

Российские рекомендации по клинической микробиологии

Методы посева биоматериала на питательные среды

Документ 3/25

Год утверждения: 2025

Разработчики рекомендаций:

Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы
«Федерация лабораторной медицины» (Ассоциация «ФЛМ»)

Межрегиональная ассоциация общественных объединений
«Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и
антимикробной химиотерапии» (МАКМАХ)

Оглавление

1 Общие принципы посевов	3
1.1 Посев на плотные питательные среды.....	3
1.2 Посев на жидкие питательные среды	4
1.3 Приготовление мазков.....	4
1.4 Асептическая техника	4
2 Подготовка образцов к посеву	5
3 Методы посева клинических образцов.....	6
3.1 Метод секторных посевов (по Голду).....	6
3.2 Метод Линдсея	9
3.3 Метод истощающего штриха.....	10
3.4 Метод Дригальского	10
3.5 Несекторный метод посева	10
3.6 Метод посева на селективные среды	11
3.7. Посев на жидкую питательную среду.....	12
3.8 Метод разведений	12
4. Список литературы.....	14

1 Общие принципы посевов

1.1 Для сохранения жизнеспособности микроорганизмов и получения достоверных результатов микробиологических исследований, необходимо соблюдать следующие условия:

- условия транспортировки образцов в лабораторию;
- временной интервал от взятия биоматериала до посева;
- условия безопасности при работе с образцами;
- условия выбора сред для первичного посева в зависимости от типа образца и его анатомического происхождения;
- учитывать необходимость предварительной обработки перед инокуляцией (например, центрифугирование, гомогенизация, разведение);
- условия культивирования: температура инкубации и атмосфера.

1.2 Посев на питательные среды и приготовление мазков должен проводиться в логическом порядке, от наименее селективных сред до наиболее селективных, чтобы избежать ингибирования организмов переносом селективного агента:

1. Среды без ингибиторов (например, кровяной агар);
2. Индикаторные среды (например, лактозо-цистиновый агар (КЛЕД-агар);
3. Селективные среды (например, ксилозо-лизиновый агар с дезоксихолатом XLD);
4. Мазки для окрашивания.

Если материала недостаточно для посева на полный набор сред, приоритеты должны основываться на виде образца и диапазоне вероятных микроорганизмов.

1.1 Посев на плотные питательные среды

Посев необходимо производить с помощью бактериологической петли или тампона, стараясь избегать контакта петли и краев чашки. Петли для посева могут быть проволочными или одноразовыми пластиковыми. Использование одноразовых петель предпочтительнее в целях снижения риска образования аэрозоля, содержащего патогенные микроорганизмы и снижения риска перекрестной контаминации посевов при недостаточной стерилизации многоразовых петель и других инструментов.

Необходимо правильно выбирать технику посева в зависимости от цели исследования и вида биоматериала. Для получения роста отдельных колоний образцы могут быть посеяны методом секторных посевов по Голду. При отсутствии такой необходимости, посев производится на сегмент чашки без дальнейшего распределения петель по поверхности среды. В зависимости от цели исследования можно использовать целые чашки, половину чашки или четверть чашки. При необходимости на посевах могут быть наложены диски с антибактериальными компонентами для предварительной

идентификации микроорганизмов (например, оптохин, бацитрацин). Диски следует размещать у края чашки, между вторым и третьим секторами, чтобы избежать полного ингибирования очень чувствительных организмов.

1.2 Посев на жидкие питательные среды

Клинические образцы, полученные в жидком виде, должны быть посеяны в первую очередь на жидкие питательные среды, что снижает риск перекрестной контаминации. Однако, при исследовании ректальных мазков и фекалий, посев на жидкие среды производят после плотных сред, чтобы избежать разбавления организмов, содержащихся в образце. При доставке биоматериала на тампоне в транспортной среде, тампон обычно помещается в бульон после посева на твердые питательные среды, в качестве резервного обогащения (следует учитывать возможность того, что с поверхности агаров загрязняющие вещества могут быть перенесены в бульон).

1.3 Приготовление мазков

Мазки для окрашивания обычно делают после того, как были засеяны все питательные среды, чтобы избежать контаминации питательных сред. В случае, когда мазок требуется сделать перед посевом на среды, можно воспользоваться стерильным предметным стеклом. Если предметное стекло нестерильное, нельзя прикасаться к нему петлей или тампоном, которые будут использованы для посева или помещать их обратно в образец после прикосновения к предметному стеклу.

