

ФЕДЕРАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ МЕДИЦИНЫ

# ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ АНАЭРОБНОЙ ИНФЕКЦИИ

От имени Комитета по микробиологии ФЛМ

Окончательная версия утверждена ФЛМ 14.12.2021

Москва  
2022

УДК 579.61  
ББК 53.4в6  
П69

#### *Рецензенты*

**В.Г. Жуховицкий** – заведующий лабораторией индикации и ультраструктурного анализа микроорганизмов ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, кандидат медицинских наук, доцент кафедры биохимии и иммунопатологии ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России, Москва

**С.В. Жилина** – руководитель группы микробиологических исследований ЦКДЛ ФГБУЗ «Морозовская ДГКБ ДЗМ», кандидат медицинских наук, член комитета по работе с клиницистами Ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины», врач-бактериолог высшей квалификационной категории, Москва

#### *Коллектив авторов*

**М.А. Сухина** – руководитель отдела микробиологических и иммунологических исследований ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н. Рыжих» Минздрава России, доцент кафедры микробиологии имени академика З.В. Ермольевой ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России, член комитета по микробиологии ФЛМ, кандидат биологических наук, Москва

**С.М. Юдин** – генеральный директор ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства России, доктор медицинских наук, профессор, Москва

**А.В. Загайнова** – заведующая лабораторией микробиологии и паразитологии ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства России, кандидат биологических наук, Москва

**В.В. Макаров** – начальник отдела анализа и прогнозирования медико-биологических рисков здоровью ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства России, кандидат биологических наук, Москва

**Ю.А. Шельгин** – научный руководитель ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр колопроктологии им. А.Н. Рыжих» Минздрава России, заведующий кафедрой колопроктологии ФГБОУ ДПО «РМАНПО» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН

**И.С. Тартаковский** – заведующий лабораторией легионеллеза ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, председатель комитета по микробиологии ФЛМ, доктор биологических наук, профессор, Москва

**В.И. Кочеровец** – профессор кафедры фармацевтической технологии и фармакологии ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор, Москва

**Н.М. Каргальцева** – преподаватель кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, кандидат медицинских наук, Санкт-Петербург

**Практические рекомендации по лабораторной диагностике анаэробной инфекции / П69** М.А. Сухина, С.М. Юдин, А.В. Загайнова и др. – М.–Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2022. – 84 с.

ISBN 978-5-6047503-9-1

В рекомендациях сформированы единые современные методические подходы по лабораторной диагностике анаэробной инфекции и предложены эффективные пути их внедрения в медицинских организациях РФ разного уровня.

ББК 53.4в6

ISBN 978-5-6047503-9-1

© Коллектив авторов, 2022

© Федерация лабораторной медицины, 2022

© Макет ООО «Издательство «Триада», 2022

# СОДЕРЖАНИЕ

Список используемых сокращений.....	6
Область применения и обоснование необходимости внедрения данного метода лабораторной диагностики.....	7
1. Введение.....	9
2. Характеристика анаэробных микроорганизмов.....	12
2.1. Классификация анаэробных микроорганизмов.....	12
Грамнегативные облигатно-анаэробные бактерии.....	14
Грамположительные облигатно-анаэробные бактерии.....	16
Спорообразующие облигатно-анаэробные грамположительные бактерии.....	16
<i>Clostridioides difficile</i> .....	17
Грамположительные неспорообразующие облигатно-анаэробные микроорганизмы.....	17
3. Анаэробы в составе микробиоты человека.....	19
4. Инфекции человека, вызываемые анаэробами.....	20
4.1. Признаки анаэробной инфекции [2, 3].....	20
4.2. Факторы вирулентности анаэробов.....	20
4.3. Патогенез и источники анаэробной инфекции.....	22
5. Общая характеристика метода лабораторной диагностики.....	24
5.1. Требования к специалистам и вспомогательному персоналу.....	24
5.2. Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала.....	24
5.3. Требования к материально-техническому обеспечению исследований.....	25
6. Выделение анаэробных бактерий.....	26
6.1. Необходимые расходные материалы, реагенты и оборудование.....	26
6.1.1. Необходимое оборудование и расходные материалы.....	26

6.2. Питательные среды .....	28
6.3. Сбор, хранение и доставка образцов биологического материала .....	33
6.3.1. Транспортные среды, используемые для сбора и доставки биоматериала при подозрении на анаэробную инфекцию.....	37
6.3.2. Транспортировка биологического материала.....	37
6.3.3. Маркировка материала для лабораторного исследования .....	38
6.3.4. Оценка пригодности образцов.....	38
6.4. Пробоподготовка и первичный посев .....	38
6.4.1. Сроки инкубации облигатно-анаэробных бактерий.....	41
6.5. Микроскопическое исследование патологического материала.....	41
6.6. Выделение на искусственных питательных средах.....	41
6.7. Идентификация облигатно-анаэробных бактерий на основе морфологических и биохимических свойств .....	43
6.8. Идентификация облигатно-анаэробных микроорганизмов с применением молекулярно-генетических методов.....	51
6.9. Идентификация облигатно-анаэробных микроорганизмов с применением времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF-MS) .....	51
7. Определение антимикробной чувствительности к антибиотикам .....	55
8. Исследование анаэробных бактерий при отсутствии бескислородных газов .....	59
9. Контроль качества лабораторных исследований.....	61
9.1. Контроль анаэробииза .....	61
9.2. Внутрिलाбораторный контроль качества исследования.....	61
9.3. Внешняя оценка качества исследования .....	63
Приложения .....	64
Приложение 1. Таблицы с числовыми значениями пограничных критериев определения чувствительности .....	64
Приложение 2. Материально-техническое оснащение, необходимое для выполнения исследования .....	68

Приложение 3. Идентификация облигатно-анаэробных микроорганизмов .....	71
Приложение 4. Окраска мазков по Граму в модификации Копелова .....	73
Приложение 5. Проведение масс-спектрометрической идентификации облигатно-анаэробных микроорганизмов .....	74
Приложение 6. Проведение прямого выявления <i>Clostridioides difficile</i> в просветных фекалиях с применением картриджа Xpert CD.....	77
Список литературы .....	78

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ВБ – Среда Вильсона–Блера, 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

# **ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ И ОБОСНОВАНИЕ НЕОБХОДИМОСТИ ВНЕДРЕНИЯ ДАННОГО МЕТОДА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ**

Рекомендации 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;
- в научных учреждениях.

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

**Целью данных рекомендаций** является восполнение инструктивно-методической документации для диагностики анаэробной инфекции.

## **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.



# 1. ВВЕДЕНИЕ

Исторически годом открытия анаэробов считается 1680-й, а Левенгук – первооткрывателем (Dowell C., 1932). Пастер в 1861–1863 гг. описал масляно-кислое брожение без доступа воздуха, т. е. анаэробноз. В 1889 г. A. Veillon описал случаи аппендицита с обнаружением анаэробов и A. Velreau в 1839 г. – газовую инфекцию. С годами круг исследований гнойно-воспалительных заболеваний на анаэробы расширялся. Под термином «Анаэробная инфекция» подразумеваются различные виды экзогенной и эндогенной инфекции, обусловленные анаэробными микроорганизмами.

Во времена, когда атмосфера Земли была лишена кислорода, появились первые обитатели Земли (метановые и очень строгие анаэробы), анаэробный метаболизм был единственно возможным. Биосфера нашей планеты возникла благодаря их жизнедеятельности. Кислород воспринимался как агрессивный агент, и микроорганизмы стали вырабатывать защитные механизмы (дезоксимутазы). Возникли микроорганизмы, которые могли существовать в присутствии кислорода и в бескислородной среде (факультативные анаэробы). Кроме зависимости чувствительности к кислороду дальнейшее изучение анаэробов позволило делить их на основе метаболического значения кислорода. Строгие облигатные анаэробы не растут в присутствии кислорода и не используют кислород в метаболизме. Аэротолерантные анаэробы могут расти в присутствии молекулярного кислорода, но в метаболизме его не используют. Микроаэрофилы нуждаются в кислороде, но плохо растут при его обычной концентрации.

Анаэробные микроорганизмы составляют абсолютное большинство нормальной микробиоты человеческого тела. Кожа заселена анаэробами в десятки раз больше, чем аэробами (Hill G., 1980). Главное место обитания анаэробов – пищеварительный тракт. Микрофлора ротовой полости на 99% состоит из анаэробов, что близко к микробиоте толстой кишки. Соотношение количества аэробов к количеству анаэробов в 1 мл слюны составляет  $10^7 : 10^9$  (Hoerich P., 1970). Толстая кишка – это основное место обитания облигатно-анаэробных микроорганизмов вследствие отсутствия кислорода и очень низкого окислительно-восстановительного потенциала ( $-250$  мВ). В содержимом толстой кишки более  $10^{11}$  микробных тел в 1 г, где строгие анаэробы составляют 97% (Moore W., 1977). 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*).

Из медицинской проблемы гнойно-воспалительные заболевания перешли в общесоциальную, и этиологическими агентами являются условно-патогенные микроорганизмы, в подавляющем большинстве представители нормальной флоры организма человека, среди которых доминирующая роль принадлежит анаэробным бактериям (Колесов А.П., 1989; Кочеровец В.И., 1990).

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 технике.

Это приводит к ошибкам в этиологической диагностике гнойно-воспалительных инфекций, что порождает большую группу нерегистрируемых инфекций, 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 «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)» [5].

