027 образует на мембране энтероцита комплекс, который проникает в цитоплазму, нарушает функционирование клетки посредством дезорганизации цитоскелета и ведёт к её гибели [10]. Бинарный токсин усиливает адгезию и колонизацию *C. difficile* [11, 12]. Учитывая высокое медико-социальное значение заболевания, был разработан алгоритм лабораторной диагностики CDI для быстрой индикации патогена и определения его чувствительности к антибактериальным препаратам [1].

Грампозитивные неспорообразующие облигатно-анаэробные микроорганизмы

К грамотрицательным неспорообразующим анаэробным бактериям относятся представители не менее 33 родов из 16 семейств. Наиболее важными в клиническом отношении являются следующие семейства и их роды: *Bacteroidaceae* (род *Bacteroides* и *Parabacteroides*), *Fusobacteriaceae* (род *Fusobacterium*, *Leptotrichia* и др.), *Porphyromonadaceae* (род

Porphyromonas, *Tannerella*), *Prevotellaceae* (род *Prevotella*), *Desulphovibrionaceae* (род *Bilophila*, *Desulphovibrio*). Данные микроорганизмы обычно представляют собой полиморфные палочки средних размеров, иногда коккобактерии, располагаются поодиночке или попарно, грамотрицательные, неспорообразующие. Включают как подвижные, так и неподвижные формы. Обладают многочисленными фимбриями.

Род *Bifidobacterium* — грамположительные полиморфные палочки, обычно слегка изогнутые или ветвящиеся (часто в форме латинских букв «Y», «X»), нередко с утолщениями на концах. Неподвижны, спор не образуют.

Род *Propionibacterium* — полиморфные неправильной формы палочки, встречаются кокковидные и слегка ветвящиеся формы. Располагаются одиночно, короткими цепочками или небольшими скоплениями, неподвижны, могут проявлять аэротолерантные свойства.

Род *Peptostreptococcus* — грамположительные кокки, располагающиеся парами или цепочками. Неподвижны. Плохо ферментируют углеводы. Растут на сложных питательных средах с добавлением крови.

Род *Peptococcus* — грамположительные кокки, располагающиеся парами, тетрадами, в виде неправильных скоплений или короткими цепочками. Неподвижны. Требовательны к питательным средам, лучше растут в присутствии жирных кислот. Обладают слабой сахаролитической активностью, расщепляют пептоны и аминокислоты.

Род *Leptotrichia* — имеют вид длинных нитей разной толщины с заостренными или вздутыми концами, дают густые сплетения, могут располагаться попарно в виде зернистых палочек, неподвижны, спор и капсул не образуют. Ферментируют глюкозу с образованием большого количества молочной кислоты.

Род *Actinomyces* — палочковидные или нитевидные ветвящиеся бактерии. При делении путем фрагментации могут образовывать тонкие прямые, слегка изогнутые палочки, часто с утолщениями на концах, располагаясь одиночно, парами, в виде букв «V, Y», или скоплений, напоминающих палисадник. Неподвижны.

Грамотрицательные облигатно анаэробные бактерии

Грамотрицательные неспорообразующие анаэробы являются весьма многочисленной группой бактерий. Аэротолерантность определяется присутствием у части бактерий индуцибельных супероксиддисмутаза и каталаза. Продукты ферментации углеводов у грамотрицательных анаэробов включают сукцинат (бактероиды и др.), бутират (фузобактерии, превотеллы), лактат (лептотрихии), ацетат, пропионат и т.д., что используется при газожидкостной хроматографии для быстрого обнаружения этих бактерий. Обладают протеолитической активностью, гидролизуют пептон. Антигенная структура переменчива, зависит от строения липополисахарида (ЛПС) клеточной стенки, наличия жгутиков, капсулы. Наличие фимбрий и других адгезинов обеспечивает прикрепление бактерий к клеткам, капсула предохраняет от фагоцитоза, липополисахариды клеточной стенки активируют воспалительные процессы. Многие представители устойчивы к антибиотикам.

Род *Bacteroides* — палочковидные плеоморфные бактерии, значительно варьирующие по размерам. Большинство неподвижны. Могут образовывать капсулы. Устойчивы к желчи и к пенициллину, что используется при дифференцировке их от других анаэробов, сбраживают большинство углеводов и биохимически активны. Резистентны к аминогликозидам, наличие β -лактамаз обеспечивает устойчивость к пенициллину, возрастает процент штаммов резистентных к тетрациклинам.

Продуцируют гепариназу, которая принимает участие в патологической активации внутрисосудистого свертывания. Содержат соматический O-антиген, могут иметь H- и K-антигены.

Род *Porphyromonas* — короткие палочковидные бактерии. Неподвижны. На кровяном агаре образуют темнопигментированные колонии. Для роста нуждаются в гемине и менадионе. Биохимическая активность очень низкая. Инертны по отношению к углеводам. Все виды образуют индол.

Род *Prevotella* — полиморфные палочки. Неподвижны. Многие штаммы образуют темный пигмент. Ряд штаммов обладает гемолитической активностью. На кровяном агаре образуют светло-коричневые/черные колонии. Проявляют умеренную сахаролитическую активность. Основные продукты ферментации углеводов — сукцинаты и ацетаты. Основной фактор патогенности — эндотоксин, фосфолипаза А, нарушающая целостность мембран эпителиальных клеток.

Род *Fusobacterium* — плеоморфные бактерии. Имеют форму тонких веретенообразных палочек или полиморфных палочек различной длины с заостренными концами, неподвижны. На анаэробном кровяном агаре образуют мелкие выпуклые желтоватые колонии, окруженные зоной агемолиза. На жидких средах образуют осадок. Биохимическая активность: утилизируют пептон и углеводы, ферментативная активность низкая.

Род *Veillonella* — кокковидные бактерии, располагающиеся парами или реже по одиночке, иногда небольшими скоплениями. Неподвижны. Спор не образуют. Плохо растут на питательных средах, но их рост заметно улучшается при добавлении лактата, являющегося для них источником энергии. Они хорошо разлагают низкомолекулярные продукты обмена углеводов — лактат, пируват, ацетат — до CO₂ и H₂.

Эпидемиология

Анаэробная инфекция мягких тканей – своеобразный патологический

процесс полимикробного характера, вызываемый анаэробными возбудителями. Чаще всего анаэробная инфекция мягких тканей является грозным осложнением раневого процесса. В отличие от воспалительного процесса, вызываемого аэробными микроорганизмами, при анаэробной инфекции признаки воспалительной реакции отсутствуют, а на первое место выступают прогрессирующее омертвление тканей, отек и газообразование, сопровождающиеся выраженным отравлением организма продуктами жизнедеятельности анаэробов – специфическими токсинами и продуктами тканевого распада. Около 80% хирургических инфекций являются смешанными анаэробно-аэробными. Представители аэробной флоры потребляют кислород, чем создают наиболее благоприятные условия для развития анаэробов. Наиболее часто анаэробный компонент в них составляют неспорообразующие анаэробы. Успех лабораторной техники позволил Моое уже в 1969 г. сообщить, что неспорообразующие анаэробы обнаружены при бактериологическом исследовании материала в 85% случаев. Анаэробным бактериям свойственна способность выделять некротический гемотоксин, вызывающий некроз соединительной ткани и мышц. Другим важным свойством гемотоксина является его способность вызывать гемолиз, тромбоз сосудов, поражать клетки миокарда, печени и почек. Для всех анаэробов в той или иной степени характерно газообразование и образование отека. Так, *C. perfringens* вызывает развитие патологического процесса с образованием большого количества газа. Для *C. oedematieus* характерна способность вызывать большой отек тканей, это же свойство присуще и *C. septicum*. В настоящее время выдвинуто и детально изучено положение о том, что в этиологии и в патогенезе анаэробной инфекции мягких тканей важную роль играет ассоциация анаэробов с аэробами. От развития и взаимоотношения указанных микроорганизмов и от состояния макроорганизма зависит

характер дальнейшего течения патологического процесса, т.е. будут ли развиваться совместно обе группы бактерий, или только аэробная, или развитие инфекции не наступит, и рана заживет без осложнений.

2. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ВБ – Среда Вильсон-Блер используется для определения клостридий

БИФ – Бифидум агар используется для выделения бифидобактерий (*Bifidobacteriaceae*);

СР – *Clostridium perfringens* – агар, используется для выделения *Clostridium perfringens*;

CD – *Clostridioides difficile* – агар, используется для выделения *Clostridioides difficile*;

Бак – Бактероидный агар, используется для выделения бактериоидов;

АН – Анаэробный агар, используется для выделения анаэробов;

CDI - *Clostridioides difficile* -ассоциированная инфекция

АМП - Антимикробный препарат

3. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ И ОБОСНОВАНИЕ НЕОБХОДИМОСТИ ВНЕДРЕНИЯ ДАННОГО МЕТОДА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Предназначены для специалистов лабораторий, осуществляющих диагностические, мониторинговые и научные исследования с микроорганизмами III-IV групп патогенности.

Устанавливают единые требования к методам:

- ✓ Взятия материала для исследования при подозрении на анаэробную инфекцию.
- ✓ Выделения облигатно анаэробных микроорганизмов.
- ✓ Изучения резистентности анаэробных микроорганизмов к антибактериальным препаратам.

Практические рекомендации предназначены для применения в:

- ✓ микробиологических лабораториях лечебно-профилактических учреждений здравоохранения;
- ✓ микробиологических лабораториях государственной санитарно-эпидемиологической службы;
- ✓ для специалистов органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека;
- ✓ научных учреждений.

Определены новые принципы диагностики анаэробной инфекции, описаны методы работы с облигатно анаэробными микроорганизмами, даны рекомендации по использованию питательных сред для культивирования облигатно анаэробных микроорганизмов.

3.1. Целью данных рекомендаций

является восполнение инструктивно-методической документации для диагностики анаэробной инфекции

3.2. Нормативные ссылки

1. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа» (утв. приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 декабря 2008 г. N 554-ст).
2. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

3. СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий»

4. ГОСТ Р ИСО 15189-2015 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.

4. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ, ОРГАНИЗАЦИИ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ; ОБЕСПЕЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

4.1. Требования к специалистам и вспомогательному персоналу

Уровень компетентности персонала, участвующего в проведении исследований, должен соответствовать действующему законодательству и быть подкреплён документально (дипломы, сертификаты, свидетельства и др.) в соответствии с действующей номенклатурой специальностей [30, 31, 32]:

Специалисты с высшим профессиональным образованием по одной из специальностей «Лечебное дело», «Педиатрия», «Медико-профилактическое дело», «Медицинская биохимия», «Медицинская биофизика», «Медицинская кибернетика», имеющие сертификат специалиста по специальности «Клиническая лабораторная диагностика» и «Бактериология».

Специалисты с высшим профессиональным образованием по специальности «Биология», «Биохимия», «Биофизика», «Генетика», «Микробиология», «Фармация» и дополнительным профессиональным образованием в соответствии с направлением профессиональной деятельности «Клиническая лабораторная диагностика» или «Бактериология».

Специалисты со средним медицинским образованием и наличием сертификата по специальности «Лабораторная диагностика», «Лабораторное дело», «Бактериология».

4.2. Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала

Медицинский персонал, непосредственно участвующий в проведении исследования в лаборатории, обязан соблюдать требования по безопасности труда при работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности. В лаборатории должны соблюдаться правила биологической безопасности, правила сбора и утилизации отходов, правила по охране труда [23, 24, 29]. Все сотрудники должны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в технических паспортах к электрическим приборам, используемым в работе; персонал, работающий с реактивами, должен быть обучен обращению с ними, использовать средства персональной защиты, соблюдать правила личной гигиены.

4.3. Требование к материально-техническому обеспечению выполнения исследований

Лабораторная служба медицинских организаций должна иметь санитарно-эпидемиологическое заключение для работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности и медицинскую лицензию на выполнение видов работ по специальностям «Клиническая лабораторная диагностика», «Лабораторная диагностика», «Бактериология» и «Бактериология» на доврачебном этапе [26, 27, 28]. Организация помещений, требования к оборудованию и правила работы в лаборатории должны соответствовать действующим нормативно-правовым документам, регламентирующим деятельность клинико-диагностических и бактериологических лабораторий учреждений здравоохранения [23, 29, 30, 31]. Сбор, временное хранение, обеззараживание и транспортировка потенциально опасных отходов, образующихся в процессе выполнения технологии, должна проводиться в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами [23, 24, 29]. Отходы класса Б и В, потенциально содержащие микроорганизмы, подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Вывоз и обезвреживание отходов должно производиться аккредитованной организацией.

Для проведения микробиологической диагностики инфекции, вызванных облигатно анаэробными микроорганизмами, лаборатории должны быть оснащены материально-техническими ресурсами согласно приложению 2.

5. ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ, ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

5.1. Необходимые расходные материалы, реагенты и оборудование.

5.1.1. Необходимое оборудование и расходные материалы

Основное требование к культивированию облигатно анаэробных бактерий – применение строгой анаэробной техники. Для создания бескислородной атмосферы используют микроанаэроостаты, анаэробные рабочие станции.

Микроанаэростат - (микро- + анаэростат) герметически закрывающийся пластиковый или металлический сосуд для культивирования облигатно анаэробных микроорганизмов. Сверху он герметически закрывается крышкой с резиновой вакуумной прокладкой. На крышке имеются вакуумметр и кран для откачивания воздуха вакуумным насосом (рисунок 1). Для создания анаэробных условий из прибора выкачивают воздух. Остаток воздуха удаляют, заполняя прибор инертным газом (азот, смесь азота с углекислым газом), а затем в приборе либо снова создают вакуум, либо повторно заполняют азотом. Процедура «промывания» анаэростата азотом повторяется три раза.

Для выращивания анаэробов после загрузки посевами и откачивания из микроанаэростата воздуха (с заполнением его инертным газом или анаэробной смесью) помещают в обычный термостат. Время создания анаэробных условия в микроанаэростате колеблется от 1-2 до 4 часов. Существует постоянная необходимость дополнительных расходов: одноразовые газогенерирующие пакеты, индикаторы.



Рисунок 1. Микроанаэростат

Вакуумный насос любого типа, создающий разрежение - 1 атм. Вакуумный насос и баллон с газом с помощью резиновых шлангов через тройник соединяют с микроанаэростатом. Порядок работы по созданию анаэробных условий в микроанаэростате следующий: цилиндр микроанаэростата закрывают крышкой, завинчивают крепежный винт и откачивают воздух до отметки на вакуумметре - 1 атм. Вакуумирование проводят медленно, чтобы предотвратить вспенивание жидкости в пробирках и смачивание пробок. Перекрывают зажимом шланг, ведущий от тройника к вакуумному насосу, и открывают кран для заполнения микроанаэростата бескислородным газом.

Такую процедуру повторяют трижды для удаления следовых количеств кислорода. Микроанаэростат закрывают и отсоединяют от системы. Выброс газа из микроанаэростата во внешнюю среду осуществляется при условии соблюдения правил техники безопасности; после заполнения микроанаэростата газ, оставшийся в шлангах, также откачивается и только после этого отключают вакуумный насос.