1.4 Асептическая техника

При работе с образцами или культурами использование асептической техники имеет решающее значение для предотвращения контаминации образца и потенциального риска инфицирования работника. Сотрудники лаборатории, работающие с клиническими образцами или культурами, должны пройти соответствующую подготовку для получения этих навыков.

При посеве образцов или получении субкультур следует соблюдать следующие правила:

1. Пробки и колпачки пробирок, крышки контейнеров не следует класть на стол, а держать в руке во время посева, исключая загрязнения руки или крышки;
2. Одноразовая емкость для сброса петель должна находиться в непосредственной близости от оператора;
3. Для предотвращения попадания материала на кожу необходимо пользоваться средствами индивидуальной защиты: защитная одежда, маска, очки, перчатки;
4. Если для обработки образцов используются пинцет или ножницы, их следует стерилизовать перед использованием;

5. По возможности, необходимо использовать одноразовые пинцет или ножницы, после использования утилизировать их в контейнер для острых предметов.

Риск образования аэрозолей должен быть сведен к минимуму, что может быть достигнуто путем выполнения следующих правил:

- открывать крышки контейнеров с клиническими образцами необходимо строго в боксе биологической безопасности медленно и аккуратно, так как содержимое может находиться под давлением;
- перемешивать образец очень аккуратно, избегать энергичного встряхивания;
- по возможности не выдавливать последнюю каплю из пипетки;
- удалять лишнюю жидкость с тампона для посева на плотные питательные среды, поворачивая тампон внутри контейнера или пробирки.

2 Подготовка образцов к посеву

1. Перед началом процедуры следует тщательно осмотреть образец. При осмотре могут быть выявлены желто-коричневые гнойные участки; участки ржавого цвета, содержащие кровь; слизистые участки; коричнево-черные участки некротизированных тканей. Материал для приготовления мазка и посева должен быть взят из этих фрагментов.

2. В случае, если материал планируется посеять на одну или две среды, посев можно производить непосредственно тампоном. Если требуется окраска по методу Грама, или необходим посев на большее количество сред, тампон необходимо поместить в небольшое количество стерильного физиологического раствора или питательного бульона и встряхнуть. Затем отжать тампон о стенки пробирки и поместить его в емкость для сброса отходов. Полученную суспензию можно использовать для приготовления мазка и посева на питательные среды с помощью пипетки, либо петли.

3. Стерильные биологические жидкости, кроме мочи, для приготовления мазков на предметном стекле следует концентрировать с помощью центрифуги. Образцы объемом >1 мл центрифугируют (1500-2500g) и удаляют супернатант пипеткой. Осадок тщательно перемешивают (на вортексе или пипеткой) и используют для дальнейшего исследования.

4. Ткани и кости для получения бактериологических культур должны быть измельчены с использованием стерильного скальпеля, в ступке с пестиком, или диспергированы в автоматическом измельчителе. После измельчения в образец вносится небольшое количество жидкости, затем эту суспензию можно использовать для посева на питательные среды. Если требуется получить культуру микромицетов, то, кроме посева приготовленной суспензии, необходимо поместить небольшой кусочек неповрежденной ткани на поверхность агаровых сред.

5. Для образцов хирургических инородных тел (клапанов, электродов и др.) без видимых участков гноя, которые можно культивировать, необходимо добавить питательный бульон в стерильный контейнер с образцом и инкубировать при температуре 35° С в течение 18 часов. Затем сделать высев из бульона и приготовить препарат, окрашенный по методу Грама. Бульон необходимо продолжать инкубировать.

6. Образцы, доставленные для исследования на анаэробные микроорганизмы, должны быть засеяны на питательные среды как можно скорее после доставки в лабораторию. Среда следует помещать в анаэробную среду сразу после проведения посева. Инкубация анаэробов проводится в анаэробных контейнерах (контейнерах, боксах). При работе с анаэробными культурами необходимо учитывать их замедленный рост в сравнении с аэробными или факультативно анаэробными бактериями. Контейнеры не должны открываться на воздухе до истечения 48 ч инкубации, чтобы микроорганизмы в фазе роста не погибли от воздействия кислорода. Посевы следует культивировать в течение не менее 5 дней, прежде чем они будут признаны отрицательными. Более длительная инкубация посевов (не менее 7 дней) необходима для выделения актиномицетов, представителей рода *Propionibacterium* из протезных инфекций суставов и некоторых других прихотливых анаэробных микроорганизмов.