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, идентификация, определение чувствительности к антибактериальным препаратам исследуемых облигатно-анаэробных микроорганизмов. Приведено описание питательных сред для культивирования облигатных анаэробов, необходимого оборудования для создания бескислородной атмосферы.

## 2. ХАРАКТЕРИСТИКА АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Под термином «анаэробные микроорганизмы» подразумевают микроорганизмы, которые обладают бескислородным типом дыхания и чувствительны к токсическому действию молекулярного кислорода.

Характерной особенностью метаболизма анаэробов является продукция летучих жирных кислот: пропионовой, изомаляной, масляной, изовалериановой, валериановой и/или капроновой. Аэробные бактерии летучих жирных кислот не продуцируют.

### 2.1. Классификация анаэробных микроорганизмов

По отношению к кислороду микроорганизмы подразделяют: на облигатные аэробы, факультативные анаэробы, микроаэрофилы, аэротолерантные анаэробы и облигатные анаэробы.

Для метаболизма бактериям требуется энергия, которую они получают в процессе дыхания, которое осуществляется за счет окисления (отдача электрона) и восстановления (присоединение электрона). Эти реакции происходят в цитоплазме клетки. У аэробов акцептором для  $O_2$  является  $H_2$ . Водород присоединяется к кислороду, образуется углекислота и вода. У анаэробов акцептором  $H_2$  являются  $N_2$ ,  $CO$  (неорганические вещества, сульфаты, нитраты, карбонаты, органические соединения), энергетический эффект расщепления низкий, расщепление идет до стадии промежуточных продуктов: спирты, летучие жирные кислоты, метан.

Анаэробы получают энергию через ферментативные пути в некоторых органических составляющих, таких как органические кислоты, алкогольные и другие, молекулы которых являются конечными электронными акцепторами.

Анаэробы состоят из двух больших групп: **облигатные анаэробы** и **аэротолерантные анаэробы**.

**Облигатные анаэробы** еще подразделяются на две группы на основе их способности расти в присутствии кислорода или устойчивости (толерантности) к малому количеству кислорода:

1. **Строгие (облигатные) анаэробы** способны расти на поверхности агара при уровне кислорода до 0,5%. Атмосферный кислород токсичен для них. Примеры: *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi*, *Treponema denticola*.

2. **Умеренные облигатные анаэробы** могут выживать при экспозиции кислорода от 2 до 8% (средняя 3%). К таким микроорганизмам относятся: *Bacteroides fragilis*, группы пигментированных *Prevotella-Porphyromonas*, *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium perfringens*.

**Аэротолератные анаэробы** могут выдерживать нахождение в воздушной среде с содержанием углекислого газа от 5 до 10%, но растут в анаэробных условиях. Это: *Clostridium carnis*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium tertium*.

**Микроаэрофильные микроорганизмы** растут при 10% CO<sub>2</sub>, выдерживают от 0,3 до 20% кислорода, который является конечным акцептором электронов, эти бактерии не растут на поверхности агара при аэробных условиях и могут расти в анаэробных условиях. Пример: *Campylobacter jejuni*, который растет оптимально при 5% кислороде.

**Факультативные анаэробы** (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) растут и в аэробных, и в анаэробных условиях. Используют кислород как электронный акцептор или получают энергию через ферментативные реакции в анаэробных условиях, но менее эффективно. Факультативные анаэробы в аэробных условиях получают больше энергии, когда они полностью катаболизируют молекулу глюкозы в углекислый газ и перекись водорода, чем в анаэробных условиях.

**Облигатные аэробы** включают виды *Mycobacterium* и *Pseudomonas* и требуют для роста молекулярный кислород, как акцептор электронов, в результате чего образуется вода, не получают энергии при ферментации.

**Клинически значимые анаэробы** – это те, которые способны вызвать инфекционный процесс в организме человека. Анаэробные микроорганизмы обладают различными факторами патогенности. Например, гепариназа анаэробов способствует возникновению тромбозов; наличие капсулы 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. Большинство возбудителей анаэробной инфекции в клинической практике относятся к умеренным облигатным анаэробам и аэротолерантным микроорганизмам. Они более устойчивы к токсическому действию кислорода, чем строгие анаэробы. Для сбора, транспортировки биоматериала в лабораторию и на протяжении всего цикла исследования, выполняемого в лаборатории, необходимо создать условия сохранения облигатно-анаэробных микроорганизмов.

Классификация по морфологическим и тинкториальным признакам  
(Procop G.W. et al., 2017)

Грамнегативные палочки (изогнутые, спиралевидные и спирохетные формы)	<i>Alistipes, Anaerobiospirillum, Bacteroides, Barnesiella, Bilophila, Butyrivibrio, Catonella, Desulfuromonas, Desulfovibrio, Dialister, Faecalibacterium, Johnsonella, Jonquetella, Leptotrichia, Megamonas, Mitsuokella, Odoribacter, Parabacteroides, Paraprevotella, Parasutterella, Phocaeicola, Porphyromonas, Prevotella, Pyramidobacter, Selenomonas, Sneathia, Spirochaeta, Succinomonas, Succinivibrio, Sutterella, Tannerella, Tissierella, Treponema</i>
Грамнегативные кокки	<i>Acidominococcus, Anaeroglobus, Megasphaera, Negativococcus, Veillonella</i>
Грамположительные кокки	<i>Anaerococcus, Atopobium, Coprococcus, Finegoldia, Gallicola, Gemmiger, Murdochiella, Peptococcus, Peptostreptococcus, Ruminococcus, Sarcina, Peptoniphilus, Staphylococcus, Streptococcus, Gemella</i>
Грамположительные палочки (неспорообразующие)	<i>Alderreutzia, Alloscardovia, Anaerofustis, Anaerostipes, Anaerotruncus, Actinobaculum, Actinomycetes, Atopobium, Bifidobacterium, Bulleidia, Catabacter, Catenibacterium, Cryptobacterium, Collinsella, Eggerthella, Eubacterium, Faecalibacterium, Gordonibacter, Holdemania, Lachnospira, Lactobacillus, Marvinbryantia, Methanobacterium, Mobiluncus, Mogibacterium, Olsenella, Oribacterium, Paraeggerthella, Parascardovia, Cutibacterium, Propionimicrobium, Pseudoramibacter, Roseburia, Scardovia, Shuttleworthia, Slackia, Solobacterium, Turicibacter, Varibaculum</i>
Грамположительные палочки (спорообразующие)	<i>Clostridium, Desulfomaculum, Desulfosporosinus, Caloramator, Filifactor, Moorella, Oxobacter, Oxalophagus</i>

**Грамнегативные облигатно-анаэробные бактерии**

Грамнегативные неспорообразующие анаэробы являются многочисленной группой бактерий. Некоторые из них могут проявлять аэротолерантность, что определяется присутствием у части бактерий индуцибельных супероксиддисмутаза и каталаза. Продукты ферментации углеводов у грамнегативных 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.

тью, гидролизуют пептон. Антигенная структура вариабельна, зависит от строения липополисахарид (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.

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, спор не образуют. Включают как подвижные, так и неподвижные формы. Обладают многочисленными фимбриями.

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, биохимически активны, сбраживают большинство углеводов. Резистентны к аминогликозидам, наличие β-лактамаз обеспечивает устойчивость к пенициллину, возрастает процент штаммов, резистентных к тетрациклину. 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 темно-пигментированные 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  $\alpha$ -гемолиза. На жидких средах образуют осадок. Биохимическая активность: утилизируют пептон и углеводы, ферментативная активность низкая.

Род *Veillonella* – кокковидные бактерии, располагающиеся парами или реже поодиночке, 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  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2$ .

### **Грампозитивные облигатно-анаэробные бактерии**

Эта группа анаэробных бактерий включает виды, далекие друг от друга в систематическом отношении, но такое объединение широко используют в медицинской бактериологии для облегчения решения практических задач. Большинство видов прихотливо и растет 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 (кlostридии) и неправильной (актиномицеты и бифидобактерии) формы.

### **Спорообразующие облигатно-анаэробные грампозитивные бактерии**

Представлены классом *Clostridia*, относятся к типу *Firmicutes*, порядку *Clostridiales*, включают роды *Clostridium*, *Caldicoprobacteraceae*, *Clostridiisalibacter*, *Hathewayia*, *Hungatella*, *Sporosalibacterium* и другие [21]. Наиболее многочисленный род, вызывающий гнойно-воспалительные заболевания – это род *Clostridium*, представители которого образуют подвижные и (реже) неподвижные палочки. Отличительная особенность кlostридий – способность образовывать овальные или круглые эндоспоры. Споры могут располагаться центрально, субтерминально или терминально. Наиболее характерные признаки кlostридий – способность вызывать масляно-кислое брожение и анаэробный распад углеводов с образованием масляной кислоты и газов ( $\text{CO}_2$ , 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 могут окрашиваться как грамотрицательные 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, изомаляновой, 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 [5, 16, 19]. 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 [5, 18, 20, 24]. Бинарный токсин *C. difficile* риботипа NAP1/BI/027 образует на мембране энтероцита комплекс, который проникает в цитоплазму, нарушает функционирование клетки посредством дезорганизации цитоскелета и ведет к ее гибели [24]. Бинарный токсин усиливает адгезию и колонизацию *C. difficile* [19, 24].