Анаэробная рабочая станция — предназначена для работы со всеми анаэробными микроорганизмами, чувствительными к присутствию кислорода. Анаэробные станции — это изолированные перчаточные боксы со встроенным инкубатором для создания стабильного анаэробноз при исследованиях микроорганизмов, чувствительных к присутствию кислорода. Проведение всех стадий исследований проводится в анаэробных условиях, и как следствие – более высокий показатель роста микроорганизмов.

Анаэробная газовая смесь — смесь газов, которая используется для заполнения рабочего пространства микроанаэростата или анаэробной рабочей станции и которая обеспечивает условия для роста облигатно анаэробных микроорганизмов. Состав анаэробной газовой смеси Азот — 80 %, CO₂ — 10 %, водород — 10 %. Лучшей для культивирования анаэробов является трехкомпонентная газовая смесь (80% азота, 10% водорода и 10% двуокиси углерода). Смесь готовят по заявкам на кислородных заводах. При отсутствии трехкомпонентной газовой смеси можно использовать азот "особой чистоты", другой инертный газ (аргон, гелий), а также водород и двуокись углерода той же квалификации. Содержание кислорода в газах не должно превышать 0,01%. При большем содержании кислорода необходимо использовать палладиевый катализатор, который обеспечивает катализацию реакции соединения атомарного кислорода с водородом в реакции O₂+H₂, в результате чего образуется вода.

Газогенерирующие пакеты — Для создания необходимой атмосферы в микроанаэростате используют газогенирирующие пакеты. Газогенерирующие пакеты представляют собой систему одноразового использования, позволяющие создавать атмосферу для поддержания первичного выделения и культивирования анаэробных бактерий путем использования газогенерирующих пакетов внутри герметизируемых мешков одноразового использования без использования анаэростата, либо внутри микроанаэростата без использования вакуумного насоса.

5.1.2. Питательные среды

Питательные среды должны быть приготовлены *ex tempore* или, в том случае, если они приготовлены заранее, должны храниться в условиях анаэробноза. Селективность средам можно придать путем добавления канамицина (100 мг/л), ванкомицина (7,5 мг/л), гемина (10мг/л), витамина К3 (менадион, 1,5мг/л) или К1 (фитоменадион, 1,5мг/л), а также бараньих эритроцитов (5-7%).

Основа кровяного агара

Среда для выделения, культивирования и обнаружения гемолитической активности требовательных микроорганизмов, используется для выделения и культивирования широкого спектра микроорганизмов со сложными характеристиками роста.

Дефибрированная кровь животных (барана, лошади, кролика):

является дополнительным фактором роста для требовательных микроорганизмов и служит основой для выявления гемолитических реакций. Гемолитические характеристики могут изменяться в зависимости от типа крови или используемой основы среды.

Основа колумбийского агара

Среда для выделения и культивирования требовательных микроорганизмов и определения гемолитических свойств.

Это высокопитательная среда общего назначения для культивирования требовательных микроорганизмов, применяется также в качестве основы для приготовления шоколадного агара.

Среда тиогликолевая жидкая

Среда для используется как транспортная среда и среда накопления при исследовании биоматериала от пациентов с подозрением на анаэробную инфекцию.

Агар Шадлера

Среда для культивирования анаэробных микроорганизмов. Стимулирует рост анаэробов, выделенных из желудочно-кишечного тракта и других органов, независимо от сопутствующей аэробной флоры, благодаря его высоким питательным свойствам и низкому окислительно-восстановительному потенциалу. При добавлении селективных компонентов может использоваться для выделения и восстановления *Lactobacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Bacteroides spp.* из биоматериала. Контроль среды, микробиологический тест: для проверки ростовых свойств готовой питательной среды необходимо использовать референсные штаммы при условии культивирования их в условиях анаэробной атмосферы, формируют хороший рост: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Clostridium butyrium* ATCC 9690, *Clostridium perfringens* ATCC 13124.

Агар для выделения *Clostridioides difficile*

Среду со специальной добавкой используют для селективного выделения клостридий (*C. difficile*) из патологического биоматериала. Добавление лошадиной крови (до 7% об/об) способствует увеличению размеров колоний *Clostridioides difficile* и их выделению. Селективные компоненты этой среды (цикloserин и цефокситин) подавляют рост большинства бактерий, обильно представленных в кишечном содержимом:

энтеробактерий, энтерококков, стафилококков, грамотрицательных анаэробных бактерий и клостридий, не относящихся к виду *C. difficile*.

Агар анаэробный

Агар анаэробный используется для культивирования анаэробных микроорганизмов. Контроль среды, микробиологический тест: для проверки ростовых свойств готовой питательной среды необходимо использовать референсные штаммы *Clostridium butyricum* ATCC 9690, *Clostridium perfringens* ATCC 12919, *Clostridium sporogenes* ATCC 11437, которые должны давать хороший рост.

Агар TSN

Среда для селективного выделения *Clostridium perfringens* из биоматериала. Контроль среды, микробиологический тест: для проверки ростовых свойств готовой питательной среды необходимо использовать референсные штаммы *Clostridium perfringens* ATCC 10543 и *Clostridium sporogenes* ATCC 13124, которые хорошо растут на этой среде и образуют черные колонии; агар TSN ингибирует рост *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Желчно-эскулиновый агар для бактероидов

Среда используется для селективного выделения, идентификации и культивирования микроорганизмов группы *Bacteroides fragilis*. Этот агар разработан Livingston, Kominos и Yee, как среда для первичного выделения и предварительной идентификации микроорганизмов группы *Bacteroides fragilis*. Он содержит такие высокопитательные компоненты, как гидролизат казеина, пептический перевар соевой муки и гемин, которые поддерживают рост бактероидов и других прихотливых анаэробных микроорганизмов. Компонент бычьей желчи подавляет рост почти всех анаэробных грамотрицательных бактерий, кроме *Bacteroides fragilis*.

Контроль среды, микробиологический тест: для проверки ростовых свойств готовой питательной среды необходимо использовать референсные штаммы, которые через 40-48 ч при 35°C в анаэробных условиях образуют хороший или обильный рост *Bacteroides fragilis* ATCC25285, *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482, слабый или нет роста *Proteus mirabilis* ATCC12453 и ингибирует рост *Clostridium perfringens* ATCC13124.

Агар для клостридий усиленный

Среда для культивирования и подсчета клостридий и других анаэробных микроорганизмов. Эта среда, созданная Хиршем и Гринстедом (*Hirsch and Grinstead*), превосходит другие среды в поддержании роста и получении большого количества клеток клостридий. При анаэробной инкубации на этой среде растут различные анаэробы и другие бактерии.

Контроль среды, микробиологический тест: для проверки ростовых свойств готовой питательной среды необходимо использовать референсные штаммы после инкубации при 35±2°C в анаэробных условиях и через 40–48 часов наблюдается хороший рост *Clostridium bifermentans* ATCC 19299, *Clostridioides difficile* NCTC 11024, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Clostridium perfringens* ATCC 10543.

Агар для бифидобактерий

Среда рекомендована для селективного выделения и подсчета бифидобактерий в клиническом материале, культивирования и сохранения многочисленных видов бифидобактерий. Контроль среды, микробиологический тест: для проверки ростовых свойств готовой питательной среды необходимо использовать референсные штаммы. Через 24-48 часов при 37°C в бескислородной атмосфере наблюдается хороший обильный рост *Bifidobacterium breve* ATCC 15698, *Bifidobacterium infantis* ATCC 25962, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 15696.

Среда Вилкинса-Чалгрена (Wilkins Chalgren Medium)

Среда была разработана для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) антибиотиков для облигатно анаэробных бактерий методом серийных разведений в агаре. Она также рекомендуется для выделения анаэробных микроорганизмов из клинических образцов. Контроль среды, микробиологический тест: при использовании среды на тестовых культурах после инкубации при температуре $35\pm 2^\circ\text{C}$ через 24–48 часов в бескислородной атмосфере наблюдается хороший рост референсных культур *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides melaninogenicus* ATCC 25611, *Clostridium perfringens* ATCC 13123.

Диски с желчью

2,0 сухой желчи растворить в 8,0 мл дистиллированной воды, проавтоклавируют при 1 атм 15 минут, пропитать стерильные диски теплым раствором и подсушить их. Диски хранить в холодильнике. Содержание желчи в диске (в пересчете на нативную) - 25 мг.

Диски с эскулином

Диски с эскулином готовят путем пропитывания стандартных стерильных дисков 10% теплым раствором эскулина. Диски подсушивают и хранят в холодильнике.

Диски с углеводами

Для определения сахаролитической активности анаэробных бактерий пригодны диски с углеводами из бумажной индикаторной системы (СИБ) для идентификации энтеробактерий. Диски с углеводами, которые отсутствуют с СИБ, готовят путем пропитывания стерильных стандартных дисков 10% раствором соответствующих углеводов. Диски подсушивают и хранят при 4°C .

Полоски для индикации индола

Для приготовления индикаторных бумажек готовят раствор:

Парадиметиламинобензальдегид - 5,0 г

Ортофосфорной кислоты - 10,0 мл

Спирта этилового 96% - 50,0 мл

В теплом растворе смачивают фильтровальную бумагу, высушивают, нарезают полосками, хранят в темном месте. Цвет бумаги - желтый.

Диски с нитратами

Стандартные стерильные диски пропитать профильтрованным раствором следующего состава:

Калий азотнокислый - 30,0 г

Натрий молибденовокислый двуводный - 0,1 г

Вода дистиллированная - 100,0 мл

Диски подсушивают при комнатной температуре и хранят в холодильнике.

Реактив Грисса

Раствор А: 0,5 г сульфаниловой кислоты растворяют в 150 мл 20% уксусной кислоты.

Раствор Б: 0,2 г нафтамина растворяют в 150 мл 20% уксусной кислоты при слабом нагревании.

Крахмально-йодный раствор

Раствор А: 1,0 г растворимого крахмала растворяют в 100 мл кипящей воды, остужают и добавляют 0,5 г йодистого калия.

Раствор Б: 10% раствор химически чистой серной кислоты.

Добавки к средам для анаэробов.

1) 1% раствор гемина. Растворяют 1 г гемина в 10 мл 1М раствора едкого натра и доводят до объема 100 мл дистиллированной водой. Хранят при 4°C.

2) 1% раствор витамина К1 (или менадиона). Растворяют 0,2 г витамина К1 (или менадиона) в 20 мл 96% этилового спирта. Хранят в темном флаконе с притертой пробкой при 4°C.

3) 0,01% раствор витамина К1 (или менадиона). Растворяют 1 мл 1% раствора витамина К1 в 100 мл дистиллированной воды. Хранят при 4°C в темном флаконе.

4) раствор резазурина (2,5 10-4% раствор). Растворяют 5 мг резазурина в 20 мл дистиллированной воды. Хранят в темном месте при комнатной температуре.

5.2. Сбор, хранение и доставка образцов биологического материала

Взятие патологического материала и его исследование на наличие облигатно анаэробных микроорганизмов наиболее целесообразно проводить при наличии клинических признаков анаэробной инфекции. В связи с тем, что даже кратковременная экспозиция с кислородом может вызвать гибель анаэробов и помешать диагностике анаэробной инфекции, полученную пробу необходимо поместить в закупоренные контейнеры с регенерированной питательной средой (тиогликолевой или иной). Доставлять материал необходимо не позднее 1,5 часов от момента взятия. Весь биологический материал, поступающий в лабораторию, должен быть правильно промаркирован и/или штрих-кодирован.

Сбор проб, хранение и транспортировка биоматериала определяется в каждом конкретном случае с учетом симптоматики заболевания в соответствии с нормативными документами [32, 33]. Биоматериал для микробиологического исследования с целью выявления облигатно анаэробных бактерий забирают до начала терапии антибактериальными препаратами. Повышает частоту изоляции облигатных анаэробов взятие большого количества биоматериала. Исследуемые материалы: кровь, перитонеальная и синовиальная жидкости, гной из абсцессов и закрытых полостей, материал из глубоких отделов свища, фрагменты костной и мышечной тканей и т.д.

Гной, материал из свища забирают из глубоких отделов пораженного участка и помещают в анаэробную транспортную среду. Фрагменты мышц и костной ткани размером 1x1 см забирают из глубоких слоев очага воспаления во время операции. Если время доставки в лабораторию превышает 20 минут, фрагменты тканей погружают в 10 мл транспортной жидкой (полужидкой) среды (тиогликолевый бульон, сердечно-мозговой бульон, бульон Шадлера).

Бактериологическое исследование крови при наличии клинических признаков инфекции проводят обязательно. Взятие крови для микробиологического посева производят на высоте температуры из вены после двукратной обработки кожи стерильной салфеткой, смоченной кожным антисептиком. Через 1-2 минуты с соблюдением правил асептики забирают кровь в коммерческие флаконы для гемокультивирования предназначенные для анаэробов. Для ряда коммерческих флаконов, благодаря вакуумной аспирации крови, необходимый объем крови поступает во флакон автоматически через иглу и переходник. Объем крови для исследования должен составлять 5-8 мл. Повторное взятие крови повторяют через 30 минут, и далее еще через 30 минут после повторного взятия крови. Флаконы с кровью маркируют (штрих-кодируют) с указанием всех необходимых данных, с обязательным указанием времени взятия крови и вместе с направлением доставляют в лабораторию. В случае невозможности доставки в микробиологическую лабораторию флаконы с посевами крови хранятся **при комнатной температуре не более 24 часов!**

Биологический материал необходимо забирать непосредственно из очага инфекции соблюдая при этом правила асептики, не контаминировать биоматериал посторонней микрофлорой, так как анаэробы являются представителями нормальной флоры человека.

Биоматериал для исследования на анаэробную микрофлору необходимо отбирать **из глубоких ран (!)** где подозревается анаэробная инфекция. Антибактериальная терапия и вскрытие гнойно-воспалительных очагов изменяют микробный пейзаж очагов инфекции. Поэтому материал для бактериологического исследования следует брать до начала химиотерапии и до или во время вскрытия или дренирования очага. Взятие повторных анализов наиболее показано при неблагоприятном течении болезни, при неэффективности антибактериальной терапии или при возникновении осложнений (генерализация, суперинфекция и т.д.). Частая смена возбудителей при повторных анализах свидетельствует о нарушении асептики в процессе лечения.

Фрагменты костной и мышечной ткани отбирают во время операции по 3-4 образца, каждый объемом 0,5 - 1 см³, в отдельные стерильные пробирки (выделение одних и тех же микроорганизмов из нескольких образцов позволяет исключить контаминацию биообразца).

Не следует исследовать на анаэробы: мокроту, полученную при откашливании или аспирации через назотрахеальный катетер, материал, полученный при бронхоскопии, мазки с поверхности ран, мочу, полученную при естественном мочеиспускании.

5.3. Биоматериал для проведения исследования при подозрении на анаэробную инфекцию

Анаэробные инфекции необходимо подозревать при наличии характерной клинической картины анаэробной инфекции, при гнойно-воспалительных процессах различной локализации, а также в тех случаях, когда не удается выделить возбудителя по обычной методике или когда количество выделенных бактерий не соответствует видимому под микроскопом. При подозрении на анаэробную инфекцию необходимо правильно определить биоматериал для исследования. Примерный перечень биоматериалов,

подлежащих исследованию на выявление облигатно анаэробных микроорганизмов представлен в таблице 1.