7. Оставшиеся после выполнения исследования образцы, даже пустые контейнеры, необходимо сохранять. Ситуации, в которых может возникнуть потребность вернуться к первичному образцу:

- запрос дополнительных исследований клиницистом;
- ошибка при проведении исследования;
- проверка этикетки на образце;
- подготовка второго мазка, если возникает вопрос по интерпретации предыдущего;
- дополнительный анализ внешнего вида образца.

Образцы следует хранить в холодильнике. После посева образец или его часть рекомендуется хранить в течение не менее 48 часов после того, как лаборатория выдаст окончательный ответ [2].

3 Методы посева клинических образцов

3.1 Метод секторных посевов (по Голду)

Метод секторных посевов (по Голду) используется для получения изолированных колоний из нативного образца или инокулята культуры путем снижения плотности посева на одной чашке. Метод применим для посева материала с помощью тампона, петли или пипетки. Использование пипетки рекомендуется при посеве жидкого образца более чем на одну среду [1].

В случае посева жидкого образца с помощью тампона, осторожно встряхните или вращайте пробирку с биоматериалом в течение 5 секунд, чтобы равномерно распределить в среде образец. Затем аккуратно отожмите тампон о стенку пробирки внутри неё.

3.1.1 Методика посева

1. Разделите чашку Петри на четыре сектора;
2. Нанесите клинический образец на поверхность среды. Материал на тампоне вотрите в поверхность, поворачивая его круговыми движениями, на небольшом участке среды (рис.1). При посеве пипеткой нанесите на поверхность среды 1-2 капли жидкого материала;
3. Бактериологической петлей аккуратно распределите образец штрихами по поверхности питательной среды на площади $\frac{1}{4}$ чашки, совершая возвратно-поступательные движения несколько раз, не заходя в область, на которую ранее был нанесен штрих;
4. Прожгите петлю или возьмите новую одноразовую. Поверните чашку на четверть оборота, проведите четыре перпендикулярных штриха из первого сектора во второй сектор, захватывая засеянную область;
5. Снова прожгите или смените петлю и проведите четыре перпендикулярных штриха в третий сектор;
6. Сделайте тоже самое для четвертого сектора. Убедитесь, что сектора 1 и 4 не перекрываются (рис.2);
7. Закройте крышку, инкубируйте чашку при соответствующей температуре в перевернутом положении, чтобы предотвратить образование конденсата [1].

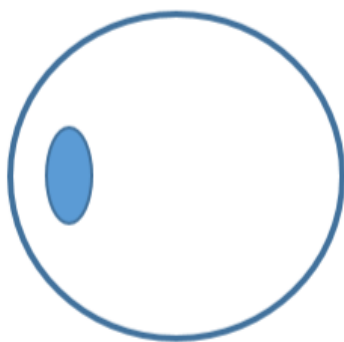


Рис. 1 Нанесение образца с тампона на поверхность питательной среды

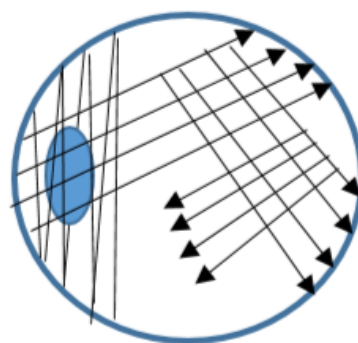


Рис.2 Распределение образца штрихами по поверхности питательной среды

В случае внесения строго определенного объема образца, данный метод можно использовать для количественного определения обсемененности биоматериала. Так, для определения степени бактериурии, посев производят петлей, тарированной на объем

0,0005 мл, затем подсчитывают число выросших колоний в разных секторах и определяют степень обсемененности биоматериала.