Учитывая высокое медико-социальное значение заболевания, был разработан трехступенчатый алгоритм лабораторной диагностики CDI для быстрой индикации патогена и определения его чувствительности к антибактериальным препаратам [5].

### **Грамположительные неспорообразующие облигатно-анаэробные микроорганизмы**

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.

### 3. АНАЭРОБЫ

## В СОСТАВЕ МИКРОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА

Анаэробные микроорганизмы составляют количественное большинство в микробном составе многих биотопов человека. Так, соотношение анаэробов к аэробам 10 : 1 в полости рта, 100 : 1 в составе вагинального отделяемого и 1000 : 1 в составе кишечной микробиоты. Они как нормальные обитатели биотопов выполняют функции: синтез биологически активных веществ, переваривание пищи, регуляция газообразования, водно-солевой обмен, печеночно-кишечная регуляция желчных кислот, пигментов, холестерина, обеспечивают колонизационную резистентность в толстом кишечнике человека, препятствуют транслокации кишечных микроорганизмов в кровоток.

Таблица 2

Анаэробы – члены нормальной микробиоты человека  
(Procop G.W. et al., 2017)

Биотопы человека	Анаэробные микроорганизмы
Полость рта и верхние дыхательные пути	<i>Prevotella species</i> , <i>P. oralis</i> , <i>Porphyromonas species</i> , <i>P. oralis</i> , <i>Bacteroides species</i> , <i>B. ureolyticus</i> , <i>Fusobacterium species</i> , <i>F. nucleatum</i> , анаэробные грамположительные кокки, <i>Veillonella species</i> , <i>Actinomyces species</i> и <i>Cutibacterium species</i>
Желудок	<i>Lactobacilli</i>
Тонкий кишечник	Микроаэрофильные стрептококки, <i>Lactobacilli</i>
Толстый кишечник	<i>Gywnna Bacteroides fragilis</i> , <i>Porphyromonas species</i> , <i>Fusobacterium species</i> , анаэробные грамположительные и грамотрицательные кокки, <i>Clostridium species</i> , <i>Eubacterium species</i> , <i>Eggerthella species</i> , <i>Bifidobacterium species</i> , <i>Cutibacterium species</i> , другие анаэробные грамположительные палочки
Мочеполовой тракт; вагина и шейка матки	<i>Prevotella species</i> , <i>Porphyromonas species</i> , <i>Bacteroides species</i> , анаэробные грамположительные кокки, <i>Eubacterium species</i> , <i>Eggerthella species</i> , <i>Clostridium species</i> , <i>Veillonella species</i> , <i>Lactobacillus species</i> , <i>Cutibacterium species</i> , <i>Mobiluncus species</i> , <i>Atopobium species</i>
Уретра (мужчины и женщины)	<i>Cutibacterium species</i> , анаэробные грамположительные и грамотрицательные кокки, <i>Bacteroides species</i> , <i>Prevotella species</i> , <i>Fusobacterium species</i>
Кожа	<i>Cutibacterium species</i> , анаэробные кокки

## **4. ИНФЕКЦИИ ЧЕЛОВЕКА, ВЫЗЫВАЕМЫЕ АНАЭРОБАМИ**

При определенных условиях организма человека условно-патогенные микроорганизмы нормальной микробиоты переходят в состояние патогенов, возбудителей гнойно-воспалительного заболевания, включая анаэробные инфекции.

### **4.1. Признаки анаэробной инфекции [2, 3]**

1. Неприятный запах отделяемого в силу выделения анаэробами летучих жирных кислот.
2. Образование абсцесса с некрозом тканей, воспаление сопровождается чаще полиинфекцией с аэробными микроорганизмами.
3. Локализация инфекции находится около поврежденной слизистой оболочки после травмы или операции, что приводит к контаминации анаэробными бактериями.
4. Развитие часто связано с применением антибиотиков аминогликозидной группы, т. к. анаэробы имеют природную устойчивость к этим препаратам (канамицин, гентамицин, амикацин, тобромицин).
5. Наличие газа в тканях (газовая гангрена), но наличие газа может быть при целлюлитах, вызванных анаэробными стрептококками.
6. Черное окрашивание экссудата возможно из-за продукции темного или черного пигмента.
7. Наличие септического тромбофлебита, который часто развивается при анаэробной инфекции.
8. Преобладание деструктивных изменений тканей над выраженностью клинических симптомов, разрезы тканей характеризуются малым кровотечением.

### **4.2. Факторы вирулентности анаэробов**

#### **I. Токсины**

1. Эндотоксины оказывают общетоксическое повреждающее действие на ткани и органы.
2. Капсульные полисахариды бактериоидов стимулирует выработку антител.
3. Липополисахариды бактериоидов при анаэробной бактериемии вызывают развитие шока, диссеминированное внутрисосудистое свертывание.

4. Лейкоцидин повреждает лейкоциты (*F. necrophorum*).
5. Гемолизин вызывает лизис эритроцитов.
6. Гемагглютинин склеивает эритроциты (*F. necrophorum*).

## **II. Ферменты агрессии**

1. Коллагеназа разрушает коллагеновые волокна соединительной ткани и способствует распространению гнойного процесса (*B. fragilis*).
2. Нейроминидаза вызывает деструкцию гликопротеинов, содержит нейраминовую кислоту.
3. Дезоксирибонуклеаза вызывает внутрисосудистое нарушение, разрушение гепарина, повышает свертываемость крови.
4. Гепариназа повышает свертываемость крови, способствует образованию послеоперационных тромбофлебитов.
5. Фибринолизин растворяет тромбы, но может способствовать развитию септических тромбофлебитов.
6.  $\beta$ -лактамаза обуславливает лекарственную устойчивость анаэробов.
7. Гиалуронидаза, глюкозидаза, гликозидаза, хондроитин-сульфатаза разрушают хондроитиновую кислоту в полости рта и вызывают пародонтоз.
8. Некротоксин способствует развитию некроза ткани.
9. Некоторые ферменты разрушают IgA, компоненты C3 и C5 компонента, способствуют перевариванию лейкоцитов, разрушают ингибиторы протеаз.

## **III. Поверхностные структуры клетки**

1. Пили – ворсинки обеспечивают адгезию бактерий на клетках макроорганизма.
2. Капсула.

## **IV. Метаболиты**

Летучие жирные кислоты, которые угнетают хемотаксис и кислото-зависимую цитотоксичность лейкоцитов.

Глубоко расположенные абсцессы и некрозы тканей, вызываемые анаэробами, чаще имеют полимикробную природу и включают сопутствующие облигатные аэробы, факультативные анаэробы, микроаэрофилы. Эти микроорганизмы активны при травме, сосудистом застое, некрозе ткани, низкое кислородное напряжение и отрицательное значение Eh в тканях обеспечивают благоприятные условия для распространения анаэробов.

Анаэробы ответственны за от 1 до 17% бактериемий. По данным исследований, в Канаде за период с 2000-го до 2008 года летальность при анаэробной бактериемии у пациентов с предшествующими заболеваниями и опухолями составляла до 20% случаев, среди изолированных анаэробов положительной гемокультуры присутствовали *B. fragilis*, *Clostridium spp.*,

Таблица 3

Частота выделения анаэробов при заболеваниях (%) [3, 11, 14]

Вид инфекции	Положительные культуры анаэробов (%)
<b>Заболевания легких</b>	
Аспирационная пневмония	62–93
Абсцесс легких	58–100
Торакальная эмпиема	22–36
Бактериemia	1–17
Абсцесс головного мозга	62–83
<b>Синуситы</b>	
Хронический синусит	48–100
Острый синусит	<10
Стоматологические, полости рта, лицевые	67–100
<b>Брюшные</b>	
Внутрибрюшные	60–100
Абсцесс печени	<60
Тазовые	5–100
<b>Инфекции мягких тканей</b>	
Укушенные раны	50–70
Некклостридиальный крепитирующий целлюлит	75
Газовая гангрена (кклостридиальная)	100
Язвы диабетической стопы	50–90
<b>Разнообразные инфекции</b>	
Инфекция мочевого тракта	<5
Менингит	<10

*Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* [6]. По литературным данным, в 1980-х и 1990-х годах анаэробы были причиной инфекций от 1 до 11% при инфекционном эндокардите [8, 9], в настоящее время частота выделения из крови увеличилась и летальность выросла с 21 до 43% [10].

#### 4.3. Патогенез и источники анаэробной инфекции

Исторически экзогенные источники анаэробной инфекции и заболеваний хорошо известны.

**Экзогенные источники анаэробных инфекций** (Procop G.W. et al., 2017):

- *Clostridioides difficile* (госпитальная диарея).
- Ботулизм пищевого происхождения.
- Ботулизм младенца.

- Раневой ботулизм.
- *Clostridium perfringens* (гастроэнтерит).
- Мионекроз (газовая гангрена).
- Столбняк.
- Крепитирующий анаэробный целлюлит.
- Доброкачественные поверхностные инфекции.
- Инфекции после укусов животных или человеком.
- Инфекции у наркоманов, употребляющих инъекционные наркотики.
- Септический аборт.

В течение последних нескольких десятилетий эндогенные анаэробные инфекции становятся наиболее обычными. Бактериemia может метастатически распространять бактерии, что приводит к образованию отдаленных абсцессов. Большинство перидонтитов вызываются анаэробами. При заболеваниях легких (аспирационная пневмония, абсцесс легких, некротизирующая пневмония и эмпиема) анаэробы не являются частыми для них патогенами. Плевральная жидкость, трансторакальный аспират – лучшие образцы для обнаружения анаэробов [13].