Таблица 1 - Биоматериалы для проведения исследования на анаэробную инфекцию

Локализация	Биологический материал
Голова и шея	Аспираты абсцессов, полученные шприцем с иглой после деконтаминации поверхности. Биоптат, полученный при операции Мазки, полученные во время операции, при невозможности получения биоптата.
Легкие	Транстрахеальный аспират. Материал, полученный из легкого при чрезкожной пункции. Биоптаты, полученные во время операции. Пробы при проведении бронхоскопии, полученные защищенной щеткой. Пробы, полученные при проведении торакотомии. Мазки, полученные во время операции, при невозможности получения биоптата.
Центральная нервная система	Аспираты абсцессов, полученные шприцем с иглой. Биоптаты, полученные во время операции. Мазки, полученные во время операции, при невозможности получения биоптата.
Моча	Проба, полученная стерильным катетером.
Женские половые органы	Пробы, полученные из цервикального канала и переднебокового свода влагалища. Аспираты эндометрия, полученные с помощью пальпель-биопсии эндометрия или при гистероскопии. Аспираты абсцессов, полученные шприцем с иглой. Биоптат, полученный шприцем с иглой. Мазки, полученные во время операции, при невозможности получения биоптата.
Мужские половые органы	Аспират придатков яичка; аспират яичка, полученный шприцем с иглой; эякулят. Биоптат аденомы предстательной железы, полученный при проведении трансуретральной резекции или во время полостной операции; биоптат новообразований. Мазки, полученные во время операции, при невозможности получения биоптата.

Брюшная полость	Перитонеальная жидкость, полученная шприцем с иглой. Аспираты абсцессов, полученные шприцем с иглой. Желчь, полученная шприцем с иглой при чрезкожной аспирации, а также полученная во время операции. Биоптаты, полученные во время операции. Мазки, полученные во время операции, при невозможности получения биоптата.
Желудок, 12-перстная кишка, тонкий кишечник	Биоптаты желудка и 12-перстной кишки или из тела и antrum желудка. Биоптаты изо всех полостей только при наличии проблем петли слепой кишки или синдроме мальабсорбции.
Толстая кишка	Биоптаты слизистой и просветные фекалии.
Мягкие ткани	Аспираты, полученные шприцем и иглой. Биоптаты, полученные во время операции. Аспират из синусов любой локализации, полученный иглой и малым одноразовым катетером; глубокие Аспираты краев открытой раны, полученные чрезкожной аспирацией предварительно очищенной кожи. Глубокие аспираты поверхностных изъязвлений, полученные чрезкожной аспирацией предварительно очищенной кожи.
Кости и суставы	Гной, полученный прямой аспирацией во время операции. Грануляционная ткань или гной из инфицированной кости. Биоптат, полученный во время операции. Секвестры, полученные во время операции. Аспираты, полученные шприцем с иглой. Мазки, полученные во время операции, при невозможности получения биоптата.

5.4. Транспортные среды, используемые для сбора и доставки биоматериала при подозрении на анаэробную инфекцию

Необходимо минимизировать контакт биоматериала с кислородом, обеспечить быструю доставку биоматериала в лабораторию. Анаэробные бактерии могут выживать в 1мл гноя.

Для предотвращения потери возбудителя необходимо использовать транспортные системы, обеспечивающие сохранение облигатно анаэробных бактерий: коммерческая транспортная среда угольная или без угля, коммерческая среда для посева крови для анаэробных бактерий для бактериологического автоматического анализатора. В качестве транспортной среды можно использовать тиогликолевую среду, из которой предварительно удален кислород, и на поверхность среды наложен стерильный глицерин (10%) в количестве 0,5-1 мл., тиогликолевая среда может использоваться в дальнейшем и как среда накопления. Транспортные среды должны сохранить анаэробные бактерии до момента их посева на питательные среды в бескислородных условиях. Одновременно со взятием биоматериала для микробиологического исследования необходимо взятие биоматериала и для проведения микроскопии нативного материала. Для этого используется отдельный тупфер без транспортной среды, с помощью которого биоматериал наносится на предметное стекло для последующей микроскопии.

5.5. Транспортировка биологического материала

Хранить и транспортировать взятый биоматериал следует при комнатной температуре. Максимальное время от взятия биоматериала до первичного посева на питательные среды и создание бескислородной атмосферы не должно превышать 2 часа. В редких (экстренных) случаях можно допустить транспортировку биоматериала для исследования на анаэробную инфекцию отделяемого, набранного в стерильный шприц, иголка которого воткнута в резиновую пробку. Многие коммерческие транспортные системы с различной средой могут сохранять облигатно анаэробные бактерии до 24 часов.

Часто инфекция носит смешанный аэробно-анаэробный характер, и при длительном нахождении в транспортной среде факультативные анаэробные и облигатно аэробные микроорганизмы вытесняют облигатно анаэробные бактерии. Задержка доставки биоматериала для исследования на анаэробную инфекцию более чем на 2 часа может привести к вытеснению облигатных анаэробов факультативно-анаэробными бактериями и гибели строгих анаэробов, что приведет к ложноотрицательному результату исследования. Сопроводительные документы помещаются в индивидуальную упаковку отдельно от биологического материала и прочно прикрепляются снаружи контейнера. При невозможности быстрой транспортировки образцы должны быть помещены в транспортные среды для анаэробов или тиогликолевую среду.

5.6. Маркировка материала для лабораторного исследования

На этикетке контейнеров с материалом указывается: Ф.И.О., возраст пациента, тип биоматериала.

В направлении необходимо указать: наименование учреждения/отделения, которое направляет биоматериал на исследования, Ф.И.О. обследуемого лица; возраст или дата рождения; пол; дату взятия биоматериала для лабораторного исследования; дату заболевания; предварительный клинический диагноз или повод к обследованию; степень тяжести заболевания; данные о применении антибактериальных препаратов (наименование и длительность приёма); Ф.И.О., должность, медицинского работника, отправившего биоматериал, дату отправки биоматериала и контактный телефон, по которому можно связаться с данным медицинским работником.

5.7. Оценка пригодности образцов

При доставке образца в лабораторию сотрудник лаборатории, принимающий материал, должен проверить правильность оформления направления на исследование, целостность контейнеров с биологическим материалом, зарегистрировать поступивший материал в рабочем журнале в бумажной или электронной форме.

Нумерация образцов при регистрации должна быть идентична нумерации в бланках направлений на исследование.

Непригодными для исследования являются образцы:

- немаркированные или несущие неверную/нечитаемую маркировку;
- без даты получения материала;
- хранившиеся и транспортировавшиеся с нарушением установленных требований для биологического материала;
- с нарушением целостности и/или герметичности контейнеров.

В случае непригодности доставленного образца необходимо уведомить врача, назначившего исследование, и рекомендовать повторное взятие материала с соблюдением всех перечисленных правил [32].

5.8. Пробоподготовка и первичный посев

Особенность культивирования анаэробных микроорганизмов состоит в том, что воздух нормальной атмосферы замещается бескислородным газом, а питательные среды предварительно восстанавливаются до окислительно-восстановительного потенциала 60-120 мВ. Первичный посев поступившего в лабораторию материала проводят немедленно. При поступлении нескольких образцов определяют последовательность их обработки. Для этого сначала готовят пробы, доставленные в шприцах, пробирках и флаконах без транспортных сред, затем обрабатывают биоматериал, доставленный в жидких средах. Очередность определяется условиями поддержания жизнеспособности микроорганизмов.

Для культивирования в анаэробных условиях используют:

а) свежеразлитые (в течение 2 часов после приготовления) или чашки с питательными средами для посева биоматериала, которые находились менее суток в бескислородной атмосфере (в анаэроостате);

б) селективные среды - для выделения только анаэробных бактерий. Для этого в питательную среду добавляют один из следующих антибиотиков: неомицин, канамицин (по 75 - 80 мкг/мл), гентамицин (50 мкг/мл) или налидиксовую кислоту (невиграмон, неграм - 40 мкг/мл). Вместо добавления антибиотиков в среду на засеянную поверхность анаэробного кровяного агара можно накладывать по 2-4 диска с канамицином (1000 мкг в диске). В зоне задержки роста факультативных анаэробов вокруг дисков часто отмечается рост чистой культуры облигатно анаэробных бактерий. Однако все эти антибактериальные препараты могут подавлять рост отдельных видов анаэробов. Поэтому посев на неселективную среду обязателен;

в) обогащенную питательную среду для контроля стерильности или тиогликолевую среду, или, при отсутствии добавок для ее приготовления - питательную среду для контроля стерильности;

г) на общепринятые элективные и селективные среды - для выделения аэробных бактерий.

Для посева на плотные питательные среды каплю жидкого патологического материала помещают на поверхность агара и рассеивают методом "истощения", несколько раз прожигая петлю (или меняя одноразовую петлю) с целью получения изолированных колоний микроорганизмов.

Патологический материал с тампона (используя всю поверхность тампона) также наносят на небольшой участок агара и рассеивают методом "истощения". После этого тампон вносят в жидкую среду и материал переводят в питательную среду вращением пробирки между ладонями.

Фрагменты мягких тканей и биоптаты измельчают в стерильной ступке (или с помощью устройства для измельчения тканей) предварительно залив небольшим количеством жидкой среды для анаэробов или 10%-ной лизированной кровью барана в физиологическом растворе. Для посева используют несколько капель полученной эмульсии. Костные фрагменты погружают в небольшое количество жидкой среды, встряхивают 1,5 - 2 мин., вращая пробирку между ладонями, и высевают на плотную среду. Оставшийся материал заливают жидкой средой для анаэробов в таком количестве, чтобы соотношение тканевого фрагмента и среды составляло примерно 1:10. Немедленно после посева пробирки и чашки (крышками вверх) укладывают в микроанаэростат (или в термостат (крышками вниз) при работе в анаэробной рабочей станции).

Туда же ставят пробирку для контроля анаэробнозиса (или коммерческий тест на анаэробнозис). Проводят трехкратную замену газа в микроанаэростате, помещают его в термостат и инкубируют при 37°C. Первичный посев можно проводить в условиях обычной атмосферы. Но в этом случае необходимо время для всех манипуляций, связанных с первичным посевом и созданием бескислородной атмосферы, составляет не более 20 минут. Поэтому при необходимости первичного посева биоматериала необходимо заранее подготовить и промаркировать чашки Петри с питательными средами, подготовить микроанаэростат в который будут помещены посеы. В случае использования анаэробной рабочей станции все манипуляции с биоматериалом (первичная пробоподготовка, посев) происходит внутри рабочей камере в бескислородной атмосфере и не регламентируется по времени проведения манипуляций.

Микроскопическое исследование патологического материала

Делают мазок на стекле, окрашивают его по Граму или по Граму в модификации Копелова (приложение 3) и просматривают.

Подробно описывают все обнаруженные виды организмов. Отдельные виды анаэробных бактерий имеют уникальную морфологию: для *Fusobacterium nucleatum* характерные тонкие зернистые грамотрицательные палочки с заостренными концами, для *C. perfringens* - крупные грамположительные палочки с обрубленными концами. Обнаружение очень мелких грамотрицательных коккобацилл позволяет сделать предположение о наличии в материале бактериоидов. Данные, полученные при микроскопии первичного материала, сопоставляют впоследствии с результатами изучения морфологии микроорганизмов, выросших в аэробных и анаэробных условиях. Обнаружение в мазке морфологических форм, не растущих в аэробных условиях, также указывает на присутствие в образце анаэробных бактерий.

5.9. Сроки инкубации облигатно анаэробных бактерий

Посевы инкубируются в анаэробных условиях 24–48 часов. Срок инкубации для *Clostridioides difficile* может быть продлен до 4-5 суток. Срок инкубации облигатно анаэробных медленно растущих микроорганизмов может быть продлен до 3-7 суток с ежедневным просмотром чашек Петри с посевами и при появлении минимального видимого роста микроорганизмов возможно проводить идентификацию культуры. Для обнаружения актиномицетов срок инкубации должен быть продлен до 21 суток на агаре для актиномицетов с ежедневным просмотром посевов.

5.10. Выделение на искусственных питательных средах

После 48 часов инкубации проводят первый учет чашек с отсевом типичных колоний на жидкие питательные среды для анаэробов для изучения культуральных свойств микроорганизмов и последующей идентификации, а также отсева на плотные питательные среды, которые затем культивируют в аэробных условиях, чтобы убедиться, что выросшие

микроорганизмы не являются факультативно-анаэробными бактериями. После первого учета чашки возвращают в микроанаэростат и инкубируют еще в течение 72 часов. Затем повторно изучают морфологию колоний, обращая особое внимание на появление черного пигмента, и производят отсев на питательные среды материал из тех колоний, которые отсутствовали при первом учете чашек, т. е. через 48 часов инкубации.

Большинство грамотрицательных анаэробных бактерий могут быть изолированы на средах с добавлением канамицина (100 мг/л), ванкомицина (7,5 мг/л), гемина (10 мг/л), витамина К3 (менадион, 1,5 мг/л) или К1 (фитоменадион, 1,5 мг/л), а также бараньих эритроцитов (5%). К базовым относятся среды *Columbia agar Base*. *Brucella agar*. При количественном методе исследования материал засевают из 10^{-6} , 10^{-7} и 10^{-8} разведений. Срок инкубирования составляет 48 часов при температуре 37⁰С. Грамположительные анаэробные кокки выделяют на базовых средах (*Columbia agar Base* и др.), с добавлением бараньей крови (5%), налидиксовой кислоты (10 мг/л) и колистина (10 мг/л) или фенилэтилалкола (2,5 г/л).

Видовая идентификация выделенных чистых культур бактерий проводится общепринятыми методами с использованием номенклатуры Берджи и сведений, обобщенных в руководствах по клинической микробиологии. Через 48 часов инкубации в анаэробных условиях приступают к выделению чистых культур. Для этого выросшие колонии просматривают с помощью бинокулярного микроскопа (серии МБС) и по несколько колоний каждого типа засевают параллельно секторами на две чашки: с анаэробным гемагаром и 5% кровяным агаром. Из тех же колоний готовят и окрашивают мазки. После этого чашку с первичным посевом просматривают в лучах ультрафиолета и регистрируют колонии,

светящиеся красным (группа *Bacteroides melaninogenicus*) или зеленым светом (*Fusobacterium*, *C. difficile*). Другие бактероиды, стафилококки и стрептококки могут светиться розоватым светом.

Микроскопируют приготовленные мазки из жидкой среды с первичным посевом. В случае обнаружения морфологических форм бактерий, не выделенных с плотной среды, делают высев на питательные среды, вновь помещают в микроанаэроостат на 1-4 суток для обнаружения медленно растущих анаэробов, а чашки с 5% кровяным агаром - в термостат.

На следующий день (4-ый день исследования) определяют наличие роста на секторах агара, инкубированного в аэробных и анаэробных условиях. Колонии, выросшие в аэробных условиях, идентифицируют по общепринятым схемам.

Колонии, выросшие только в анаэробных условиях, расценивают как облигатные анаэробы и приступают к их идентификации. На этом этапе ориентировочно можно сообщить (или подтвердить) клиницистам о наличии в исследуемом материале анаэробных бактерий. Морфологические особенности клеток и колоний, наличие аутофлуоресценции, каталазная активность бактерий в некоторых случаях позволяют определить родовую принадлежность микроорганизма.