3.1.2 Методика посева для количественного определения обсемененности биоматериала

1. Разделите чашку Петри на четыре сектора;
2. Стерильной бактериологической петлей, тарированной на 0,0005 мл, выполните посев 30-40 штрихами в первом секторе (рис. 3);
3. Прожгите петлю или возьмите новую одноразовую. Поверните чашку на четверть оборота, проведите четыре перпендикулярных штриха из первого сектора во второй сектор, захватывая засеянную область;
4. Снова прожгите или смените петлю и проведите четыре перпендикулярных штриха в третий сектор;
5. Сделайте тоже самое для четвертого сектора. Убедитесь, что сектора 1 и 4 не перекрываются (рис. 4);

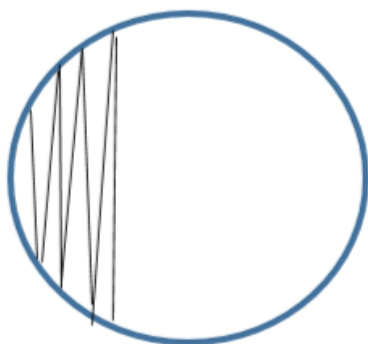


Рис. 3 Выполнение посева тарированной петлей в первом секторе

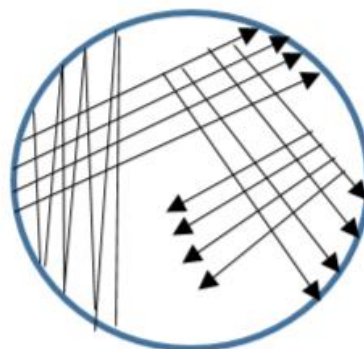


Рис. 4 Проведение четырех перпендикулярных штрихов по секторам

6. Закройте крышку, инкубируйте чашку в перевернутом положении при температуре 35-37°C в условиях обычной атмосферы 18-24 ч;
7. По окончании инкубации произведите подсчет колоний на секторах и определите степень бактериурии согласно табл.1.

Таблица 1

Определение степени бактериурии методом секторных посевов

Количество колоний в секторах				Количество бактерий в 1 мл мочи
А	Б	В	Г	
1-6	-	-	-	Менее 1000
8-20	-	-	-	3000
20-30	-	-	-	5000
30-60	-	-	-	10000
70-80	-	-	-	50000
100-150	5-10	-	-	100000
Нельзя посчитать	20-30	-	-	500000
""	40-60	-	-	1 млн.
""	100-140	10-20	-	5 млн.
""	Нельзя посчитать	30-40	-	10 млн.
""	""	60-80	Единичные колонии	100 млн.

Для получения изолированных колоний из нативного образца или инокулята культуры путем снижения плотности посева на одной чашке могут быть использованы другие методы: метод Линдсея, метод истощающего штриха, метод Дригальского.

3.2 Метод Линдсея

1. Петлей с биоматериалом нанесите 30-40 штрихов на половину среды на чашке (сектор1);
2. Прожгите петлю или возьмите новую одноразовую, проведите ею по радиусу от края чашки к центру через засеянную половину среды, затем сделайте посев на 1/4 среды (сектор 2);
3. Вновь прожгите петлю или возьмите новую одноразовую, проведите ею по радиусу через посев второго сектора, затем сделайте посев на оставшуюся незасеянную часть среды (сектор 3) (Рис. 5).

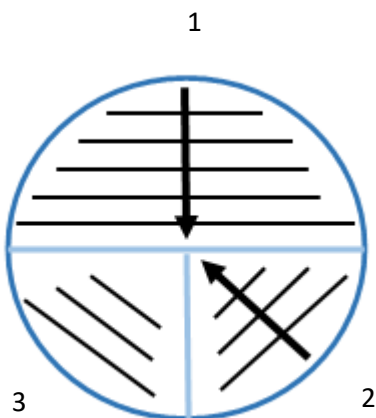


Рис. 5 Посев по методу Линдсея

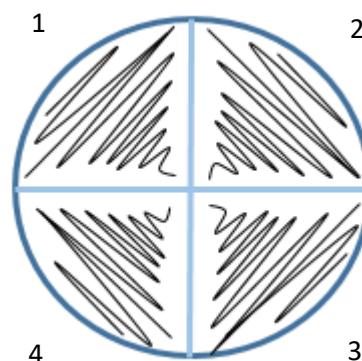


Рис. 6 Посев методом истощающего штриха

3.3 Метод истощающего штриха

1. Бактериологической петлей с биоматериалом сделайте зигзагообразный посев по поверхности агара на площади $\frac{1}{4}$ чашки (сектор 1), от наружной части к центру;
2. Не обжигая петлю, продолжите посев штрихом по чашке в виде секторов (сектора 2,3,4), поворачивая чашку каждый раз на 90° (рис. 6).