**Эндогенные источники анаэробных инфекций** (Procop G.W. et al., 2017):

- абсцесс любого органа;
- актиномикоз;
- аспирационная пневмония;
- бактериemia;
- бактериальный вагиноз;
- осложнения аппендицита или холецистита;
- крепитирующий и некрепитирующий целлюлит;
- стоматологические и пародонтальные инфекции;
- эндокардит;
- эндофтальмит, обычно после хирургии по катаракте;
- синдром Лемьера (*Fusobacterium necrophorum*) (некробактериоз);
- менингит, обычно осложнение сообщающегося абсцесса головного мозга;
- некротический фасцит;
- некротическая пневмония;
- остеомиелит;
- хронический средний отит;
- перитонит;
- септический артрит;
- хронический синусит;
- субдуральная эмпиема;
- эмпиема грудной клетки.

## **5. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ**

### **5.1. 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 [30–32]:

- 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».

### **5.2. 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.



### **5.3. Требования к материально-техническому обеспечению 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» [29–31]. Организация помещений, требования к оборудованию и правила работы в лаборатории должны соответствовать действующим нормативно-правовым документам, регламентирующим деятельность клиничко-диагностических и бактериологических лабораторий учреждений здравоохранения [30–32]. Сбор, временное хранение, обеззараживание и транспортировка потенциально опасных отходов, образующихся в процессе выполнения технологии, должны проводиться в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами [30, 31].

Отходы класса Б и В, потенциально содержащие микроорганизмы, подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции) / обезвреживанию. Вывоз и обезвреживание отходов должны производиться аккредитованной организацией.

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

## 6. ВЫДЕЛЕНИЕ АНАЭРОБНЫХ БАКТЕРИЙ

### 6.1. Необходимые расходные материалы, реагенты и оборудование

#### 6.1.1. 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.

**Микроанаэроостат** (микро- + анаэроостат) – герметически закрывающийся пластиковый, металлический или стеклянный 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 (рис. 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 «промыwania» анаэроостата азотом повторяется три раза. Основной принцип работы микроанаэроостата – удаление кислорода, которое может достигаться разными способами:

- 1) реакция с водородом при добавлении катализатора, кислород окисляется с превращением в воду;
- 2) при помощи газового генератора;
- 3) замещение, при котором воздух удаляется насосом и вносится газовая смесь, состоящая из 85% азота, 10% водорода и 5% углекислого газа;



Рис. 1. Микроанаэроостат

- 4) газ-генерирующие системы, которые впитывают кислород и производят углекислый газ, не производят водород. Gas Pak появился как альтернатива к другим анаэробным системам;
- 5) другой тип коммерческой без катализатора системы – использование железных опилок в пакетике, к которому добавляется вода, в результате образуется бескислородная и богатая углекислым газом атмосфера [7].

Для выращивания анаэробов после загрузки посевами и создания анаэробной атмосферы микроанаэростат помещают в обычный термостат. Время создания анаэробных условий в микроанаэростате колеблется от 1–2 до 4 часов. Существует постоянная необходимость дополнительных расходов: одноразовые газогенерирующие пакеты, индикаторы.

**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%, CO<sub>2</sub> – 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  $O_2 + H_2$ , в результате реакции образуется вода.

**Газогенерирующие пакеты.** Для создания необходимой атмосферы в микроанаэроstate используют газогенерирующие пакеты. Газогенерирующие пакеты представляют собой систему одноразового использования, позволяющую создавать атмосферу для поддержания первичного выделения и культивирования анаэробных бактерий путем использования газогенерирующих пакетов внутри герметизируемых мешков одноразового использования без использования анаэроstate либо внутри микроанаэроstate без использования вакуумного насоса.

## 6.2. Питательные среды

Используют среды неселективные, селективные и обогащенные. Глюкозную среду с мясным фаршем можно использовать вместо обогащенной тиогликолевой среды, канамицин-ванкомицин кровяной агар – для селективного выделения грамотрицательных анаэробов, *Bacteroides* желчь-эскулиновый агар (BBE) – для селекции и предполагаемой идентификации группы *Bacteroides fragilis*, среда полезна и для *Bilophila wadsworthia*. Использование неселективных анаэробных гемагаров, таких как Бруцелла-агар или CDC кровяной агар, которые содержат гемин, L-цистин, витамин K1, можно использовать для первичной изоляции и субкультивирования для большинства анаэробов. 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 (10 мг/л), витамина K3 (менадион, 1,5 мг/л) или K1 (фитоменадион, 1,5 мг/л), а также бараньих эритроцитов (5–7%).

### Среды для первичного выделения анаэробов из клинического образца [1]

#### Обогащенная тиогликолевая среда (ТНЮ)

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

Это неингибиторная среда, которая специально используется для первичного выделения анаэробов. Она является прекрасной добавкой к полутвердой среде (например, к агару) для выделения медленно растущих требовательных микроорганизмов. Поддерживает хороший рост всех анаэробов, находящихся в клиническом материале. Является обогащенной жидкой средой, приготовленной путем добавления BBL-0135C к тиогликолевой среде (без индикатора) с геминном и витамином K1.

### **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 *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 (*Bacteroides* желчь-эскулиновый агар (ВВЕ))**

Среда используется для селективного выделения, идентификации и культивирования микроорганизмов группы *Bacteroides fragilis*, включая *Parabacteroides spp.* и *Bilophila wadsworthia*. Микроорганизмы образуют колонии >10 мм. Вокруг колоний микроорганизмов, способных к гидролизу эскулина, наблюдается почернение агара. Ингибируется рост большинства грамположительных аэробов и анаэробов, представителей порядка *Enterobacteriales*. 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 °С в анаэробных условиях образуют хороший или обильный рост *Bacteroides fragilis* ATCC25285, *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482, слабый или нет роста *Proteus mirabilis* ATCC12453 и ингибируют рост *Clostridium perfringens* ATCC13124.

### **Анаэробный канамицин-ванкомицин кровяной агар (KV)**

Эта среда полезна для селективного выделения большинства *Bacteroides spp.*, *Prevotells spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Veillonella spp.* из образца, содержащего аэробные и анаэробные бактерии. Содержит CDC, основу анаэробного агара, добавлено 100 мг/л канамицина и 7,5 мг/л ванкомицина. Канамицин ингибирует факультативно-анаэробные грамотрицательные палочки, ванкомицин ингибирует грамположительные бактерии, *Porphyromonas spp.*

### **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 референс-

ные штаммы после инкубации при  $35 \pm 2$  °С 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 °С в бескислородной атмосфере наблюдается хороший обильный рост *Bifidobacterium breve* ATCC 15698, *Bifidobacterium infantis* ATCC 25962, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 15696.

### **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.

### **Дефибринированная 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 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  $35 \pm 2$  °С 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 г сухой желчи растворить в 8,0 мл дистиллированной воды, проавтоклавировать 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 °С.

### ***Полоски для индикации индола***

Для приготовления индикаторных бумажек готовят раствор:

- парадиметиламинобензальдегид – 5,0 г;
- ортофосфорная кислота – 10,0 мл;
- спирт этиловый 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 °С.
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 °С.
3. 0,01% раствор витамина К1 (или менадиона). Растворяют 1 мл 1% раствора витамина К1 в 100 мл дистиллированной воды. Хранят при 4 °С в темном флаконе.
4. Раствор резазурина (0,005% раствор, соотношение 1 : 10). Растворяют 5 мг резазурина в 50 мл дистиллированной воды. Хранят в темном месте при комнатной температуре.

### **6.3. 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 часа от момента взятия. Весь биологический материал, поступающий в лабораторию, должен быть правильно промаркирован и/или штрихкодирован.

Сбор проб, хранение и транспортировка биоматериала определяется в каждом конкретном случае с учетом симптоматики заболевания в соответствии с нормативными документами [30, 31]. 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 с небольшим исключением собираются с закрытых мест. Гной, материал из свища забирают из глубоких отделов пораженного участка и помещают в анаэробную транспортную среду. Фрагменты мышц и костной ткани размером 1 × 1 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 проводят через 30 минут, и далее еще через 30 минут после повторного взятия крови. Флаконы с кровью маркируют (штрихкодируют) 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!**

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 см<sup>3</sup>, в отдельные стерильные пробирки (выделение одних и тех же микроорганизмов из нескольких образцов позволяет исключить контаминацию биообразца).

### ***Образцы материалов, которые не исследуют на анаэробные бактерии:***

- мазки из зева и носоглотки;
- мазки с десны;
- мокроту, полученную при откашливании или аспирации через назотрахеальный катетер и бронхоскопические образцы;
- мазки с поверхности ран, поверхности пролежней, язв, мазки со стенок абсцессов, со слизистых оболочек, со струпов;
- мочу, полученную при естественном мочеиспускании;
- материал по соседству с кожей или слизистыми оболочками.

Наибольшее клиническое медицинское значение из всех живущих в макроорганизме анаэробов имеют представители определенных родов и виды.

Таблица 4

Клинически значимые анаэробные микроорганизмы (Procop G.W. et al., 2017)

<b>Морфология и окраска по Граму</b>	<b>Роды анаэробов</b>
Грамположительные спорообразующие палочки	<i>Clostridium</i>
Грамположительные неспорообразующие палочки	<i>Actinomycetes, Bifidobacterium, Eubacterium, Cutibacterium, Mobiluncus, Lactobacillus</i>
Грамнегативные палочки	<i>Bacteroides, Fusobacterium, Prevotella, Porphyromonas</i>
Грамположительные кокки	<i>Peptococcus, Peptostreptococcus, Streptococcus</i>
Грамнегативные кокки	<i>Veillonella</i>

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 табл. 5.