5.11. Идентификация облигатно анаэробных бактерий на основе морфологических и биохимических свойств

Идентификация облигатных анаэробов начинается с микроскопии нативного биоматериала. Данные микроскопии сопоставляют с результатами изучения морфологии микроорганизмов, выросших в аэробных и анаэробных условиях. Обнаружение в мазке морфологических форм, не растущих в аэробных условиях, указывает на присутствие в биоматериале строгих анаэробов.

Некоторые облигатно анаэробные бактерии имеют уникальную морфологию. Так для *Fusobacterium nucleatum* характерны тонкие зернистые грамотрицательные палочки, представлены на рисунке 2.



Рисунок 2 - *Fusobacterium nucleatum*

Для бактероидов характерны тонкие мелкие грамотрицательные палочки, представлены на рисунке 3.

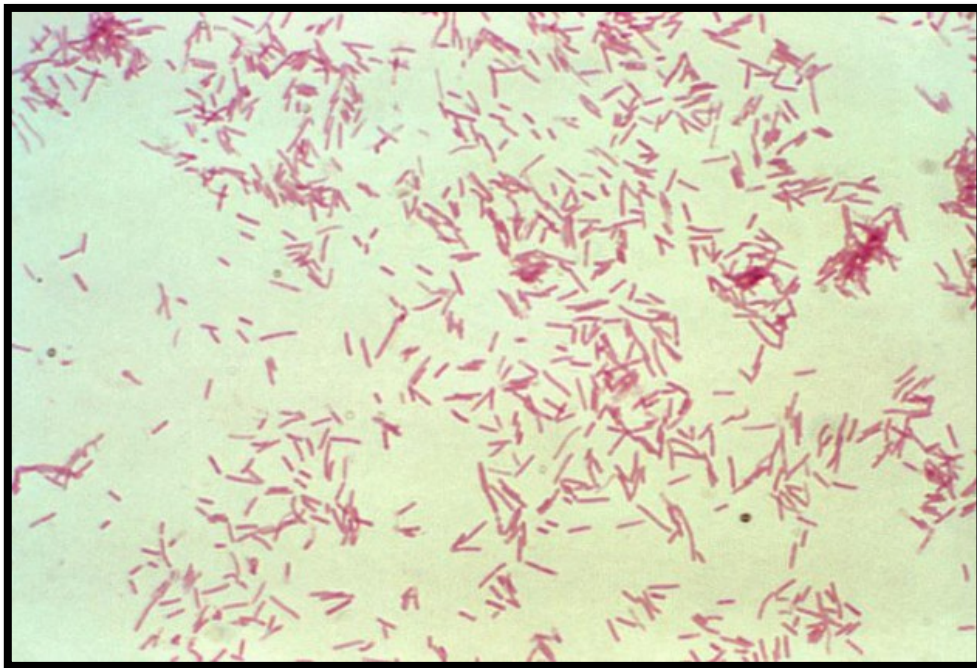


Рисунок 3 - *Bacteroides spp.*

Для клостридий характерны в мазке спорообразующие грампозитивные палочки, представлены на рисунке 4.



Рисунок 4 - *Clostridium perfringens*

Для идентификации используют культуры анаэробных бактерий с секторов первичного рассева на 5% кровяном агаре. Однако эти культуры, несмотря на видимую однородность, довольно часто бывают смешанными. Поэтому, если нет большой срочности, желательно еще раз рассеять культуру методом "истощения". Порядок выполнения всех тестов должен быть четко определен, все манипуляции следует выполнять быстро, чтобы предотвратить гибель анаэробных бактерий. Для получения стабильных результатов пользуются только восстановленными средами. Чистую культуру исследуемого организма обильно засевают на следующие диагностические среды:

- 1) на 5% кровяной агар - для проверки на аэротолерантность и выявления микроаэрофильных и факультативно-анаэробных бактерий;

2) среду для контроля стерильности (или тиогликолевую среду) с бромтимолблау - для выявления способности ферментировать глюкозу. Для выявления индолообразования между пробкой и стенкой пробирки укрепляют индикаторную бумажку;

3) среду для контроля стерильности или обогащенную среду для контроля стерильности или тиогликолевую среду - для сохранения культуры и изучения характера роста на жидких средах;

4) на анаэробный гемагар: предварительно в нижней части чашки с анаэробным гемагаром делают T-образный вырез агара. На поверхность засеянного агара (если не добавлены в среду соответствующие антибактериальные вещества) накладывают диски с канамицином, полимиксином, ристомицином и желчью. Диски с эскулином и нитратами помещают на густо засеянные изолированные участки агара в нижней части чашки. Это позволяет ограничить диффузию эскулина и нитратов и накопить культуру для изучения сахаролитической активности бактерий.

Грамположительные палочки засевают, кроме того, на:

5) среду с желатиной - для выявления протеолитической активности. Пробирку со средой кипятят 5 мин., остужают в холодной воде и засевают уколом;

6) желточный агар - для выявления липазы и лецитиназы.

Засеянные среды 3, 4, 5 и 6 немедленно помещают в анаэрогат, среду 2 инкубируют в термостате, среду 1 - в эксикаторе с зажженной свечой или СО₂-инкубаторе.

Морфология и флуоресценция колоний

Изучение морфологии колоний проводят с помощью стереоскопического микроскопа (серии МБС). Некоторые морфологические особенности полезны при ориентировочной дифференциации бактерий.

Крупные, иногда достигающие размера 5 - 6 мм, колонии с двойной зоной гемолиза характерны для *Clostridium perfringens*. Штаммы *Fusobacterium nucleatum* колонии напоминают хлебные крошки, имеют испещренную поверхность. *F. nucleatum* и некоторые виды клостридий, в частности *C. difficile*, могут светиться в лучах ультрафиолета зеленоватым светом.

Fusobacterium varium, *Fusobacterium mortiferum*, *Fusobacterium necrophorum* формируют крупные колонии с выпуклым непрозрачным центром и прозрачными, плоскими, неровными краями, напоминающие "яичницу-глазунью". Через 20-30 мин. экспозиции на воздухе вокруг колоний фузобактерий может образовываться зеленоватое окрашивание. Колонии *Actinomyces* имеют розовую, рыжевато-коричневую или желтую окраску. Для *Bacteroides ureolyticus* характернырастающие в агар колонии. Для *Bacteroides melaninogenicus* и *Bacteroides asaccharolyticus* характерна ярко-красная флуоресценция в лучах ультрафиолетового света. После 5-14 дней инкубации флуоресценция исчезает и колонии *B. Bacteroides melaninogenicus* и *Bacteroides asaccharolyticus* приобретают темный пигмент (от коричневого до интенсивно-черного). Некоторые бактериоды, пептококки и вейлонеллы имеют иногда в лучах ультрафиолетового света розовую окраску. Многие виды клостридий, штаммы *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides asaccharolyticus* и часто *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes* обладают выраженной гемолитической активностью (при посеве на агар с нелизированной кровью барана).

Морфология бактерий

Окраску мазков из чистых культур для получения лучших результатов необходимо проводить по Граму в модификации Копелова в связи с тем, что дифференциация анаэробных бактерий при окраске по Граму бывает затруднена.

Так клетки старых культур клостридий окрашивается по Граму отрицательно и их трудно отличить от истинных грамотрицательных бактерий. Клетки в мазках из молодой культуры *Bacteroides melaninogenicus* выглядят как мелкие грамположительные палочки или коккобациллы. В более старых культурах клетки светло-розовые, однородные. Клетки *Bacteroides fragilis* - обычно грамотрицательные, умеренно плеоморфные палочки с более ярко окрашенными закругленными концами.

Анаэробные кокки (пептококки и пептострептококки) по морфологии неотличимы от стафилококков и стрептококков.

Определение каталазы

На предметное стекло наносят каплю 3% перекиси водорода, в нее вносят петлю агаровой культуры, предварительно выдержанной на открытом воздухе в течение 30 минут. Наличие пузырьков газа свидетельствует о положительной реакции. Большинство наиболее часто выделяемых представителей группы *Bacteroides fragilis*, а также некоторые виды пептококков, пропионибактерий и штаммы *Eubacterium lentum* - каталазоположительны.

Проверка на аэротолерантность

Отсутствие роста на кровяном агаре, инкубированном в термостате (эксикаторе, CO₂-инкубаторе), свидетельствует о том, что исследуемый организм действительно облигатный анаэроб.

Определение ферментации глюкозы и индолаобразования

При ферментации глюкозы происходит сдвиг pH в кислую сторону и обесцвечивание среды с бромтимолблау. Индолаобразование выявляется по покраснению конца индикаторной бумажки.

Характер роста в жидкой среде

Для диагностики важно оценить характер роста микроорганизма в жидкой среде. Например, бактероиды растут гомогенно, постепенно образуя на дне пробирки осадок. Рост *Bacteroides melaninogenicus* иногда не виден глазом и определяется только при просмотре мазка. Рост *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides ureolyticus*, а также пептококков и вейлонелл стимулируется добавлением в среду сыворотки. *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes* могут формировать в жидкой среде взвешенные колонии различного размера. Для *Fusobacterium varium*, *Fusobacterium mortiferum* и некоторых клостридий характерен рост с обильным образованием крупных пузырей газа.

Учет результатов на чашке с диагностическими дисками

Измеряют размер диаметра зон задержки роста исследуемого организма дисками с антибиотиками. Чувствительными считают культуры с зоной задержки роста > 10 мм, устойчивыми - <10 мм.

а) Чувствительность к канамицину отличает фузобактерии от бактероидов. Последние, за исключением *Bacteroides ureolyticus*, устойчивы к этому препарату.

б) Устойчивость к полимиксину и ристомицину. Грамположительные бактерии обычно чувствительны к ристомицину, но устойчивы к полимиксину. Грамотрицательные устойчивы к ристомицину, но чувствительны к полимиксину.

в) Устойчивыми к желчи считают культуры, растущие у края диска с желчью. Чувствительные образуют вокруг диска зону ингибиции роста. Устойчивость к желчи отличает штаммы группы *Bacteroides fragilis* от других бактероидов и *Fusobacterium varium* и *Fusobacterium mortiferum* от фузобактерий других видов.

г) Гидролиз эскулина выявляется двумя способами:

- при освещении лучами длинноволнового ультрафиолетового света участок агара около диска с эскулином флуоресцирует голубым светом. При гидролитическом расщеплении препарата бактериями способность флуоресцировать теряется,

- путем нанесения 2-3 капель 1% водного раствора цитратноаммонийного железа на поверхность диска. Если эскулин гидролизовался, через 2-5 мин. вокруг диска образуется темно-коричневое или черное окрашивание.

д) Редукция нитратов в нитриты. Диск с нитратом снимают с поверхности гемагара и помещают в чистую чашку. На поверхность диска наносят по 1 капле раствора А и Б. При редукции нитратов в нитриты диск окрашивается в синий (при использовании крахмально-водного раствора) или розовый цвет (при использовании реактива Грисса). Если цвет не меняется, на поверхность диска наносят порошок цинка.

Окрашивание в синий (или розовый - при использовании реактива Грисса) цвет свидетельствует о том, что нитраты не были редуцированы, а отсутствие окрашивания - о полном разрушении нитрата и нитрита. Нитраты в нитриты редуцируют штаммы *Bacteroides ureolyticus*, *Veillonella*, *Eubacterium lentum*. Тест важен также при дифференциации грамположительных кокков и палочек.

5) Определение протеолитической активности. Среду с желатиной инкубируют в анаэробе до появления хорошо видимого роста и помещают в холодильник вместе с контрольной пробиркой до застывания среды в незасеянной пробирке. При наличии протеолиза среда в засеянной пробирке не застывает.

6) Определение лецитовителлазы и липазы. Лецитиназа выявляется по наличию зоны помутнения внутри среды вокруг колоний, липаза - по наличию на поверхности среды вокруг колоний узкой, радужной, блестящей, маслянистой зоны, видимой при косом освещении.

7) Определение сахаролитической активности. Для определения сахаролитической активности анаэробных бактерий можно использовать системы индикаторные бумажные (СИБ) для идентификации *Enterobacteriales*. Суточную или двухсуточную культуру собирают тампоном с поверхности агара (можно с гемагара с диагностическими дисками), суспендируют в предварительно прокипяченном пептонно-дрожжевом бульоне (или сердечно-мозговом бульоне, бульоне Шадлера или тиогликолевой среде). В пробирки помещают диски с углеводами и вносят по 0,3 мл густой взвеси бактерий. Инкубируют 24 часа при 37°C в анаэробных условиях. Изменение цвета диска из малинового в желтый свидетельствует о ферментации углевода. При использовании дисков, приготовленных в лаборатории, после суточной инкубации в пробирку добавляют по 1 капле 1% раствора бромтимолблау.

Изменение цвета индикатора из синего в желтый расценивается как положительная реакция.

Используя критерии: рост в присутствии желчи, бриллиантового зеленого и канамицина (диски 1000 мкг), ферментация глюкозы, наличие черного пигмента; неспорообразующие облигатно анаэробные бактерии можно разделить на 4 группы:

1 группа - *Bacteroides fragilis*. Все бактерии этой группы сбраживают глюкозу и способны расти в присутствии желчи и канамицина, бриллиантовый зеленый подавляет их рост;

2 группа – бактерии рода *Prevotella*. Растут в присутствии канамицина, но не растут в присутствии желчи и бриллиантового зеленого, обладают сахаролитической активностью – сбраживают глюкозу. Некоторые виды могут образовывать черный пигмент на кровяных средах после 5-7 дней инкубации;

3 группа – род *Porphyromonas*. Асахаролитические бактерии, не растущие в присутствии желчи и бриллиантового зеленого, но растущие в присутствии канамицина, образуют черный пигмент. Чувствительны еще и к ванкомицину (диски 5 мкг).

4 группа – бактерии рода *Fusobacterium*. Не растут в присутствии желчи и канамицина, но растут в присутствии бриллиантового зеленого.

Для выявления группы *Prevotella melaninogenica*/*Porphyromonas asacharolytica* и некоторых других строгих анаэробов (*Fusobacterium spp.*, *Clostridioides difficile*) первичные посеы возможно исследовать в лучах длинноволнового ультрафиолетового излучения, при использовании люминисцентного микроскопа с фильтрами ФС 1-2 и СЗС 24-4. При наличии микроорганизмов группы *Prevotella melaninogenica*/*Porphyromonas asaccharolyticus* колонии светятся малиновым цветом. Зеленое свечение характерно для *Fusobacterium spp.* или *Clostridioides difficile*.

Финальная идентификация облигатно-анаэробных бактерий проводится с применением биохимической идентификационной системы (разных производителей).

На современном этапе все больше лабораторий может использовать для идентификации облигатно анаэробных микроорганизмов метод времяпролетной матрично-ассоциированной масс-спектрометрии на платформе MALDI-TOF, или молекулярно-генетические методы, которые позволяют повысить точность идентификации и сократить сроки выполнения исследования до 48-72 часов вместо 5-7 суток.