3.4 Метод Дригальского

Для данного метода обычно используют три чашки с плотной питательной средой.

1. В первую чашку внесите одну каплю исследуемого материала, стерильным шпателем вотрите его в поверхность питательной среды;
2. Не прожигая шпателя и не набирая нового материала, перенесите шпатель во 2-ю, а затем в 3-ю чашки, втирая в поверхность питательных сред оставшийся на нем материал.

3.5 Несекторный метод посева

При внесении строго определенного объема образца, данный метод можно использовать для количественного определения обсемененности биоматериала, например, степень бактериурии. Также его можно использовать для подсчета колоний, выросших из разведений, полученных при количественном методе разведений (пункт 3.8.1. данного раздела).

Процедуру осуществляют тарированной на определенный объем стерильной бактериологической петлей или полуавтоматическим дозатором со сменным стерильными наконечниками.

1. На чашку Петри с питательной средой нанесите строго определенный объем исследуемого образца;
2. Распределите материал по поверхности питательной среды несколькими вертикальными, а затем перпендикулярными им горизонтальными штрихами, отстоящими друг от друга на небольшое расстояние. В качестве альтернативы для распределения используйте шпатель Дригальского (вручную или в процессе вращения чашки Петри на платформе);
3. Закройте крышку и подождите 10-20 минут, затем инкубируйте чашку в перевернутом положении при температуре 35-37°C в условиях обычной атмосферы 18-24 ч.;
4. По окончании инкубации произведите подсчет колоний в секторах и определите степень бактериурии согласно таблице 2 [3,4].

Для определения титра бактерий в моче при ее посеве несекторным методом в объеме 1, 10 и 100 мкл число колоний умножают на коэффициенты 10^3 , 10^2 и 10, соответственно.

Таблица 2

Определение степени бактериурии несекторным методом

Объем посеянной мочи	Число выросших колоний	Титр бактерий в моче, КОЕ/мл
1 мкл	1	10^3
	10	10^4
	100	10^5
10 мкл	1	10^2
	10	10^3
	100	10^4
100 мкл	1	10^1
	10	10^2
	100	10^3

3.6 Метод посева на селективные среды

В случае необходимости посева образцов на селективные среды, такие как агар МакКонки, желточно-солевой агар, для одного образца может использоваться четверть или половина чашки.

1. Тампоном или петлей сделайте зигзагообразный посев на части поверхности агара (четверть или половину), стараясь избегать краёв чашки (рис. 7,8);

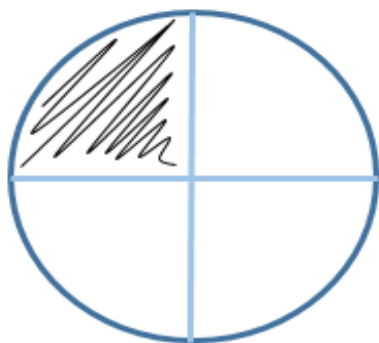


Рис.7 Нанесение образца
на сектор поверхности
агара

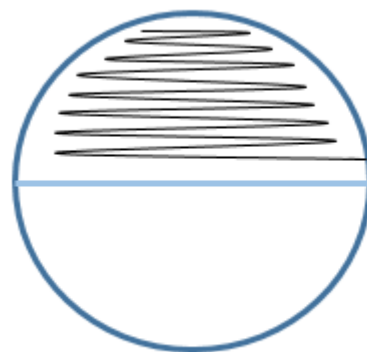


Рис. 8 Нанесение образца
на половину поверхности
агара

2. Закройте крышку, инкубируйте чашку при соответствующей температуре в перевернутом положении, чтобы предотвратить образование конденсата.

3.7. Посев на жидкую питательную среду

Метод используется для посева материала, доставленного в транспортной системе на тампоне или для посева жидкого биоматериала с помощью стерильного тампона.

1. Используя асептическую технику, снимите крышку с пробирки с бульоном, поместите тампон в бульон;
2. Отмывайте несколько секунд тампон в бульоне;
3. При необходимости отломите (или отрежьте, используя асептическую технику) выступающую часть тампона. Закройте пробирку;
4. Засеянные пробирки поместите в термостат с необходимой для культивирования температурой.