Таблица 5

Биоматериалы для проведения исследования на анаэробную инфекцию

<b>Локализация</b>	<b>Биологический материал</b>
Голова и шея	Аспираты абсцессов, полученные шприцем с иглой после деkontаминации поверхности. Биоптат, полученный при операции. Мазки, полученные во время операции, при невозможности получения биоптата
Легкие	Транс трахеальный аспират. Материал, полученный из легкого при чрескожной пункции. Биоптаты, полученные во время операции. Пробы при проведении бронхоскопии, полученные защищенной щеткой. Пробы, полученные при проведении тораcotомии. Мазки, полученные во время операции, при невозможности получения биоптата

Локализация	Биологический материал
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 чрескожной 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 чрескожной аспирацией предварительно очищенной кожи. Глубокие аспираты поверхностных изъязвлений, полученные чрескожной 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

### **6.3.1. 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 1 мл 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 нанесен стерильный глицерин (10%) в количестве 0,3–0,5 мл, тиогликолевая среда может использоваться в дальнейшем и как среда накопления. Транспортные среды должны сохранить анаэробные бактерии до момента их высева 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.

### **6.3.2. 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 об-

разцы должны быть помещены в транспортные среды для анаэробов или тиогликолевую среду.

### **6.3.3. 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 исследование, Ф. И. О. обследуемого лица; возраст или дату 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 приема); Ф. И. О., должность медицинского работника, отправившего биоматериал, дату отправки биоматериала и контактный телефон, по которому можно связаться с данным медицинским работником.

### **6.3.4. 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 [39].

## **6.4. 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 поступив-

шего 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:

1. Свежеразлитые образцы (в течение 2 часов после приготовления) или чашки с питательными средами для посева биоматериала, которые находились менее суток в бескислородной атмосфере (в анаэростате). Чашки с агаром, которые были приготовлены ранее чем за 2 часа, необходимо вначале поместить в перчаточный бокс или микроанаэростат на 4–15 часов до использования, чтобы восстановить среду.

2. 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.

3. Обогащенную питательную среду для контроля стерильности или тиогликолевую среду, или, при отсутствии добавок для ее приготовления, питательную среду для контроля стерильности.

4. Общепринятые селективные 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 тупфера (используя всю поверхность) также наносят на небольшой участок агара и рассеивают методом «истощения». После этого тупфер 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 залит небольшим количеством жидкой среды для анаэробов или 10% ли-

зированной 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 °С. Первичный посев можно проводить в условиях обычной атмосферы. Но в этом случае необходимое 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 посе­вы. В случае использования анаэробной рабочей станции все манипуляции с биоматериалом (первичная пробоподготовка, посев) происходят внутри рабочей камеры в бескислородной атмосфере и не регламентируются по времени проведения манипуляций.

### **Процедуры анаэробного поддержания [1]**

1. Анаэростат используют в трех вариантах: чистые чашки со средой, чашки с первичным свежим посевом, чашки с колониями выросших микроорганизмов для культивирования.
2. Приготовленные чашки с агаром могут храниться в холодильнике до 6 недель в целлофановых пакетах.
3. Восстанавливаемая среда помещается в первый анаэростат для непрерывного промывания слабым потоком азота.
4. Чашки с восстановленной средой засеваются на поверхность по одной в окружающем воздухе и немедленно помещаются в следующий анаэростат, который также промывает чашки азотом. Этот анаэростат используют для хранения чашек, взятых из анаэростата с GasPak для культивирования.
5. После того как анаэростат, содержащий свежие инокулированные чашки, заполнен, необходимо заменить атмосферу анаэростата на анаэробную (с помощью Gaspak или инертным газом) для инкубации при 35–37 °С.



#### 6.4.1. 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.

#### 6.5. Микроскопическое исследование патологического материала

Для микроскопии мазки окрашивают по Граму или по Граму в модификации Копелова (приложение 3) для световой и акридин-оранжем для люминесцентной микроскопии. Фиксировать мазки лучше метанолом, чем над спиртовкой.

При микроскопии отмечают: тинкториальные характеристики, размер, форму, расположение бактерий, наличие спор, их форму и расположение в бактериальной клетке, разветвление, нити при сферических телах, заостренные концы, гранулированные формы. Подробно описывают все обнаруженные виды организмов. Отдельные виды анаэробных бактерий имеют уникальную морфологию. Например, для *Fusobacterium nucleatum* характерны тонкие зернистые грамтрицательные палочки с заостренными концами, для *C. perfringens* – крупные грамположительные палочки с обрубленными концами. Обнаружение очень мелких грамтрицательных 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.

#### 6.6. Выделение на искусственных питательных средах

После 48 часов инкубации проводят первый учет чашек с отсевом типичных колоний на питательные среды для анаэробов для изучения культуральных свойств микроорганизмов и последующей идентификации. На чашках с первичным посевом исследуют морфологию колоний при помощи стереоскопического микроскопа и отмечают гемолиз, раз-

мер, отличительные характеристики колоний, цвет колоний, поверхность (сверкающая или тусклая), плотность (непрозрачная, полупрозрачная), консистенцию (маслянистая, вязкая, перепончатая, хрупкая).

Окрашивают по Граму, проверяют аэротолерантность, для этого отсевают 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 материала 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 37 °С. 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 рассеивают параллельно секторами на две чашки: с анаэробным геммагаром 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 бактериоиды, 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 микроанаэростат на 1–4 суток для обнаружения медленно растущих анаэробов, а чашки с 5% кровяным агаром – в термостат.

На следующий день (4-й 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.

### **6.7. 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 грамнегативные палочки, представлены на рис. 2.

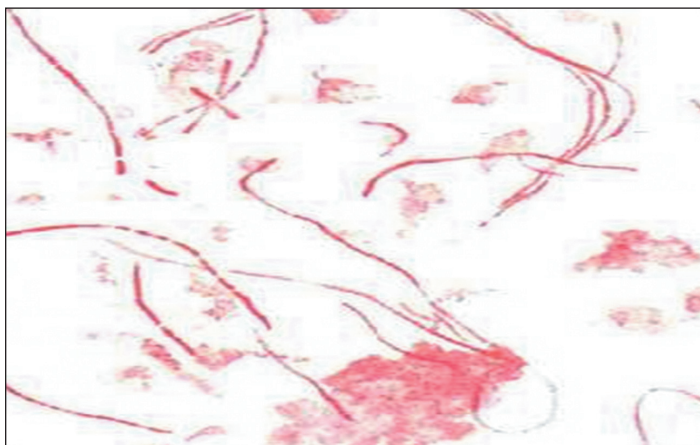


Рис. 2. *Fusobacterium nucleatum*

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

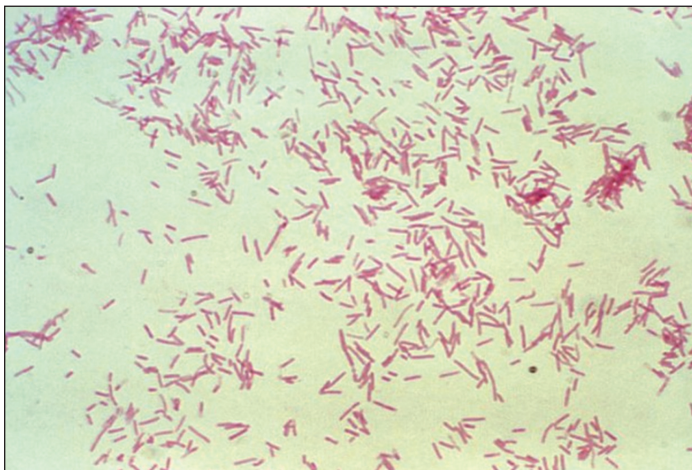


Рис. 3. *Bacteroides* spp.

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



Рис. 4. *Clostridium perfringens*

Для идентификации используют культуры анаэробных бактерий с секторов первичного посева 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 Т-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:

5) на 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 анаэроостат, среду 2 инкубируют в термостате, среду 1 – в эксикаторе с зажженной свечой или CO<sub>2</sub>-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* характерны растущие 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 бактероиды, 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 окрашиваются 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 не отличимы от стафилококков и стрептококков.

### **Идентификация анаэробов с использованием фенотипических характеристик**

Методов много, и полностью они расписаны в Лабораторном руководстве по анаэробной бактериологии (Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual) [1].

1. Коммерческие микросистемы: API-20A (bio Merieux, Minitek (Becton Dickinson)), эти системы требуют ночной инкубации.

2. Упакованные комплекты, которые тестируют ферменты без инкубации в течение ночи: API-ZYM kit (bio Merieux), Crystal Anaerobe Identification System (Becton Dickinson), MicroScan Specialty Rapid Anaerobe Panel (Siemens), RapID-ANA II (Oxoid), Vitek 2 ANC Card (bio Merieux). Эти наборы популярны и широко используются.

3. Определение продуктов метаболизма при помощи газожидкостной хроматографии.

4. Молекулярные и масс-спектрометрические (MALDI-ToF) методы.