Оценка полученных результатов исследования

Обнаружение бактериоидов, фузобактерий, клостридий или анаэробных кокков в посевах крови расценивается как клинически значимое. Обнаружение пропионибактерий в одной пробе крови расценивается как контаминация кожной микрофлорой, при этом необходимо повторить исследование. Присутствие анаэробов в повторных пробах подтверждает наличие бактериемии. В полной мере изложенное положение относится и к трактовке посевов ликвора. При этом, как и при посеве другого материала, необходимо всегда оценивать результаты микроскопии нативного материала и сопоставлять их с результатами бактериологического исследования. Однозначно оцениваются положительные результаты посевов из изолированных гнойных очагов любой локализации. При этом учитывают данные бактериоскопии нативного материала, так как присутствующие в пробе анаэробы не всегда могут дать рост. Менее информативны результаты бактериологического исследования проб, взятых с поверхности ран и дренированных гнойных очагов. Квалифицированное и правильное взятие материала из глубины раны и исключение контакта инструмента с кожей и слизистыми делает достоверным результат бактериологического исследования.

Наличие анаэробов в пробе мочи, взятой надлобковой пункцией, имеет диагностическое значение даже без количественного подсчета колоний. При анализе трупного материала важное значение следует придавать гистологии и бактериоскопии тканевых срезов мышц и межфасциальных пространств. Именно там преимущественно обнаруживаются клостридии и анаэробные кокки.

5.12. Идентификация облигатно анаэробных микроорганизмов, с применением молекулярно-генетических методов

Молекулярные методы позволяют идентифицировать присутствие генома бактерии и его репликации. К таким методам относятся: 1) полимеразная цепная реакция – риботипирование, этот метод получил распространение из-за своей доступности, эффективности и высокой специфичности (97%), и чувствительности (91%); 2) гель – электрофорез в пульсирующем поле; 3) мультилокусный анализ и определение мультилокусной последовательности [41]. Молекулярно-генетические методы позволяют диагностировать инфекцию быстрее культурального метода и проверять корректность отрицательных результатов других методов диагностики инфекции [42]. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – относительно новый и перспективный метод для диагностики *Clostridium difficile* – ассоциированной диареи. Для выявления токсигенных штаммов *Clostridioides difficile* используется метод амплификации специфических участков генома возбудителя, кодирующих токсин А и/или В. Разработана методика, позволяющая амплифицировать специфический для *Clostridioides difficile* участок гена, кодирующий токсин А и не имеющий перекрестной реакции с участком ДНК токсигенных штаммов *Clostridium sordellii* [43].

Таким образом, применение метода полимеразной цепной реакции позволяет определять способность культуры *Clostridioides difficile* к токсинообразованию и синтезу других факторов патогенности, что важно для диагностики *Clostridium difficile* – ассоциированной диареи [44, 45].

5.13. Идентификация облигатно анаэробных микроорганизмов с применением времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF-MS)

Для идентификации с применением метода MALDI-ToF MS используют 24-48 часовые культуры микроорганизмов. Допускается использовать для идентификации с применением метода MALDI-ToF MS посевы, хранившиеся на чашках Петри при комнатной температуре в анаэробной рабочей станции (боксе, микроанаэроостате) в течение 2-3 суток. Для получения достоверного результата необходимо использовать метод двухэтапной идентификации: прямого нанесения, с последующим подтверждением идентифицированной культуры методом экстракция белков с использованием муравьиной кислоты. Для проведения идентификации по белковому спектру облигатно анаэробных микроорганизмов методом прямого нанесения необходимо стерильной пластиковой петлей (иглой) снять с поверхности агаровой среды изолированную колонию 24-48 часовой культуры микроорганизма и поместить на три ячейки стальной мишени масс-спектрометра (трехкратное (дублированное) нанесение). Сверху нанести 1,5 мкл 70% муравьиной кислоты и после её полного высыхания нанести 1,5 мкл матрицы, рекомендованной производителем. После полного высыхания матрицы мишень поместить в масс-спектрометр и создать проект с указанием точек для идентификации и данные по образцу [43, 46].

Программное обеспечение масс-спектрометра после снятия и обработки масс-спектра микроорганизма и сравнения с базой данных, выведет результат идентификации в виде таблицы и с коэффициентом достоверности (score). Уровень достоверности идентификации выше 2,0 свидетельствует о точной видовой идентификации (приложение 3). После идентификации необходимо отколоть колонию идентифицированного микроорганизма на пластину агар, соответствующего первоначальному для выделения чистой культуры и через 24-48 часов инкубации провести подтверждение культуры методом экстракция белков с использованием муравьиной кислоты. Для этого необходимо внести в пробирку 300 мкл деонизированной воды, микробиологической петлей диаметром 1 мм внести 5-7 изолированных колоний микроорганизма и плавным движением суспендировать. Дальнейшие манипуляции с пробиркой можно проводить в условиях обычной атмосферы. К суспензии добавить 900 мкл 96 %-го этилового спирта, полученную смесь тщательно перемешивают на микроцентрифуге-вортексе. После перемешивания пробирки помещают в центрифугу и центрифугируют в течение 2 мин при 13 000 об./мин. Полученный супернатант аккуратно, не задевая осадка, отбирают одноразовым наконечником и сливают в емкость с дезинфицирующим раствором. Для удаления остатков раствора этанола необходимо повторить центрифугирование осадка, после супернатант аккуратно, не задевая осадка, отобрать одноразовым наконечником и слить в емкость с дезинфицирующим раствором.

К осадку добавить 25 мкл 70 %-го водного раствора муравьиной кислоты, полученную смесь тщательно перемешать пипетированием или с помощью микроцентрифуги-вортекса. К суспензии добавить равный объем ацетонитрила и смесь повторно тщательно перемешать. После перемешивания пробирки поместить в центрифугу и центрифугировать в течение 2 мин при 13 тыс. об./мин. В лунку MSP-мишени внести 1-1,5 мкл полученного супернатанта.

Таблица 2 - Примерное количество 70 % муравьиной кислоты и ацетонитрила в зависимости от объема бактериальной культуры

Реактив	Бактериологическая петля		Колонии	
	10мкл	1 мкл	Большая одиночная	Маленькая одиночная или ½ большой одиночной
70% муравьиная кислота	>40-80 мкл	20-40 мкл	10-20 мкл	1-5 мкл
Ацетонитрил	>40-80 мкл	20-40 мкл	10-20 мкл	1-5 мкл

Для получения достоверного результата для каждой исследуемой единицы (колония, штамм) использовать не менее 3-х лунок. Сразу после высыхания нанесенной на MSP-мишень капли супернатанта сверху нанести 1,5-2,0 мкл матрицы. Экстракцию белков можно провести с использованием трифторуксусной кислоты (особенно подойдет метод для идентификации спорообразующих бактерий). Для проведения идентификации с помощью трифторуксусной кислоты необходимо после снятия колоний в 300 мкл деионизованной воды добавить 50 мкл 80 %-й трифторуксусной кислоты и после перемешивания пипетированием инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем добавить 150 мкл ультрачистой деионизованной воды и 200 мкл ацетонитрила, перемешать пипетированием и центрифугировать в течение

2-х минут при 13 000 об./мин. В лунку MSP-мишени вносится 1-1,5 мкл полученного супернатанта. Для получения достоверного результата для каждой исследуемой единицы (колония, штамм) необходимо использовать не менее 3-х лунок. Сразу после высыхания нанесенной на MSP-мишени капли супернатанта сверху нанести 1,5-2,0 мкл матрицы и после полного высыхания поместить матрицу в прибор для проведения времяпролетной масс-спектрометрии. Для получения одиночного масс-спектра необходимо использовать 40 импульсов лазера (частота 60 Гц), анализируемый диапазон масса/заряд составляет 2 000-20 000 Да. С каждой лунки MSP-мишени снимается исходный спектр, представляющий собой сумму шести одиночных спектров (240 импульсов лазера). Для получения достоверных результатов идентификации с каждого образца необходимо получить не менее трех исходных спектров. С помощью программ проводится автоматическая идентификация на основании сравнения собранных исходных спектров с референсными спектрами базы данных. Достоверность полученных результатов характеризуется значением «Score» и соответствующим цветовым, символьным и буквенным обозначением. По окончании процесса идентификации программа отображает результат идентификации, приводя наиболее релевантную исходному спектру таксономическую единицу базы данных, с указанием значения коэффициента соответствия – Score.

Таблица 3 – Интерпретация достоверности полученной идентификации

Диапазон Score	Описание	Символы	Цвет
2.200—3.000	Высокий уровень видовой идентификации	(+++)	Зеленый
2.000—2.199	Надежная родовая идентификация, возможная видовая идентификация	(++)	Зеленый
1.700—1.999	Возможная родовая идентификация	(+)	Желтый
0.000—1.699	Ненадежная идентификация	(-)	Красный

Результаты идентификации помечены одним из трех цветов: зеленый, желтый или красный (таблица 3). После завершения процесса идентификации результат выводится в таблицу классификации, показывающую наилучший результат идентификации полученных спектров.

5.13. Изучение чувствительности облигатно анаэробных микроорганизмов к антибактериальным препаратам

Антибактериальное лечение анаэробных инфекций начинают эмпирически до получения окончательных результатов бактериологического исследования. Однако при лечении инфекций, не поддающихся терапии эмпирически выбранными препаратами, необходимо определение чувствительности возбудителя, которое возможно проводить следующими методами:

1) метод элюции из диска с оценкой по пограничной концентрации. Необходимое количество дисков (таблица 4), выпускаемых промышленностью для определения чувствительности бактерий, вносят в пробирку с 5 мл обогащенной среды для контроля стерильности (бульон Шадлера или тиогликолевую среду). Через 2 часа после завершения диффузии антибиотика в питательную среду в пробирки вносят 2 капли суточной культуры. Пробирки встряхивают, инкубируют 48 часов при 37°C в анаэробных условиях и учитывают результаты.

Таблица 4 - Концентрации антибактериальных препаратов, используемых при определении чувствительности методом элюции из дисков

препарат	содержание препарата в диске (мкг)	количество дисков на 5 мл среды	конечные концентрации антибиотиков (мкг/мл)
Пенициллин С ₁	6 (10 ЕД)	1	1,2 (2 ЕД)
Ампициллин	10	2	4
Карбенициллин	100	3	60
Цефалексин	30	2	12
Левомецетин	30	2	12
Тетрациклин	30	1	6
Эритромицин	15	1	3

Клиндамицин <*>	2	4	1,6
Метронидазол <*>	80	1	16

<*> Диски могут изготавливаться в лаборатории

Чувствительными считает штаммы, не выросшие при данной концентрации антибиотиков или дающие мутность $\leq 50\%$ по сравнению с контролем. Данная методика позволяет легко менять тест-концентрации путем изменения объема среды или количества дисков (но не более 5 дисков на 5 мл среды).

2). Определение чувствительности микроорганизма с помощью Е-теста. В месте пересечения эллипсоидной зоны подавления роста с полоской Е-теста получают значение минимальной подавляющей концентрации (МПК).

В 1997 г. произошли серьезные изменения в стандартных подходах к определению чувствительности анаэробных бактерий, выявленные тенденции роста антибиотикорезистентности возбудителей анаэробных инфекций позволили выработать основные показания к определению их чувствительности для мониторинга локальных и региональных тенденций резистентности с целью рационализации эмпирического выбора антибиотиков, выявления резистентности к новым антибактериальным препаратам и оценки возможности их использования в клинической практике. Исследование чувствительности облигатно анаэробных бактерий к антимикробным препаратам проводится в соответствии с актуальными документами по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (<https://www.eucast.org/> и <https://www.antibiotic.ru/minzdrav/category/clinical-recommendations/>). Для определения чувствительности анаэробных бактерий следует использовать один из методов определения минимальной подавляющей концентрации (МПК). Критерии интерпретации результатов для диско-диффузионного метода не установлены.

При использовании коммерческих систем для определения МПК необходимо следовать инструкциям производителя. Методы разведения основаны на использовании двойных последовательных разведений концентраций антибиотика от максимальной к минимальной (например, от 64 мкг/мл, и т.д. до 0,5 мкг/мл, 0,25 мкг/мл и 0,125 мкг/мл). Первую наименьшую концентрацию антибиотика (из серии последовательных разведений), где визуально не определяется бактериальный рост принято считать минимальной ингибирующей (подавляющей) концентрацией (МИК/МПК). Измеряется МИК в мкг/мл. Метод серийных разведений в плотной питательной среде применяется для одновременного определения чувствительности большого количества штаммов. Двукратные разведения антибактериальных препаратов вносят в растопленный и остуженный до 50°C анаэробный гемагар (агар Шадлера, среду Вилкинса-Чалгрена). После застывания чашки подсушивают и используют немедленно или выдерживают в микроанаэроостате при комнатной температуре. Суточную культуру исследуемого организма в обогащенной среде для контроля стерильности разводят этой же регенерированной средой до мутности $1,5 \times 10^8$ КОЕ в 1 мл и с помощью репликатора (петли) наносят на поверхность агара. Для контроля правильности определения минимальной подавляющей концентрации в набор штаммов рекомендуется включать анаэробные микроорганизмы с известной чувствительностью.

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности облигатно анаэробных микроорганизмов к антибактериальным препаратам, а также пограничные значения МПК (мг/л) представлены в таблицах приложения 1.

Таблица 5 - Природная резистентность и редкие фенотипы

Микроорганизм	Правило
<i>Bacteroides</i> spp.	Из перечня редких (необычных) фенотипов удалена резистентность к карбапенемам
<i>Clostridioides difficile</i>	В перечень редких (необычных) фенотипов добавлена

	резистентность к фидаксомицину
Грамположительные анаэробы	природная резистентность к азтреонаму, темоциллину, полимиксину В/колистину и налидиксовой кислоте
<i>Clostridium ramosum</i>	Природная резистентность к ванкомицину
<i>Clostridium innocuum</i>	Природная резистентность к ванкомицину
<i>Bacteroides spp</i>	Редкие фенотипы резистентны к метронидазолу
<i>Clostridioides difficile</i>	Редкие фенотипы резистентны к ванкомицину

6. ИССЛЕДОВАНИЕ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ОТСУТСТВИИ БЕСКИСЛОРОДНЫХ ГАЗОВ

При отсутствии бескислородных газов и микроанаэроустатов культивирование анаэробов возможно проводить на жидких средах, разлитых в пробирки высоким столбиком (высотой 6 - 7 см). Среда перед использованием восстанавливают и наслаивают 0,5 мм глицерина.

При инкубации в аэробных условиях кислород диффундирует на 1,5 - 2 см от поверхности, а в средней и нижней трети питательной среды сохраняются анаэробные условия. Обнаружение в жидких питательных средах микроорганизмов, не растущих при последующих посевах на кровяной агар, а также микроскопическое исследование позволяет сделать заключение о присутствии среди возбудителей строгих анаэробов.

Ход исследования.

1. Микроскопия нативного материала и исследование в лучах ультрафиолетового света.
2. Исследуемую пробу засевают одновременно на несколько сред:
 - а) питательную среду для контроля стерильности или обогащенную питательную среду для контроля стерильности или тиогликолевую среду - элективную для роста аэробных и анаэробных микроорганизмов;
 - б) среду для контроля стерильности или тиогликолевую среду с налидиксовой кислотой - для выделения анаэробов из ассоциаций с колиформными бактериями;

в) среду для контроля стерильности или тиогликолевую среду, содержащую канамицин и желчь - для селективного выделения бактероидов группы *Bacteroides fragilis*.