3.8 Метод разведений

При необходимости точного количественного посева жидкого биоматериала приготовьте разведение 10^{-1} путем добавления к 1 мл исходного образца 9 мл 0,9% физиологического раствора. При малом количестве посевного материала сделайте перерасчет объема растворителя, соблюдая соотношение 1:9. Для гомогенизации полученной взвеси используйте перемешивающие устройства типа вортекс в обычном режиме 1000 об/мин 30 сек. После гомогенизации из разведения 10^{-1} сделайте серийные разведения до необходимых концентраций.

Существует несколько способов разведений. Из них чаще используют метод последовательных разведений и метод микроразведений.

3.8.1 Метод последовательных разведений

1. Приготовьте ряд из необходимого количества пробирок с 9 мл стерильного 0,9% физиологического раствора. Подпишите степени разведения на пробирках: 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} т.д;
2. Стерильной пипеткой или стерильным одноразовым наконечником дозатора 1 мл суспензии с биологическим материалом из разведения 10^{-1} перенесите в 9 мл 0,9% физиологического раствора. В результате получите разведение 10^{-2} . Утилизируйте пипетку (наконечник);
3. Стерильной пипеткой или стерильным одноразовым наконечником дозатора 1 мл суспензии с биологическим материалом из разведения 10^{-2} перенесите в 9 мл 0,9% физиологического раствора. Получите разведение 10^{-3} . Утилизируют пипетку (наконечник);
4. Стерильной пипеткой или стерильным одноразовым наконечником дозатора 1 мл суспензии с биологическим материалом из разведения 10^{-3} перенесите в 9 мл 0,9% физиологического раствора. Получите разведение 10^{-4} . Утилизируйте пипетку (наконечник);
5. Стерильной пипеткой или стерильным одноразовым наконечником дозатора 1 мл суспензии с биологическим материалом из разведения 10^{-4} перенесите в 9 мл 0,9% физиологического раствора. Получите разведение 10^{-5} . Утилизируйте пипетку (наконечник);

Повторите процедуру до получения наибольшего необходимого разведения.

3.8.2 Метод микроразведений

1. Приготовьте ряд из 2-х пробирок с 9,9 мл стерильного физиологического раствора; Подпишите степени разведения на пробирках: 10^{-3} и 10^{-5} ;
2. Стерильной пипеткой или стерильным одноразовым наконечником дозатора 0,1 мл суспензии с биологическим материалом из разведения 10^{-1} перенесите в 9,9 мл физиологического раствора. Получите разведение 10^{-3} . Утилизируйте пипетку (наконечник);
3. Стерильной пипеткой или стерильным одноразовым наконечником дозатора 0,1 мл суспензии с биологическим материалом из разведения 10^{-3} перенесите в 9,9 мл физиологического раствора. Получите разведение 10^{-5} . Утилизируйте пипетку (наконечник) [5];

4. Из полученных разведений сделайте высевы на плотные питательные среды с помощью дозатора со сменными стерильными наконечниками (пункт 3.1.2. данного раздела). Высев осуществляйте в обратной последовательности от большего разведения к меньшему.

Выполненные посевы поместите в термостат с необходимой для культивирования температурой.

4. Список литературы

1. UK Standards for Microbiology Investigations. Investigation of samples from paranasal sinuses. Issued by the Standards Unit Microbiology Services, PHE Bacteriology |B 05 | Issue number: 8 | Issue date: 16.09.24 |
2. Clinical microbiology procedures handbook / editor in chief, Amy L. Leber, 2016
3. Р.С. Козлов, В.В. Меньшиков, В.С. Михайлова , Б.Ф. Шуляк , Т.И. Долгих , А.Н. Круглов , Е.В. Алиева , В.Е. Маликова. Клинические рекомендации Бактериологический анализ мочи, 2014
4. Клиническая лабораторная аналитика в пяти томах, ред. В.В. Меньшикова. Том IV Частные аналитические технологии в клинической лаборатории, 2003
5. С.В. Поликарпова, С.В. Жилина, О.В. Кондратенко, А.В. Лямин, Ю.В. Борзова, А.В. Жестков. Руководство по микробиологической диагностике инфекций дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом, 2019
6. А.С. Лабинская. Микробиология с техникой микробиологических исследований, 1978