### **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 азотолерантность**

Отсутствие роста на кровяном агаре, инкубированном в термостате (эксикаторе, CO<sub>2</sub>-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, бактериоиды 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 бактериоидов. Последние, за исключением *Bacteroides ureolyticus*, устойчивы к этому препарату.

Б. Устойчивость к полимиксину и ристомичину. Грамположительные бактерии обычно чувствительны к ристомичину, но устойчивы к полимиксину. Грамотрицательные устойчивы к ристомичину, 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 бактериоидов 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 гидролизировался, 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 (при использовании реактива Грисса) цвет. 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 анаэроустате 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 на-



личию 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 тупфером 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 °С 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 определенные 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-я группа – *Bacteroides fragilis*. Все бактерии этой группы сбраживают глюкозу и способны расти в присутствии желчи и канамицина, бриллиантовый зеленый подавляет их рост.
- 2-я 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-я 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-я группа – бактерии рода *Fusobacterium*. Не растут в присутствии желчи и канамицина, но растут в присутствии бриллиантового зеленого.

Для выявления группы *Prevotella melaninogenica* / *Porphyromonas asaccharolytica* и некоторых других строгих анаэробов (*Fusobacterium spp.*, *Clostridioides difficile*) первичные посеы возможно исследовать в лучах длинноволнового ультрафиолетового излучения, при использовании лю-

минесцентного 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 могут использовать для идентификации облигатно-анаэробных микроорганизмов метод время-пролетной 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 посеве 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.

## 6.8. 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 [42]. Молекулярно-генетические методы позволяют диагностировать инфекцию быстрее культурального метода и проверять корректность отрицательных результатов других методов диагностики инфекции [43]. 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* [44].

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 [45, 46].

## 6.9. 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, микроанаэростате) в течение 2–3 суток. Для получения достоверного результата необходимо использовать метод двухэтапной идентификации: прямого нанесения, с последующим подтверждением идентифицированной культуры методом экстракции 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 ее 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 данных по образцу [44, 47].

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 агара, соответствующего первоначальному, для выделения чистой культуры и через 24–48 часов инкубации провести подтверждение культуры методом экстракции белков с использованием муравьиной кислоты. Для этого необходимо внести в пробирку 300 мкл деионизированной 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% этилового спирта, полученную смесь тщательно перемешать 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% 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 6

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

Реактив	Бактериологическая петля		Колонии	
	10 мкл	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 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 деионизированной воды добавить 50 мкл 80% трифторуксусной кислоты и после перемешивания пипетированием инкубировать при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем добавить 150 мкл ультрачистой деионизированной воды и 200 мкл ацетонитрила, перемешать пипетированием и центрифугировать в течение 2 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 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 2000–20 000 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 ревалентную исходному спектру таксономическую единицу базы данных с указанием значения коэффициента соответствия – Score.

Результаты идентификации помечены одним из трех цветов: зеленый, желтый или красный (табл. 7). После завершения процесса идентификации результат выводится в таблицу классификации, показывающую наилучший результат идентификации полученных спектров.

*Таблица 7*

Интерпретация достоверности полученной идентификации

<b>Диапазон Score</b>	<b>Описание</b>	<b>Символы</b>	<b>Цвет</b>
2,200–3,000	Высокий уровень видовой идентификации	(+++)	<b>Зеленый</b>
2,000–2,199	Надежная родовая идентификация, возможная видовая идентификация	(++)	<b>Зеленый</b>
1,700–1,999	Возможная родовая идентификация	(+)	<b>Желтый</b>
0,000–1,699	Ненадежная идентификация	(-)	<b>Красный</b>

## 7. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБИОТИКАМ

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 (табл. 8), 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 °С в анаэробных условиях и учитывают результаты.

Таблица 8

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 <sub>1</sub>	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

*Примечание.* <\*> Диски могут изготавливаться в лаборатории.

Чувствительными считают 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 E-теста. В месте пересечения эллипсоидной зоны подавления роста с полоской E-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.

В настоящее время CLSI рекомендуют метод разведения на агаре для определения антимикробной чувствительности для большинства анаэробов в рутинной клинической лаборатории. Однако для группы *B. fragilis* как альтернативный метод предлагают метод микроразведения на жидкой питательной среде. В последний документ (*CLSI M 11-A8, 2012*) включен метод определения  $\beta$ -лактамазы у анаэробов. Среда для определения чувствительности должна быть бруцеллезным агаром, содержать 5 мг гемина и 1 мг витамина K1 на мл среды, 5% крови барана, можно использовать среду Вилкинса–Чалгрена. E-тест для определения чувствительности не включен в документ *CLSI*, но, по данным литературы, его можно использовать. Технику диффузии на агаре дисков с антибиотиками, которые раньше использовали, сейчас не рекомендуют в силу медленного роста некоторых анаэробов, плохой корреляции между размерами зон и результатами минимальной ингибирующей концентрации при методе разведения [16]. В табл. 9 представлена чувствительность анаэробов к антибиотикам в процентах в результате многоцентрового исследования.

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/>), (EUCAST v11 2021 (European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing)). Для определения чувствительности анаэробных бактерий следует использовать один из методов определения минимальной подавляющей концентрации (МПК). Критерии интерпретации результатов для диско-диффузионного метода не установлены.



Чувствительность выделенных анаэробов в % (Proscor G.W. et al., 2017)

Микроорганизмы	Amp/ Sulb	Pip/ Tazo	Cefox	Carb	Pen	Clinda	Moxi	Metron
<i>B. fragilis</i> группа	86	95	65	>96	0	50	50	100
<i>B. fragilis</i>	89	98	85	>96	0	>60	50	100
<i>Fusobacterium</i>	100	100	100	100	40	100	95	100
<i>Prevotella</i>	98	99	99	100	40	66	59	100
Грамположитель- ные кокки	98	100	100	100	96	78	82	98
<i>Veillonella</i>	100	61	100	100	57	89	79	86
<i>Cutibacterium acnes</i>	100	100	100	100	100	100	100	3
<i>C. perfringens</i>	100	100	100	100	100	98	99	100
<i>C. difficile</i>	100	100	100	0	0	5	78	100
<i>C. ramosum</i>	100	100		100	100	82		98
<i>C. septicum</i>						100		100
<i>C. sordellii</i>	100				100	94		95
<i>C. tertium</i>	100				100	100		100

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 °С анаэробный гемагар (агар Шадлера, среду Вилкинса–Чалгрена). После застывания чашки подсушивают и используют немедленно или выдерживают в микроанаэрозоле 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/мл и с помощью репликатора (петли) наносят на поверхность агара. Для контроля правильности определения минимальной подавляющей концентрации в набор штаммов рекомен-

дуются 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 10

Природная резистентность и редкие фенотипы

<b>Микроорганизм</b>	<b>Правило</b>
<i>Bacteroides spp.</i>	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

## 8. 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 высевах на кровяной агар, а также микроскопическое исследование позволяют 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 – селективную для роста аэробных и анаэробных микроорганизмов;
- б) среду для контроля стерильности или тиогликолевую среду с налиндиксовой кислотой – для выделения анаэробов из ассоциаций с колиформными бактериями;
- в) среду для контроля стерильности или тиогликолевую среду, содержащую канамицин и желчь – для селективного выделения бактерий родов группы *Bacteroides fragilis*.

Посевы инкубируют в термостате в обычной атмосфере при 37 °С в течение 2–7 дней.

3. При появлении видимого роста из каждой среды готовят мазки и производят высева на 5% кровяной агар. Посевы инкубируют при 37 °С в обычной атмосфере и в CO<sub>2</sub>-инкубаторе 24–48 часов.

4. Учет результатов посевов.

Оценка результатов первичного посева и высевов на кровяной агар представлена в табл. 11. 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 CO<sub>2</sub>-инкубаторе, будет получен рост бактерий.

Таблица 11

Оценка результатов посева на элективные 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 к группе <i>B. fragilis</i>	Отсутствуют
+	+	+	-	-	-	-	Энтеробактерии
+	+	+	+	-	-	-	Грамположительные бактерии

Примечание. (+) – 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.

## 9. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 9.1. Контроль анаэробноз

Мониторирование анаэробных условий осуществляют при помощи окислительно-восстановительного индикатора: метиленовая синь в виде тест-пробирок. Цвет меняется при +11,0mV. Можно поместить пробирку с тиогликолевой средой или сахарным бульоном с 1–2 каплями 1% метиленовой сини под ватно-марлевой пробкой, среда имеет синий цвет. При анаэробных условиях синий цвет исчезает. При открытии анаэростата в пробирке появляется синее облачко. Для контроля анаэробноз в микроанаэростате или анаэробной рабочей станции используют один из следующих способов.

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Коммерческие тесты для контроля анаэробноз.

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

### 9.2. Внутрилабораторный контроль качества исследования

Порядок ведения внутреннего контроля качества, периодичность и частота выполняемых процедур устанавливаются действующей в лаборатории системой менеджмента качества в соответствии с нормативной документацией [29, 30, 48, 50, 52, 53]. Внутрилабораторный контроль качества включает преаналитический, аналитический и постаналитический

этапы ведения лабораторных исследований. Необходимо также проводить периодические, не реже 1 раза в год, проверки 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 обработке 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.