Посевы инкубируют в термостате в обычной атмосфере при 37°C в течение 2 - 7 дней.

3. При появлении видимого роста из каждой среды готовят мазки и производят высев на 5% кровяной агар. Посевы инкубируют при 37°C в обычной атмосфере и в CO₂-инкубаторе 24 - 48 часа.

4. Учет результатов посевов.

Оценка результатов первичного посева и высевок на кровяной агар представлена в таблице 6. При наличии в пробе только штаммов *Bacteroides fragilis* рост наблюдается во всех жидких средах, но отсутствует в пересевах на 5% кровяной агар. Если в исследуемом материале присутствуют микроаэрофилы или факультативные анаэробы, то на кровяном агаре, инкубируемом в термостате или CO₂-инкубаторе, будет получен рост бактерий.

Таблица 6 - Оценка результатов посева на селективные и селективные питательные среды

Тиогликолевая среда		Тиогликолевая среда с налидиксовой кислотой		Тиогликолевая среда с канамицином и желчью		оценка результатов посева	
первичный посев	высев на кровяной агар	первичный посев	высев на кровяной агар	первичный посев	высев на кровяной агар	наличие анаэробов	наличие аэробов
+	-	+	-	+	-	присутствуют анаэробы группы <i>B. fragilis</i>	отсутствуют
+	+	+	-	+	-	-	энтеробактерии
+	+	+	+	+	-	-	грамположительные бактерии
+	-	+	-	-	-	присутствуют анаэробы, не относящиеся	отсутствуют

						к группе <i>B. fragilis</i>	
+	+	+	-	-	-	-	энтеробактерии
+	+	+	+	-	-	-	грамположительные бактерии

(+) - наличие роста

(-) - отсутствие роста

Таким образом даже при отсутствии анаэробной техники возможна бактериологическая диагностика анаэробной инфекции. В этом случае отчет бактериолога ограничивается указанием на наличие в исследуемом материале бактериоидов группы *Bacteroides fragilis*, других анаэробных грамотрицательных палочек, анаэробных кокков или грамположительных анаэробных палочек.

7. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

7.1. Контроль анаэробноза

Для контроля анаэробноза в микроанаэроостате или анаэробной рабочей станции используют один из следующих способов:

а) Пробирку со скошенной цитратной средой Симмонса, засеянной культурой *Pseudomonas aeruginosa*. В строго анаэробных условиях среда сохраняет зеленый цвет, а при наличии кислорода *Pseudomonas aeruginosa* утилизирует цитрат и цвет среды меняется на синий.

б) Прокипяченную 5 минут и быстро остуженную пептонно-дрожжевую среду или среду для контроля стерильности или тиогликолевую среду, в которые добавлен резазурин в концентрации 1 мкг/мл. В анаэробных условиях индикатор бесцветен, а при наличии кислорода верхняя часть питательной среды приобретает розовый оттенок;

в) Среду для контроля стерильности или тиогликолевую среду, в которую добавлено 2 - 3 капли 1% водного раствора метиленового синего. В анаэробных условиях среда обесцвечивается; при контакте с кислородом воздуха верхний слой среды приобретает зеленовато-синеватое окрашивание.

г) Коммерческие тесты для контроля анаэробноз.

При наличии в системе кислорода проверяют герметичность микроанаэрозоата или анаэробной рабочей станции, резиновых шлангов и исправность вакуумного насоса.

7.2. Внутривлабораторный контроль качества исследования

Порядок ведения внутреннего контроля качества, периодичность и частота выполняемых процедур устанавливается действующей в лаборатории системой менеджмента качества в соответствии с нормативной документацией [29, 30, 48, 50, 52, 53]. Внутривлабораторный контроль качества включает преаналитический, аналитический и постаналитический этапы ведения лабораторных исследований. Необходимо также проводить периодические, не реже 1 раза в год проверку технической компетентности персонала лаборатории. Документальное оформление результатов проведенных контрольных процедур осуществляется по утвержденным действующей системой менеджмента качества формам. Регистрация проведения контроля должна осуществляться на всех уровнях: преаналитическом, аналитическом и постаналитическом, для каждого этапа должны быть разработаны и документированы правила проведения всех процедур. Регистрация и хранение контрольных результатов могут осуществляться на электронных носителях.

Контроль преаналитического этапа должен быть выполнен при сборе образца, хранении, доставке, ручной обработки и регистрации. Для этого должны быть разработаны стандартные операционные процедуры (СОП) для сотрудников лаборатории и медицинского персонала учреждения, с информацией о процедуре взятия биоматериала, условиях и сроках хранения проб, и правилах безопасной транспортировки. Процедура ведения аналитического этапа регламентирует порядок контроля за соблюдением требований к условиям проведения анализа (лабораторные помещения, воздушная среда, температурные режимы инкубации и хранения, режимы дезинфекции и стерилизации и т.д.), выполнение процедуры ведения контрольных штаммов бактериальных культур, контроль качества питательных сред, контроль качества тест-систем и реагентов, контроль качества дистиллированной воды. Контроль качества материалов и оборудования включает: соблюдение сроков годности реактивов и наборов реагентов, наличие на рабочем месте СОП по эксплуатации каждого прибора, наличие журналов регистрации сервисного обслуживания и ремонта оборудования.

Для ведения контроля качества аналитического этапа микробиологической диагностики анаэробной инфекции, необходимо наличие в лаборатории коллекции контрольных штаммов типовых культур:

- *Bifidobacterium breve* ATCC 15698,
- *Bifidobacterium infantis* ATCC 25962,
- *Bifidobacterium bifidum* ATCC 15696,
- *Bacteroides fragilis* ATCC 25285,
- *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482,
- *Bacteroides melaninogenicus* ATCC 25611,
- *Clostridium perfringens* ATCC 13123,
- *Clostridium perfringens* ATCC 13124,

- *Clostridium perfringens* ATCC 10543,
- *Clostridium butyrium* ATCC 9690,
- *Clostridium sporogenes* ATCC 13124.

Проведение контроля качества постановки антибиотикочувствительности необходимо ввести с применением соответствующего контрольного штамма.

Индикаторами качества постаналитического этапа исследования являются: интерпретация и оценка результатов анализа, предоставление отчета исследования, клиническое использование результатов анализа, уровень возникновения гнойно-воспалительных процессов, ассоциированных с облигатно анаэробными микроорганизмами, обобщенные сведения о чувствительности облигатно анаэробных бактерий к антимикробным препаратам с возможностью выбора альтернативной адекватной терапии.

7.3. Внешняя оценка качества исследования

Лабораториям рекомендовано участвовать в программах внешней оценки качества для подтверждения правильности своих результатов лабораторных исследований и возможности их сопоставления с результатами других лабораторий. Организации, аккредитованные для проведения межлабораторной оценки качества выполнения лабораторных исследований периодически (два раза в год) рассылают контрольные образцы для определения правильности проводимых микробиологических исследований. Лаборатория, получив данные сравнительной оценки правильности выполнения исследования, при неудовлетворительной оценке результатов должна принимать соответствующие меры для исправления своих ошибок.

Применения методов микробиологической диагностики инфекций, вызванных облигатно анаэробными микроорганизмами, выполнение их в установленные сроки и с высокой результативностью необходимо для реализации критериев оценки качества медицинской помощи.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1.

Таблицы с числовыми значениями пограничных критериев определения чувствительности

Критерии оценки чувствительности Грамположительные анаэробные бактерии (кроме *S. difficile*). Критерии интерпретации результатов определения чувствительности: пограничные значения МПК (мг/л). *EUCAST v11 2021 (European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing); Клинические Рекомендации по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (версия 2021 – 1).*

Антибактериальный препарат	Пограничные значения МПК (мг/л)		Примечания Цифрами обозначены примечания, относящиеся к общим комментариям и/или пограничным значениям МПК.
	Ч ≤	Р >	
Бензилпенициллин ²	0,25	0,5	1. Пограничные значения для оценки чувствительности грамположительных анаэробных бактерий установлены для в/в применения 2. Чувствительность к незащищенным ампициллину, амоксициллину и пиперациллину оценивается на основании результатов определения чувствительности к бензилпенициллину. 2. Для определения чувствительности используется фиксированная концентрация сульбактама - 4 мг/л. 3. Для определения чувствительности используется фиксированная концентрация клавулановой кислоты - 2 мг/л. 4. Для определения чувствительности используется фиксированная концентрация тазобактама - 4 мг/л.
Ампициллин ²	4	8	
Ампициллин/сульбактам	4 ²	8 ²	
Амоксициллин ²	4	8	
Амоксициллин/клавулановая кислота	4 ³	8 ³	
Пиперациллин ²	8	16	
Пиперациллин/тазобактам	8 ⁴	16 ⁴	
Тикарциллин ²	8	16	
Тикарциллин/клавулановая кислота	8 ³	16 ³	
Дорипенем	1	1	
Эртапенем	0,5	0,5	
Имипенем	2	4	
Имепенем-релебатам ²	2 ¹	2 ¹	1. Для определения чувствительности используется фиксированная концентрация релебактама - 4 мг/л. 2. Назначение ингибиторозащищенных бета-лактамов не обеспечивает

			<i>клинического преимущества.</i>
Меропенем	2	8	
Ванкомицин	2	2	
Клиндамицин	4	4	
Доксициклин	Имеются данные о клинической эффективности тетрациклинов в отношении анаэробных бактерий при интраабдоминальных инфекциях смешанной этиологии. Однако корреляции между значением МПК, ФК/ФД параметрами и исходами терапии не установлены.		
Миноциклин			
Тетрациклин			
Тигециклин			
Хлорамфеникол	8	8	
Метронидазол	4	4	

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *Clostridioides difficile*: пограничные значения МПК (мг/л) *EUCAST v11 2021 (European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing)*; *Клинические Рекомендации по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (версия 2021 – 1)*.

Антибактериальный препарат	Пограничные значения МПК (мг/л)		Примечания Цифрами обозначены примечания, относящиеся к общим комментариям и/или пограничным значениям МПК.
	Ч ≤	Р >	
Моксифлоксацин	С терапевтической целью не используется. Определение чувствительности проводится только в целях эпидемиологического мониторинга (ЕСOFF 4 мг/л)		
Ванкомицин	2	2	Пограничные значения основаны на значениях эпидемиологической точки отсечения (ЕСOFF) и применимы при пероральной терапии ванкомицином инфекций, ассоциированных с <i>C. difficile</i> . Убедительные клинические данные о связи между МПК и исходами терапии не обнаружены.
Тигециклин	Для определения МПК тигециклина методом микроразведений в бульоне следует использовать свежую среду, приготовленную в день проведения исследования. 2. С терапевтической целью не используется. Определение чувствительности проводится только в целях эпидемиологического мониторинга (эпидемиологическая точка отсечения (ЕСOFF 0,25 мг/л).		
Даптомицин	Для определения МПК даптомицина среда должна содержать Са ²⁺ (для метода микроразведений в бульоне – в конечной концентрации 50 мг/л; метод разведений в агаре не валидирован). При использовании коммерческих систем необходимо следовать инструкциям производителя. 2. С терапевтической целью не используется. Определение		

	чувствительности проводится только в целях эпидемиологического мониторинга (ЕСOFF 4 мг/л).	
Фузидиевая кислота	С терапевтической целью не используется. Определение чувствительности проводится только в целях эпидемиологического мониторинга (ЕСOFF 2 мг/л)	
Фидаксомицин	Пограничные концентрации и ЕСOFF для фидаксомицина не установлены, так как имеющиеся данные показывают значительные вариации по распределению МПК между исследованиями.	
Метронидазол	2	2 Пограничные значения установлены на уровне значения эпидемиологической точки отсечения (ЕСOFF), которое разграничивает изоляты "дикого типа" от изолятов со сниженной чувствительностью
Рифампицин	С терапевтической целью не используется. Определение чувствительности проводится только в целях эпидемиологического мониторинга (ЕСOFF 0,004 мг/л).	

Грамотрицательные анаэробные бактерии. Критерии интерпретации результатов определения чувствительности: пограничные значения МПК (мг/л). *EUCAST v11 2021 (European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing); Клинические Рекомендации по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (версия 2021 – 1).*

Антибактериальный препарат	Пограничные значения МПК (мг/л)		Примечания Цифрами обозначены примечания, относящиеся к общим комментариям и/или пограничным значениям МПК.
	Ч ≤	Р >	
Бензилпенициллин ¹	0,25	0,5	1. Чувствительность к незащищенным ампициллину, амоксициллину и пиперациллину оценивается на основании результатов определения чувствительности к бензилпенициллину. 2. Для определения чувствительности используется фиксированная концентрация сульбактама - 4 мг/л. 3. Для определения чувствительности используется фиксированная концентрация клавулановой кислоты - 2 мг/л. 4. Для определения чувствительности используется фиксированная концентрация тазобактама - 4 мг/л
Ампициллин ¹	0,5	2	
Ампициллин/сульбактам	4 ²	8 ²	
Амоксициллин ¹	0,5	2	
Амоксициллин/клавулановая кислота	4 ³	8 ³	
Пиперациллин ¹	16	16	
Пиперациллин/тазобактам	8 ⁴	16 ⁴	
Тикарциллин ¹	16	16	
Тикарциллин/клавулановая кислота	8 ³	16 ³	
Клиндамицин	4	4	
Доксициклин	Имеются данные о клинической эффективности тетрациклинов в отношении анаэробных бактерий при		
Миноциклин			

Тетрациклин	интраабдоминальных инфекциях смешанной этиологии. Однако корреляции между значением МПК, ФК/ФД параметрами и исходами терапии не обнаружено. По этой причине пограничные значения для клинической интерпретации не приводятся.		
Тигециклин			
Хлорамфеникол	8	8	
Метронидазол	4	4	

Если МПК эритромицина для *Peptostreptococcus spp.* >8 мг/л, а для *Bacteroides spp.* >32 мг/л, но изолят чувствителен к клиндамицину, то штамм расценивается как резистентный к клиндамицину. Резистентность к макролидам у *Peptostreptococcus spp.* и *Bacteroides spp.* обычно связана с продукцией рибосомных erm метилаз, обуславливающих MLSB фенотип. В случаях индуцибельной MLSB резистентности устойчивость к клиндамицину плохо выявляется *in vitro*, поэтому данный препарат не должен рассматриваться как клинически эффективный.

Материально-техническое оснащение, необходимое для выполнения исследования

Наименование медицинских изделий, оборудования, мебели	Наименование реактивов и расходных материалов
Базисное оснащение	
Ламинарный бокс 2 класса биологической безопасности, оснащенный HEPA-фильтром	Контейнер стерильный с завинчивающейся крышкой для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов
Микроанаэростат	Градиентные полоски E-test для определения чувствительности к антибиотикам
Анаэробная рабочая станция	Азот, газовая анаэробная смесь
Микроскоп бинокулярный с иммерсионным объективом	Пробирка стерильная с транспортной средой, с аппликатором для взятия биологических образцов
Термостат электрический	Чашки Петри одноразовые стерильные
Автоклав для стерилизации питательных сред или автоматическая средоварочная машина	Петли микробиологические диаметром 1 и 10 мкл (стерильные или многоразовые)
Автоклав для утилизации отработанного материала	Шпатели Дригальского стерильные
Сухожаровой шкаф	Стекла предметные
Холодильник для хранения готовых питательных сред, биологических субстратов и реагентов	Пипетки пластиковые пастеровские стерильные
Стерилизаторы микробиологических петель	Микропробирка, стерильная
Дистиллятор	Стерильный ватный тампон
Электрическая плита	Наконечники для дозаторов полуавтоматических
Бактерицидные лампы или облучатель-рециркулятор	Пакеты для автоклавирования
Стол лабораторный химический	Набор реагентов для окраски мазков по Граму
Стандарт мутности по МакФарланду или прибор (спектрофотометр) для определения мутности суспензии микроорганизмов	Иммерсионное масло
Дозаторы переменного объема полуавтоматические	Питательная среда основа кровяного агара для неселективного культивирования прихотливых бактерий
Контейнеры для сброса отходов	Кровь (баранья, лошадиная) дефибринированная для питательных сред, стерильная
Емкости с дезинфицирующим раствором	Реагенты для определения уреазной, каталазной и оксидазной активности
этиловый 95 ⁰	Флакон с питательной средой для посева

	стерильного биоматериала (кровь)
Перчатки нестерильные	Необходимый запас питательных сред (основы) для культивирования облигатно анаэробных микроорганизмов
Маска трехслойная одноразовая	Антибактериальные субстанции
Клип-берет одноразовый лабораторный	Карандаши восковые, алмазные карандаши, водостойкие фломастеры
<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15698	
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 25962	
<i>Bifidobacterium bifidum</i> ATCC 15696	
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	
<i>Bacteroides melaninogenicus</i> ATCC 25611	
<i>Clostridium butyrium</i> ATCC 9690	
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13123, <i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124, <i>Clostridium perfringens</i> ATCC 10543	
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 13124	
Дополнительное оснащение	
Автоматизированное рабочее место (сканер штрих кодов, компьютер с ЛИС, принтер)	Готовые питательные среды в чашках Петри
Анализатор для гемокультивирования	
Анализатор для идентификации по биохимическим свойствам или белковому спектру и/или определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам	Иммунохроматографический тест для экспресс диагностики токсинов А и В <i>C.difficile</i>
Анализатор для проведения полимеразно-цепной реакции в режиме «реального времени»	Картридж Xpert CD для экспресс-диагностики <i>C.difficile</i>
Анализатор Gene Xpert	Тест-панель для идентификации и определения антибиотикочувствительности одного штамма микроорганизма на анализаторе
Автоматический прибор для учета результатов определения чувствительности диско-диффузионным методом	Дополнительные реагенты для инокуляции суспензии культур микроорганизмов на тест-панель
Низкотемпературный холодильник	Реактивы для проведения биохимической идентификации микроорганизмов на тест – панель
Вортекс	Реактив матрица для белковой экстракции
Криопробирки или питательная среда триптиказо-соевый бульон для заморозки культур бактерий, составная агаризированная среда для криоконсервации	

Приложение 3.

Идентификация облигатно анаэробных микроорганизмов

Дифференциальные признаки грамотрицательных анаэробных бактерий

Микроорганизм	Морфология клеток	Морфология колоний	флуоресценция	кагалаза	канамицин	полимиксин В	ристомин	желчь	нитраты	эскулин	желатина	индол	глюкоза	рамноза	трегалоза	сахароза	арабиноза
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Группа <i>Bacteroides fragilis</i>																	
<i>Bacteroides fragilis</i>	плеоморфные, грамотрицательные палочки, неравномерно окрашенные	1 - 3 мм, белые или серовато-жемчужные, ровные, выпуклые	-	+	У	У	У	У	-	+	+	-	+	-	-		
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>			-	+	У	У	У	У	-	+	+	+	+	+	+		
<i>Bacteroides distasonis</i>			-	+	У	У	У	У	-	+	+	-	+	±	+		
<i>Bacteroides vulgatus</i>			-	-	У	У	У	У	-	-/+	+	-	+	+	-		
Другие бактероиды																	
<i>Bacteroides bivulus/disiens</i>	плиоморфные	1 - 2 мм, округлые, выпуклые,	-	-	У	Ч/У	Ч/У	Ч	-	-	+	-	+			-	-
<i>Bacteroides oralis</i>	коккобациллы	прозрачные	-	-	У	Ч/У	Ч/У	Ч	-	+	+	-	+			+	-
<i>Bacteroides ruminicola</i>	длинные, плеоморфные	плоские, неровные	-	-	У	Ч/У	Ч/У	Ч	-	+	+	-	+			+	+
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	мелкие, тонкие палочки	мелкие, выпуклые, вырастают в агар	-	-/+	Ч	Ч	У	Ч	+	-	+	-	-			-	-
Флуоресцирующие бактерии																	
<i>Bacteroides asaccharolyticus</i>	мелкие грамотрицательные палочки или коккобациллы	0,5 - 2 мм; старые культуры коричневого или черного цвета	+	-	У	Ч/У	У ^ч	Ч	-	-	-	+	-				
<i>Bacteroides intermedius</i>			+	-	У	Ч/У	У ^ч	Ч	-	-	-	+	+				
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>			+	-	У	Ч/У	У ^ч	Ч	-	+	-	-	+				

Фузобактерии																	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	плеоморфные	выпуклые непрозрачным центром и прозрачными краями	с	-	-	Ч	Ч	У	У	-	+	-	-	+			
<i>Fusobacterium varium</i>			и	-	-	Ч	Ч	У	У	-	-	-	+	+			
<i>Fusobacterium necrophorum</i>				±	-	Ч	Ч	У	Ч	-	-	-	+	-			
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	длинные заостренными концами	с	напоминают хлебные крошки	±	-	Ч	Ч	У	Ч	-	-	-	+	-			
Вейдонеллы																	
<i>Veillonella parvula</i>	мелкие кокки	мелкие прозрачные		- +	±	Ч	Ч	У	Ч	+	-	-	-	-			

А - анаэробные бактерии; Ф – факультативные; М - микроаэрофильные
 ч – чувствительны; у – устойчивы; р - различные реакции
 (-)-отрицательная реакция; (+)-положительная реакция; (+-)-большинство штаммов дают положительную реакцию;
 (-+)-большинство штаммов дают отрицательную реакцию; (.)-нет данных
 "СТ" - субтерминальные споры; Т - терминальные споры

Дифференциальные признаки анаэробных грамположительных кокков

Микроорганизмы	морфология клеток	морфология колоний	каталаза	нитраты	эскулин	желатина	индол	глюкоза	лактоза	сахароза
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i>	Грамположительные кокки, расположены поодиночке или небольшими группами	мелкие, выпуклые, серовато-белые, непрозрачные с ровными краями	Р	-	-	-	+	-	-	-
<i>Peptostreptococcus magnus</i>			Р	-	-	Р	-	-	-	-
<i>Anaerococcus prevotii</i> (синонимы: <i>Peptococcus prevotii</i> / <i>Peptostreptococcus prevotii</i>)			Р	-	-	-	-	-	-	-

<i>Peptococcus saccharolyticus</i> (<i>Staphylococcus saccharolyticus</i> , 1981)[54]			+	+ ⁻	-	+ ⁻	-	+	-	-
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	грамположительные (иногда переменные)		-	- ⁺	-	-	-	+	-	-
<i>Peptostreptococcus micros</i>	кокки или коккобациллы,		-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Peptostreptococcus parvulus</i>	расположены сферами или цепями		-	-	-	+	-	+	+	-
<i>Peptostreptococcus productus</i> [55,56]			-	-	+	-	-	+	+	+

A - анаэробные бактерии

Ф – факультативные

M - микроаэрофильные

ч – чувствительны

у – устойчивы

p - различные реакции

(-)-отрицательная реакция

(+)-положительная реакция

(+)-большинство штаммов дают положительную реакцию

(-+)-большинство штаммов дают отрицательную реакцию

(.)-нет данных

"СТ" - субтерминальные споры

T - терминальные споры

Дифференциальные признаки анаэробных неспорообразующих грамположительных кокков

Микроорганизмы	морфология клеток	морфология колоний	аэротолерантность	подвижность	катализаторы	нитраты	эскулин	желатина	индол	глюкоза	маннит	лактоза	сахароза	арабиноза
1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	16
<i>Actinomyces israelii</i>	длинные, тонкие некоторые в форме булавы или разветвленные	неровные, имеют форму молярного зуба после 5 - 7 дней инкубации	АМ	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
<i>Actinomyces nasalundii</i>	длинные, тонкие, много коротких разветвлений	шероховатые или гладкие, приподнятые, неровные	МФ	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	короткие, тонкие с раздвоенными концами	белые, гладкие с ровными краями	А	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>Bifidobacterium eriksonii</i>	короткие, в форме булавы или с раздвоенными концами	белые, блестящие	А	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>Eubacterium elactolytioum</i>	плеоморфные, расположены V	непрозрачные, блестящие	А	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>Eubacterium lentum</i>	плеоморфные коккобациллы, расположены цепями	непрозрачные, гладкие с неровным краем	А	-	±	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eubacterium limosum</i>	плеоморфные, расположены парами или коротким цепями	от прозрачных до белых с ровным краем	А	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
<i>Cutibacterium acnes</i>	плеоморфные палочки;	белые, розовые или желтоватые	А	-	+	+	-	+	+	+	Р	-	-	<...>

<i>(Propionibacterium acnes)</i>	булавовидные, кокковидные или разветвленные. Расположены группами	непрозрачные с ровными краями												
----------------------------------	---	-------------------------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

А - анаэробные бактерии

Ф – факультативные

М - микроаэрофильные

ч – чувствительны

у – устойчивы

р - различные реакции

(-)-отрицательная реакция

(+)-положительная реакция

(+-)-большинство штаммов дают положительную реакцию

(-+)-большинство штаммов дают отрицательную реакцию

(.)-нет данных

"СТ" - субтерминальные споры

Т - терминальные споры

Дифференциальные признаки грамположительных спорообразующих палочек

Микроорганизм	Морфология клеток	Морфология колоний	споры	подвижность	лецитиназа	липаза	нитраты	эскулин	желатина	индол	глюкоза	маннит	лактоза
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Paraclostridium bifermentans</i> (<i>Clostridium bifermentans</i>)	палочки с овальными спорами	серые, с неровными краями с узкой зоной гемолиза	СТ	+	+	-	-	Р	+	+	+	-	-
<i>Clostridium botulinum</i>	крупные палочки с овальными спорами	различная, гемолитические	СТ	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>Clostridium butyricum</i>	закругленные или обрубленные концы, крупные споры	плоские, серые колонии с неровными краями	СТ	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>Clostridium cadaveris</i>	грамположительные палочки	гладкие или шероховатые типы колоний	Т	+	-	-	-	-	Р	+	+	-	-
<i>Lachnoclostridium clostriliforme</i> (<i>Clostridium clostriliforme</i>)	палочки с заостренными концами	мелкие, выпуклые, прозрачные с испещренной поверхностью	"СТ"	Р	-	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>Clostridioides difficile</i>	овальные терминальные споры	немного выпуклые, белые, блестящие	СТ, Т	Р	-	-	-	+	-	-	+	+	-
<i>Clostridium histalyticum</i>	плеоморфные палочки, овальные споры	гладкие и шероховатые колонии, шероховатые с зазубренными краями	СТ	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Clostridium limosum</i>	палочки размером 0,6–1,6х1,7–16мкм, встречаются	имеют размер 1-4 мм, β-гемолитические, от круглой до неправильной, от	СТ	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-

	одиночными, парами или короткими цепочками. Споры овальные / центральные или субтерминальные	выпуклой до выпуклой, полупрозрачной, серой, блестящей или тусклой, с мозаичной или зернистой структурой и цельным зубчатым или волнистым краем												
<i>Clostridium novyi, munitum</i>	палочки с овальными спорами	серые, прозрачные с неровной поверхностью, гемолитические	СТ	+	+	+	- +	Р	+	-	+	-	-	
<i>Clostridium perfringens</i>	крупные палочки с обрубленными концами	плоские, серые, непрозрачные с двойной зоной гемолиза	"СТ"	-	+	-	+	Р	+	-	+	-	+	
<i>Clostridium ramosum</i>	плеоморфные палочки со вздутиями	выпуклые, белые, блестящие	"Т"	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	
<i>Clostridium septicum</i>	длинные, тонкие с закругленными концами	полупрозрачные с неровными, бахромчатыми краями, гемолитические	"СТ"	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	
<i>Clostridium sordellii</i>	палочки с овальными спорами	серые, с неровным расползающимся краем, узкой зоной гемолиза	СТ	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	
<i>Clostridium sporogenes</i>	овальные споры, в старых культурах нитевидные формы	приподнятый серовато-желтый центр, края неровные	СТ	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	
<i>Clostridium tertium</i>	больше овальные споры	маленькие, прозрачные, блестящие	Т	+	-	-	±	+	-	-	+	+	+	
<i>Clostridium tetani</i>	тонкие палочки с круглыми терминальными спорами	прозрачные, серые, с неровными краями и узкой зоной гемолиза	Т	+	-	-	-	-	+	Р	-	-	-	

А - анаэробные бактерии; Ф – факультативные; М - микроаэрофильные.

Ч – чувствительны; у – устойчивы; р - различные реакции.

(-)-отрицательная реакция; (+)-положительная реакция; (+-)-большинство штаммов дают положительную реакцию;

(-+)-большинство штаммов дают отрицательную реакцию.

"СТ" - субтерминальные споры; Т - терминальные споры.

Приложение 4.

Окраска мазков по Граму в модификации Копелова

Приготовление растворов:

1) раствор "А": 2,5 г кристаллического фиолетового растворить в 250 мл дистиллированной воды (годен 3 - 4 недели);

2) раствор "Б": 12,5 г натрия углекислого растворить в 250 мл дистиллированной воды (годен 2 недели до выпадения кристаллов);

3) раствор йода: 1 г едкого натра растворить в 7 мл дистиллированной воды, затем добавит 5 г кристаллического йода и 0,25 г йодистого калия, к полученному раствору добавить дробно 243 мл дистиллированной воды;

4) смывная жидкость для обесцвечивания: 75 мл ацетона добавить к 175 мл этилового спирта;

5) раствор сафранина: 5 г сафранина растворить в 15 - 20 мл этилового спирта и добавить до 250 мл дистиллированной воды.

Окраска мазков.

Мазки фиксируют над пламенем горелки. На свободную от исследуемого материала часть стекла наносят 6 капель раствора "А" и одновременно раствора "Б". Смешивают стеклянной палочкой и равномерно распределяют по стеклу. Экспозиция - 2 мин.

Удаляют остатки краски и наносят раствор йода на 2 мин.

Удаляют остатки йода и наносят 10 - 20 капель смывной жидкости, повторяют манипуляцию до полного обесцвечивания, постоянно покачивая стекло.

Промывают водопроводной водой.

Докрашивают сафранином 2 мин.

Промывают водой, просушивают и микроскопируют.

Приложение 5.