### **9.3. 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.

Применение 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 *C. 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 <sup>2</sup>	0,25	0,5	1. <b>Пограничные значения для оценки чувствительности грамположительных анаэробных бактерий установлены для в/в применения.</b> 2. Чувствительность к незащищенным ампициллину, амоксициллину и пиперациллину оценивается на основании результатов определения чувствительности к бензилпенициллину. 3. Для определения чувствительности используется фиксированная концентрация сульбактама – 4 мг/л. 4. Для определения чувствительности используется фиксированная концентрация клавулановой кислоты – 2 мг/л. 5. Для определения чувствительности используется фиксированная концентрация тазобактама – 4 мг/л
Ампициллин <sup>2</sup>	4	8	
Ампициллин/сульбактам	4 <sup>2</sup>	8 <sup>2</sup>	
Амоксициллин <sup>2</sup>	4	8	
Амоксициллин/клавулановая кислота	4 <sup>3</sup>	8 <sup>3</sup>	
Пиперациллин <sup>2</sup>	8	16	
Пиперациллин/тазобактам	8 <sup>4</sup>	16 <sup>4</sup>	
Тикарциллин <sup>2</sup>	8	16	
Тикарциллин/клавулановая кислота	8 <sup>3</sup>	16 <sup>3</sup>	
Дорипенем	1	1	
Эртапенем	0,5	0,5	
Имипенем	2	4	



Антибактериальный препарат	Пограничные значения МПК (мг/л)		Примечания Цифрами обозначены примечания, относящиеся к общим комментариям и/или пограничным значениям МПК
	Ч ≤	Р >	
Имепенем-релебактам <sup>2</sup>	2 <sup>1</sup>	2 <sup>1</sup>	1. Для определения чувствительности используется фиксированная концентрация релебактама – 4 мг/л. 2. <i>Назначение ингибиторозащитных бета-лактамов не обеспечивает 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 (ЕСОФФ 4 мг/л)		

Антибактериальный препарат	Пограничные значения МПК (мг/л)		Примечания Цифрами обозначены примечания, относящиеся к общим комментариям и/или пограничным значениям МПК
	Ч ≤	Р >	
Ванкомицин	2	2	Пограничные значения основаны на значениях эпидемиологической точки отсечения (ЕСОФФ) и применимы при пероральной терапии ванкомицином инфекций, ассоциированных с <i>S. 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 (ЕСОФФ 0,25 мг/л)		
Даптомицин	Для определения МПК даптомицина среда должна содержать Са <sup>2+</sup> (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 (ЕСОФФ 4 мг/л)		
Фузидиевая кислота	С терапевтической целью не используется. Определение чувствительности проводится только в целях эпидемиологического мониторинга (ЕСОФФ 2 мг/л)		
Фидаксомицин	Пограничные концентрации и ЕСОФФ 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 (ЕСОФФ), которое разграничивает изоляты «дикого типа» от изолятов со сниженной чувствительностью
Рифампицин	С терапевтической целью не используется. Определение чувствительности проводится только в целях эпидемиологического мониторинга (ЕСОФФ 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 <sup>1</sup>	0,25	0,5	1. Чувствительность к незащищенным ампицилину, амоксицилину 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 <sup>1</sup>	0,5	2	
Ампициллин/сульбактам	4 <sup>2</sup>	8 <sup>2</sup>	
Амоксициллин <sup>1</sup>	0,5	2	
Аммоксициллин/клавулановая кислота	4 <sup>3</sup>	8 <sup>3</sup>	
Пиперациллин <sup>1</sup>	16	16	
Пиперациллин/тазобактам	8 <sup>4</sup>	16 <sup>4</sup>	
Тикарциллин <sup>1</sup>	16	16	
Тикарциллин/клавулановая кислота	8 <sup>3</sup>	16 <sup>3</sup>	
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 обнаружено. По этой причине пограничные значения для клинической интерпретации не приводятся		
Миноциклин			
Тетрациклин			
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.

## Приложение 2. Материально-техническое оснащение, необходимое для выполнения исследования

Наименование медицинских изделий, оборудования, мебели	Наименование реактивов и расходных материалов
<b>Базисное оснащение</b>	
Ламинарный бокс 2-го 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

Наименование медицинских изделий, оборудования, мебели	Наименование реактивов и расходных материалов
Дозаторы переменного объема полуавтоматические	Питательная среда – основа кровяного агара для неселективного культивирования прихотливых бактерий
Контейнеры для сброса отходов	Кровь (баранья, лошадиная) дефибрированная для питательных сред, стерильная
Емкости с дезинфицирующим раствором	Реагенты для определения уреазной, каталазной и оксидазной активности
Спирт этиловый 95°	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	Восковые карандаши, 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	
<b>Дополнительное оснащение</b>	
Автоматизированное рабочее место (сканер штрихкодов, компьютер с ЛИС, принтер)	Готовые питательные среды в чашках Петри
Анализатор для гемокультивирования	

<b>Наименование медицинских изделий, оборудования, мебели</b>	<b>Наименование реактивов и расходных материалов</b>
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

Предварительная идентификация анаэробных грамотрицательных палочек (Procop G.W. et al., 2017)

Микро-организмы	Рост на 20% желчном агаре	Красная флюоресценция	Коричнев. или черн. колонии	Индол	H <sub>2</sub> S	Липаза	Чувствительность			
							P	R	C	K
<i>B. fragilis</i> группа	+	-	-	V	-	-	R	S	R	R
<i>Prevotella/ Porphyromonas</i>	-/+	+	+	+	-	-/+	S/R	S	R	R
<i>B. ureolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	S	S	S	
<i>F. nucleatum</i>	-	-	-	+	-	-	S	S	S	S
<i>F. necroforum</i>	V	-	-	+	+	+	S	S	S	S
<i>F. mortiferum</i>	+	-	-	-	+	-	R/S	R	S	S
<i>F. varium</i>	+	-	-	V	+	V	R/S	R	S	S
<i>Bilophila wadsworthia</i>	+	-	-	-	+	-	R	S	S	S

Примечание. P – пенициллин; R – рифампин; C – канамицин; K – колистин.

Характеристики обычных членов группы *Bacteroides fragilis* (Procop G.W. et al., 2017)

Виды	Индол	Ката-лаза	Ферментация					
			Ара-бин	Цел-лоби	Рамн	Салиц	Тре-гал	Кси-лан
<i>B. caccae</i>	-	-	+	+/-	+/-	-/+	+	-
<i>B. dorei</i>	-		+	-	+	-	-	
<i>B. eggerthii</i>	+	-	+	-/+	+/-	-	-	+
<i>B. finegoldii</i>	-		+	+	+	+	-	
<i>B. fragilis</i>	-	+	-	+	-/+	-	-	-
<i>B. massiliensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	
<i>B. ovatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. stercoris</i>	+		-/+	+	+	-/+	-	V
<i>B. thetaiotaomi-cron</i>	+	+	+	+	+	-/+	-	+
<i>B. uniformis</i>	+	-/+	+	+	-/+	+	-	V
<i>B. vulgatus</i>	+	-/+	+	-	+	-	-	-/+

Примечание. Арабин – арабиноза; целлоби – целлобиоза; рамн – рамноза; салиц – салицин; трегал – трегалоза.

Характеристика *Cutibacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Eubacterium spp.*,  
*Lactobacillus spp.* (Procop G.W. et al., 2017)

Виды	Аэро- толерант- ность	Каталаза	Про- дукция индола	Восста- новление нитратов	Гидролиз эскулина
<i>P. acidifaciens</i>	-	-	-	-	-
<i>P. acnes</i>	+	+	+	+	-
<i>P. avidum</i>	+	+	-	-	+
<i>P. granulosum</i>	+	+	-	-	-
<i>P. propionicum</i>	-	-	-	+	-
<i>Bifidobacterium spp.</i>	-/+	-	-	-	+
<i>B. scardovii</i>	+	-	-	-	+
<i>Eubacterium spp.</i>	-	-	V	-/+	
<i>Lactobacillus spp.</i>	V	-	-	-/+	+/-

Характеристики грамположительных анаэробных кокков  
(Procop G.W. et al., 2017)

Виды	Продукция индола	Восстановление нитратов	Мочевина	Ферментация глюкозы
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	-	-	-	-
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>		+	+	+
<i>S. aureus subsp. anaerobius</i>		+		+

Характеристики грамотрицательных анаэробных кокков  
(Procop G.W. et al., 2017)

Виды	Ката- лаза	Восста- новление нитратов	Фермен- тация глюкозы	Микро- аэрофиль- ный рост	Продук- ция газа
<i>Acidaminococcus spp.</i>	-	-	-	-	+
<i>Anaeroglobus spp.</i>	-	-	+	-	-
<i>Megasphaera spp.</i>	-	-	+	-	+
<i>Negativicoccus spp.</i>	-	-	-	+	-
<i>Veillonella spp.</i>	V	+	-	-	+



## 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 добавить 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 с возможностью 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%;
- 70% трифторуксусная кислота;
- α-циано-4-гидроксикоричная кислота CAS: 28166-41-8;
- бактериальный калибровочный стандарт (BTS, р/п 8255343) или эквивалент;
- растворитель для высокоэффективной жидкостной хроматографии (этанол ≥99,8% денатурированный C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O, молярная масса 46,07 г/моль).