Проведение масс-спектрометрической идентификации облигатно анаэробных микроорганизмов

Оборудование и программное обеспечение

MALDI-ToF масс-спектрометр (MicroFlex (Bruker Daltonik GmbH)) или эквивалент

MSP-мишень (Чип) для нанесения образцов, 96-луночная (Bruker Daltonik GmbH, # 224989) или эквивалент

Бокс биологической безопасности не ниже II класса

Анаэробная рабочая станция

Лабораторная настольная центрифуга с ротором для микропробирок объемом 1,5 мл, до 13 000 об./мин

Микроцентрифуга-встряхиватель со скоростью не менее 3000 об/мин.

Вертикальный многофункциональный ротатор

Дозатор механический одноканальный 0,5-10 мл, точность не менее 0,8 %

Дозатор механический одноканальный 10-100 мл, точность не менее 0,8 %

Дозатор механический одноканальный 100-1000 мл, точность не менее 0,3 %

Штатив для трех механических дозаторов

Программы для управления времяпролетными масс-спектрометрами

Программы для дальнейшей обработки спектров, полученных с помощью масс-спектрометра, дающие возможность анализировать спектры и сравнивать их друг с другом. Программа содержит алгоритмы для полностью автоматического и интерактивного обнаружения пиков (SNAP, Centroid и Sum peak finder), их сглаживания, вычитания величины сравнения (baseline subtraction), рекалибровки спектров. Поддержка экспорта спектров в различные форматы. Данные, обработанные в программе, могут быть экспортированы в формат списка пиков (peak lists)

для дальнейшей обработки. Программные пакеты, необходимые для идентификации микроорганизмов в автоматическом и ручном режимах, создания пользовательских баз данных референсных спектров, построения дендрограмм, отображения референсных спектров в виде псевдогелей. Программа, импортирующая результаты автоматической идентификации в HTML-файл или распечатывать его. Программы выражают результат идентификации в виде коэффициента соответствия (Score Value).

Реактивы:

- ацетонитрил, 99,9 %;
- вода деионизованная ультрачистая;
- 70% муравьиная кислота;
- этанол абсолют, >99,8 % (не денатурированный) или Спирт этиловый, 96 %-й;
- 70% трифторуксусная кислота;
- α -циано-4-гидроксикоричная кислота CAS: 28166-41-8; б
- бактериальный калибровочный стандарт (BTS, р/п 8255343) или эквивалент;
- растворитель для высокоэффективной жидкостной хроматографии (этанол $\geq 99,8$ % денатурированный C_2H_6O , Молярная масса 46,07 g/mol).

Приготовление рабочего раствора матрицы:

- приготовить основной органический растворитель, смешав 20 мл 50% ацетонитрила с 20 мл 2,5% трифторуксусной кислоты;
- поместить несколько кристаллов α -циано-4-гидроксикоричной кислоты
- в микроцентрифужную пробирку и смешать с 200-500 мкл основного органического растворителя (из расчета 10 мг кристаллов матрицы и 1 мл основного органического растворителя);
- перемешать 2-3 минуты на вортексе до полного растворения.

Полученный раствор матрицы и основной органический растворитель можно хранить при комнатной температуре 1-2 недели.

Очистка MSP-мишени

После использования MSP-мишени, используемого при идентификации микроорганизмов необходимо подвергнуть тщательной очистке, которую проводят с применением 70 %-го раствора этанола и 80 %-го раствора трифторуксусной кислоты.

Не следует использовать реагенты, кроме тех, что указаны выше. **Не следует оставлять мишени в органических растворителях более чем на 20 минут !!!**

Для чистки MSP-мишени необходимо:

- поместить MSP-мишень в подходящий контейнер (кристаллизационную ванну или чашку Петри) и налить количество раствора 70 %-го этанола до полного покрытия поверхности MSP-мишени;
- выдержать при комнатной температуре мишени в растворе 70 %-го этанола в течение 5 минут;
- вынуть MSP-мишень и тщательно промыть ее в проточной водопроводной воде;

- используя безворсовую лабораторную салфетку, смоченную в 70 %-м этаноле, тщательно протереть MSP-мишень, стирая прежде нанесенные точки;
- промыть MSP-мишень проточной водой и высушить безворсовой салфеткой до полного высыхания;
- покрыть поверхность MSP-мишени 100 мкл 80 % водным раствором трифторуксусной кислоты;
- интенсивно протереть поверхность MSP-мишень безворсовой салфеткой;
- промыть MSP-мишень деионизованной водой и высушить безворсовой салфеткой;
- при комнатной температуре дать MSP-мишени полностью высохнуть, при этом время высушивания должно составить не менее 15 минут;
- после окончания всех манипуляций мишень готова к использованию.

Чистые мишени могут храниться при комнатной температуре не ограниченное время в сухом защищенном месте (в пластиковой упаковке), чтобы избежать загрязнений поверхности.

Проведение прямого выявления *Clostridioides difficile* в просветных фекалиях с применением картриджа Xpert CD

Процедура работы с набором реагентов для выделения СГВ:

1. Достать из холодильника картридж Xpert CD и реагенты. Вскрыть упаковку.
2. Достать флакон, содержащий тестируемый клинический биоматериал (просветные фекалии), поместить необходимое количество биоматериала во флакон с буфером, перемешать на вортексе и поместить в камеру картриджа Xpert CD.
3. Закрыть крышку картриджа и поместить его в модуль аппарата GeneXpert Dx. Просканировать штрих-код картриджа.
4. В окне Sample ID ввести информацию о пациенте и номер образца.
5. Нажать Start Test.
6. После завершения тестирования картридж извлечь из модуля прибора и поместить в контейнер для утилизации отработанного материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шелыгин Ю.А., Алешкин В.А., Сухина М.А., Миронов А.Ю., Брико Н.И., Козлов Р.С., Зверев В.В., Ачкасов С.И., Ковалишена О.В., Селькова Е.П., Сафин А.Л., Гренкова Т.А., Халиф И.Л., Фролов С.А., Кашников В.Н., Сушков О.И. Клинические рекомендации Национальной ассоциации специалистов по контролю инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, и Общероссийской общественной некоммерческой организации "Ассоциация колопроктологов России" по диагностике, лечению и профилактике *Clostridium difficile*-ассоциированной диареи (CDI) //Колопроктология. 2018. № 3 (65). С. 7-23.
2. Schoch CL, Ciufu S, Domrachev M, Hottot CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, Mcveigh R, O'Neill K, Robbertse B, Sharma S, Soussov V, Sullivan JP, Sun L, Turner S, Karsch-Mizrachi I. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). 2020 Jan 1;2020:baaa062. doi: 10.1093/database/baaa062. PMID: 32761142; PMCID: PMC7408187
3. Prevot A.R., Turpin A. et Kaiser P. Les bacteries anaerobies; p. 569 e. a., 1967
4. Меньшиков В.В. Методики клинических лабораторных исследований: Справочное пособие. Том 3. Клиническая микробиология. М.: Лабора, 2009. - 880 с.
5. Клиническая лабораторная аналитика в 5 томах Том. IV. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории. Меньшиков В.В. Тип: монография Язык: русский ISBN: 5-94419-008-6, 2003: Москва, 816 с., ООО "Агат-Мед". УДК: 616.
6. Корнеева О. Н., Ивашкин В. Т. Антибиотикоассоциированный колит: патоморфология, клиника, лечение //Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2007. – Т. 17. – №. 3. – С. 65-71.
7. Лобзин Ю. В., Захаренко С. М., Иванов Г. А. Современные представления об инфекции *Clostridium difficile* //Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2002. – Т. 4. – №. 3. – С. 200-232.
8. Шептулин А. А. Рефрактерные и рецидивирующие формы колита, ассоциированного с *Clostridium difficile* //Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2011. – Т. 2. – С. 50-53.].
9. Na X. et al. A multi-center prospective derivation and validation of a clinical prediction tool for severe *Clostridium difficile* infection //PloS one. – 2015. – Т. 10. – №. 4. – С. e0123405

10. Tschudin-Sutter S. et al. Growth Patterns of *Clostridium difficile*–Correlations with Strains, Binary Toxin and Disease Severity: A Prospective Cohort Study //PloS one. – 2016. – Т. 11. – №. 9. – С. e0161711.
11. McFarland L. V. Emerging therapies for *Clostridium difficile* infections //Expert opinion on emerging drugs. – 2011. – Т. 16. – №. 3. – С. 425-439.
12. Knight D. R. et al. Diversity and evolution in the genome of *Clostridium difficile* //Clinical microbiology reviews. – 2015. – Т. 28. – №. 3. – С. 721-741
13. Bergey’s manual of determinative bacteriology, ed. by R. E. Burchartan a. N. E. Gibbons, Baltimore, 1975, bibliogr.
14. Norman J. M. et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease //Cell. – 2015. – Т. 160. – №. 3. – С. 447-460.
15. Kurti Z. et al. Burden of *Clostridium difficile* infection between 2010 and 2013: trends and outcomes from an academic center in Eastern Europe //World Journal of Gastroenterology: WJG. – 2015. – Т. 21. – №. 21. – С. 6728.
16. Kazanowski M. et al. *Clostridium difficile*: epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities—a systematic review //Techniques in coloproctology. – 2014. – Т. 18. – №. 3. – С. 223-232.
17. Wright Donna F.R. Largest ever European clinician consensus report on *Clostridium difficile* infection provides recommendations for improved management of CDI pressemitteilung astellas EMEA. 2014.
18. Shah D. N. et al. Economic burden of primary compared with recurrent *Clostridium difficile* infection in hospitalized patients: a prospective cohort study //Journal of Hospital Infection. – 2016. – Т. 93. – №. 3. – С. 286-289.
19. .
20. Judith A.; Brien et al. The emerging infectious challenge of *Clostridium difficile*-associated disease in Massachusetts hospitals: clinical and economic consequences. // Infect. Control & Hosp. Epidemiol. Cambridge University Press, 2007. Vol. 28, № 11. P. 1219-1227.
21. Arimoto J. et al. Diagnostic test accuracy of glutamate dehydrogenase for *Clostridium difficile*: Systematic review and meta-analysis //Scientific reports. – 2016. – Т. 6. – С. 29754.
22. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53079.4-2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа» (утв. приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 18 декабря 2008 г. N 554-ст).
23. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III – IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

24. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.1.3684-21 "Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий".
25. ГОСТ Р ИСО 15189-2015 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
26. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 20 декабря 2012г. № 1183н об утверждении номенклатуры должностей медицинских работников и фармацевтических работников.
27. Приказ Минздравсоцразвития РФ от от 8 октября 2015 г. N 707н «Об утверждении квалификационных требований к медицинским и фармацевтическим работникам с высшим образованием по направлению подготовки "здравоохранение и медицинские науки».
28. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 июля 2010 г. N 541н. Единый квалификационный справочник должностей руководителей, специалистов и служащих, раздел Квалификационные характеристики должностей работников в сфере здравоохранения.
29. ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Национальный стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Требования безопасности.
30. Методические указания МУК 1.3.2569-09. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности.
31. Федеральный закон от 4 мая 2011 г. N 99-ФЗ. О лицензировании отдельных видов деятельности.
32. Методические указания 4.2.2039-05. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. (Утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 23.12.2005).
33. ГОСТ Р 53079.4-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа.
34. Barbut F. et al. Comparison of three enzyme immunoassays, a cytotoxicity assay, and toxigenic culture for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea //Journal of clinical microbiology. – 1993. – Т. 31. – №. 4. – С. 963-967.
35. Le R, Wallet GF. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection. Ann Biol Clin Synthèse Ann Biol Clin 2013;71:395–400.

36. Сухина М.А., Образцов И.В., Михалевская В.И., Ачкасов С.И., Сафин А.Л., Шелыгин Ю.А. Алгоритм лабораторной диагностики *Clostridium difficile*-ассоциированной диареи. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2018. № 2. С. 45-53.
37. O'Horo J.C., Jones A., Sternke M., Harper C., Safdar N. Molecular techniques for diagnosis of *Clostridium difficile* infection: systematic review and meta-analysis. *Mayo Clinic Proceedings*. 2012;87:643–51.
38. Kim H., Jeong S.H., Kim M., Lee Y., Lee K.. Detection of *Clostridium difficile* toxin A/B genes by multiplex real-time PCR for the diagnosis of *C. difficile* infection. *Journal of Medical Microbiology*. 2012;61:274–7.
39. Collins D., Elliott B., Riley T.V. Molecular methods for detecting and typing of *Clostridium difficile*. *Pathology*. 2015;47:211–8.
40. Kuhl S.J., Tang Y.J., Navarro L., Gumerlock P.H., Silva J. Diagnosis and Monitoring of *Clostridium difficile* Infections with the Polymerase Chain Reaction. *Clinical Infectious Diseases*. 1993; 16; 4; S 234-S 238.
41. Putsathit P., Morgan J., Bradford D., Engelhardt N., Riley T.V. Evaluation of the BD Max Cdiff assay for the detection of toxigenic *Clostridium difficile* in human stool specimens. *Pathology*. 2015;47:165–8.
42. Ciaran P., Kelly M.D., Thomas J., La Mont M.D. *Clostridium difficile* — associated diarrhea and colitis. *The New England Journal of Medicine*. 2008;1939–40.
43. Методические указания для работы на приборах серии flex компании Bruker Daltonics. Прямое белковое профелирование. – Москва. – 2010. – с.45.
44. Vocale C, Rimoldi SG, Pagani C, Grande R, Pedna F, Arghittu M, et al. Comparative evaluation of the new xTAG GPP multiplex assay in the laboratory diagnosis of acute gastroenteritis. Clinical assessment and potential application from a multicentre Italian study. *Int. J. Infect. Dis.* [Internet] 2015;34:e33–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2015.02.011>.
45. EUCAST v11 2021(European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing).
46. Клинические Рекомендациями по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (версия 2021 – 1.).
47. Turnidge, J., Kahlmeter, G., and Kronvall, G. (2006). Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values. *Clin Microbiol Infect* 12, 418-425.
48. ISO 20776-1:2006 Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems - Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices - Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases.

49. Юдин С.М., Сухина М.А., Загайнова А.В., Макаров В.В. Защитная среда для криохранения для анаэробных, аэробных, факультативно анаэробных и микроаэрофильных микроорганизмов в фекальной микробиоте. // Патент на изобретение 2726299 С1, 13.07.2020. Заявка № 2019128097 от 06.09.2019.
50. ГОСТ Р ИСО 22870-2009. Национальный стандарт Российской Федерации. Исследования по месту лечения. Требования к качеству и компетентности.
51. ГОСТ Р 53079.1-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Правила описания методов исследования.
52. ГОСТ Р 53133.1—2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях.
53. ГОСТ Р 53133.2—2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Оценка качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов.
54. R.Kilpper-Bälz K.H.Schleifer. Transfer of *Peptococcus saccharolyticus* Foubert and Douglas to the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus saccharolyticus* (Foubert and Douglas) comb. nov. // *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie* // Volume 2, Issue 4, December 1981, Pages 324-331.
55. C L Wells, C R Field. Long-chain fatty acids of peptococci and peptostreptococci // *J Clin Microbiol.* 1976 Dec;4(6):515-21. doi: 10.1128/jcm.4.6.515-521.1976.
56. Itzhak Brook. *Anaerobic Bacteria // Infectious Diseases (Fourth Edition)*, 2017 Volume 2, 2017, Pages 1628-1644.e2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00184-2>