#### **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, используемые при идентификации микроорганизмов, необходимо подвергнуть тщательной очистке, которую проводят с применением 70% раствора этанола и 80% 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% этанола до полного покрытия поверхности MSP-мишени;
- выдержать при комнатной температуре мишени в растворе 70% этанола в течение 5 минут;
- вынуть MSP-мишень и тщательно промыть ее в проточной водопроводной воде;
- используя безворсовую лабораторную салфетку, смоченную в 70% 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% водного раствора трифторуксусной кислоты;
- интенсивно протереть поверхность MSP-мишени безворсовой салфеткой;
- промыть MSP-мишень деионизированной 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 неограниченное время в сухом защищенном месте (в пластиковой упаковке), чтобы избежать загрязнений поверхности.

## **Приложение 6. 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. Закрывать крышку картриджа и поместить его в модуль аппарата GeneXpert Dx. Просканировать штрихкод 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. Sutter, Vera L., Diane M. Citron and Sydney M. Finegold. «Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual», 1980. Medicine. Corpus ID: 83611914.
2. Procop G.W., Church D.L., Hall G.S. et al. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 7th Ed. – Wolters Kluwer, USA, 2017. – P. 983–1073.
3. Кочеровец В.И., Михайлова В.С., Миронов А.Ю. и др. Методы микробиологического анализа неспорообразующих анаэробных бактерий: Руководство Научно-методического центра по клинической лабораторной диагностике Минздрава РФ. – М.: Лабинформ, 1996. – С. 56.
4. Колесов А.П., Столбовой А.В., Кочеровец В.И. Анаэробные инфекции в хирургии: Монография. – Л.: Медицина, 1989. – С. 160.
5. Шельгин Ю.А., Алешкин В.А., Сухина М.А. и др. 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.
6. Schoch C.L., Ciufu S., Domrachev M. et al. 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
7. Prevot A.R., Turpin A. et Kaiser P. Les bacteries anaerobies. – 1967. – P. 569.
8. Меньшиков В.В. Методики клинических лабораторных исследований: Справочное пособие. Том 3. Клиническая микробиология. – М.: Лабора, 2009. – 880 с.
9. Клиническая лабораторная аналитика. В 5 томах. Том. IV. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории / Меньшиков В.В. – М.: Агат-Мед, 2003. – 816 с.
10. Корнеева О.Н., Ивашкин В.Т. Антибиотикоассоциированный колит: патоморфология, клиника, лечение // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2007. – Т. 17. – № 3. – С. 65–71.
11. Finegold S.M. Anaerobic bacteria: general concepts. In Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R. eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and

- Practice of Infectious Diseases. Vol. 2, 5th Ed. – Philadelphia, PA: Churchill Livingstone, 2000. – P. 2519–2537.
12. Finegold S.M., Song Y., Liu C. Taxonomy: general comments and update on taxonomy of Clostridia and anaerobic cocci // *Anaerobe.* – 2002. – Vol. 8. – P. 283–285.
  13. Bartlett J.G. Anaerobic bacterial infection of the lung // *Anaerobe.* – 2012. – Vol. 18. – P. 235–239.
  14. Finegold S.M. *Anaerobic Bacteria in Human Disease.* – New York, NY: Academic Press, 1977.
  15. Jenkins S.G., Schuetz A.N. Current concepts in laboratory testing to guide antimicrobial therapy // *Mayo Clin.Proc.* – 2012. – Vol. 87. – P. 290–308.
  16. 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.
  17. 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.
  18. 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.
  19. McFarland L.V. Emerging therapies for *Clostridium difficile* infections // *Expert opinion on emerging drugs.* – 2011. – Т. 16. – № 3. – С. 425–439.
  20. Knight D.R. et al. Diversity and evolution in the genome of *Clostridium difficile* // *Clinical microbiology reviews.* – 2015. – Т. 28. – № 3. – С. 721–741.
  21. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, ed. by R.E. Buchartan a. N.E. Gibbons. – Baltimore, 1975, bibliogr.
  22. Norman J.M. et al. Disease-specific alterations in the enteric virome in inflammatory bowel disease // *Cell.* – 2015. – Т. 160. – № 3. – С. 447–460.
  23. 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.
  24. Kazanowski M. et al. *Clostridium difficile*: epidemiology, diagnostic and therapeutic possibilities – a systematic review // *Techniques in coloproctology.* – 2014. – Т. 18. – № 3. – С. 223–232.
  25. 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.

26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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).
30. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».
31. 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».
32. ГОСТ Р ИСО 15189-2015 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
33. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 20 декабря 2012 г. № 1183н об утверждении номенклатуры должностей медицинских работников и фармацевтических работников.
34. Приказ Минздравсоцразвития РФ 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».
35. 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».



36. ГОСТ Р 52905-2007 (ИСО 15190:2003) Национальный стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Требования безопасности.
37. 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.
38. Федеральный закон от 4 мая 2011 г. N 99-ФЗ. О лицензировании отдельных видов деятельности.
39. Методические указания 4.2.2039-05. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. (Утв. главным государственным санитарным врачом РФ 23.12.2005).
40. ГОСТ Р 53079.4-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа.
41. 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.
42. Le R., Wallet G.F. Laboratory diagnosis of *Clostridium difficile* infection // *Ann Biol Clin Synthèse Ann Biol Clin*. – 2013. – Vol. 71. – P. 395–400.
43. Сухина М.А., Образцов И.В., Михалевская В.И. и др. Алгоритм лабораторной диагностики *Clostridium difficile*-ассоциированной диареи // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2018. – № 2. – С. 45–53.
44. O'Horo J.C., Jones A., Sternke M. et al. Molecular techniques for diagnosis of *Clostridium difficile* infection: systematic review and meta-analysis // *Mayo Clinic Proceedings*. – 2012. – Vol. 87. – P. 643–651.
45. Kim H., Jeong S.H., Kim M. et al. 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. – Vol. 61. – P. 274–277.
46. Collins D., Elliott B., Riley T.V. Molecular methods for detecting and typing of *Clostridium difficile* // *Pathology*. – 2015. – Vol. 47. – P. 211–218.
47. Kuhl S.J., Tang Y.J., Navarro L. et al. Diagnosis and Monitoring of *Clostridium difficile* Infections with the Polymerase Chain Reaction // *Clinical Infectious Diseases*. – 1993. – Vol. 16 (4). – S. 234–238.
48. Putsathit P., Morgan J., Bradford D. et al. Evaluation of the BD Max Cdiff assay for the detection of toxigenic *Clostridium difficile* in human stool specimens // *Pathology*. – 2015. – Vol. 47. – P. 165–168.

49. Ciaran P., Kelly M.D., Thomas J., La Mont M.D. Clostridium difficile –associated diarrhea and colitis // The New England Journal of Medicine. – 2008. – P. 1939–1940.
50. Методические указания для работы на приборах серии flex компании Bruker Daltonics. Прямое белковое профилирование. – М., 2010. – С. 45.
51. Vocale C., Rimoldi S.G., Pagani C. 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. – Vol. 34. – e33–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2015.02.011>.
52. EUCAST v11 2021(European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing).
53. Клинические рекомендации по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (версия 2021 – 1).
54. Turnidge J., Kahlmeter G. and Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values // Clin Microbiol Infect. – 2006. – Vol. 12. – P. 418–425.
55. 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.
56. 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.
57. ГОСТ Р ИСО 22870-2009. Национальный стандарт Российской Федерации. Исследования по месту лечения. Требования к качеству и компетентности.
58. ГОСТ Р 53079.1-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Правила описания методов исследования.
59. 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.

60. 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.
61. Kilpper-Bälz R., Schleifer K.H. 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*. – December 1981. – Vol. 2 (4). – P. 324–331.
62. Itzhak Brook. *Anaerobic Bacteria // Infectious Diseases (Fourth Edition)*. – 2017. – Vol. 2. – P. 1628–1644.e2. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00184-2>.
63. Brook I. The role of anaerobic bacteria in bacteremia // *Anaerobe*. – 2010. – Vol. 16. – P. 183–189.
64. Kierzkowska M., Majewska A., Kuthan R.T. et al. A comparison of Api 20A vs MAKDI-TOF MS for routine identification of clinically significant anaerobic bacterial strains to the species level // *J. Microbiol Methods*. – 2013. – Vol. 92. – P. 209–212.
65. Jousimies-Somer H.R., Summanen P., Citron D.M. et al. *Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual*, 6th Ed. – Belmont, CA: Star, 2002.
66. Sapico F.L., Sarma R.J. Infective endocarditis due to anaerobic and microaerophilic bacteria // *West J. Med.* – 1982. – Vol. 137. – P. 18–23.
67. Westblom T.U., Gorse G.J., Milligan T.W. et al. Anaerobic endocarditis caused by *Staphylococcus saprophyticus* // *J. Clin. Microbiol.* – 1990. – Vol. 28. – P. 2818–2819.
68. Brook I. Infective endocarditis caused by anaerobic bacteria // *Arch. Cardiovasc. Dis.* – 2008. – Vol. 101. – P. 665–701.

# ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ АНАЭРОБНОЙ ИНФЕКЦИИ

ООО «Издательство «Триада».  
ИД № 06059 от 16.10.01 г.  
170034, г. Тверь, пр. Чайковского, 9, оф. 514  
Тел./факс: (4822) 42-90-22, 35-41-30  
E-mail: triadatver@yandex.ru  
<http://www.triada.tver.ru>

Подписано к печати 14.02.22. Формат 60×90 1/16.  
Гарнитура Minion Pro. Бумага мелованная.  
Усл. печ. л. 5,25. Тираж 650 экз.

Заказ № .  
Отпечатано в ООО «Тверская фабрика печати».  
170006, г. Тверь, Беляковский пер., 46