

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель Министра здравоохранения
– Главный государственный санитарный
врач Республики Беларусь



И.В. Гаевский

2015 г.

Регистрационный номер № 005-0515

**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ
ЗНАЧИМОСТИ ПАТОГЕННЫХ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ**
Инструкция по применению

Учреждения-разработчики: Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены», государственное учреждение образования «Белорусская медицинская академия последипломного образования», государственное учреждение «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии»

Авторы: Нежвинская О.Е., к.м.н., доцент Тонко О.В., к.б.н., доцент Дудчик Н.В., д.м.н., профессор Коломиец Н.Д., к.м.н., доцент Федоренко Е.В., Янецкая С.А., Ханенко О.Н., Левшина Н.Н.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель министра –
Главный государственный
санитарный врач
Республики Беларусь

_____ И.В. Гаевский
18.06.2015
Регистрационный № 005-0515

**МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ
ПАТОГЕННЫХ И УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: РУП «Научно-практический центр гигиены», ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», ГУ «Минский городской центр гигиены и эпидемиологии»

АВТОРЫ: О.Е. Нежвинская, канд. мед. наук, доц. О.В. Тонко, канд. биол. наук, доц. Н.В. Дудчик, д-р мед. наук, проф. Н.Д. Коломиец, канд. мед. наук, доц. Е.В. Федоренко, С.А. Янецкая, О.Н. Ханенко, Н.Н. Левшина

Минск 2015

ГЛАВА 1 НАЗНАЧЕНИЕ И ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

1. В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены методы для использования в комплексе медицинских услуг по медицинской профилактике острых кишечных инфекций (ОКИ), связанных с пищевым путем передачи, включающие оценку эпидемиологической значимости патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, в т. ч. методы количественного определения резистентности микроорганизмов к антимикробным веществам, методы количественного определения способности к пленкообразованию изолятов микроорганизмов, методы выявления способности к персистенции изолятов микроорганизмов, методы определения лецитовителлазной и гемолитической активности микроорганизмов, методы определения антагонистической активности микроорганизмов, метод модификации факторов патогенности.

2. Настоящая инструкция по применению предназначена для органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных организаций, проводящих бактериологические исследования с целью оценки эпидемиологической значимости штаммов условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, выделенных из пищевых продуктов, объектов окружающей среды и клинического материала.

ГЛАВА 2 ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ОЦЕНКИ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

1. Большая гетерогенность популяции условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, встречающихся при исследовании пищевых продуктов, объектов окружающей среды, клинического материала, увеличение медицинской значимости штаммов условно-патогенных бактерий, свидетельствует о целесообразности исследования патогенного потенциала и эпидемиологической значимости выделенных штаммов. Известно, что при возникновении вспышки кишечной инфекции выделение штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов не всегда может являться безусловным доказательством их этиологической роли. Верификация этиологии диарейных заболеваний должна базироваться на комплексе достоверных критериев. Установлено, что наличие у микроорганизмов факторов патогенности является более существенным диагностическим критерием, чем интенсивность обсеменения исследуемого материала. Высокий уровень инфекционных заболеваний с алиментарным путем передачи определяет необходимость изучения биологических свойств условно-патогенных и патогенных микроорганизмов с позиций оценки их потенциальной эпидемической опасности. В данной инструкции по применению приведены следующие методы оценки факторов агрессии патогенных и условно-патогенных микроорганизмов:

1.1. Методы количественного определения резистентности микроорганизмов к антимикробным веществам

Одним из важнейших аспектов фенотипической характеристики условно-патогенных и патогенных микроорганизмов является их резистентность к антимикробным веществам. При этом массовое распространение антибиотикорезистентных штаммов в популяциях условно-патогенных микроорганизмов стало важной проблемой клинической медицины в связи с их более высокими адаптационными возможностями по сравнению с возбудителями классических инфекций. В данной инструкции резистентность к антимикробным веществам определяется на основании подавления роста микроорганизмов под действием различных концентраций антибиотиков, при этом есть возможность выявить устойчивость к новым видам антибактериальных веществ в различных концентрациях. Определяются минимальные ингибирующие концентрации (МИК) антибиотиков. Чувствительность к антибактериальным веществам устанавливается с использованием микробиологических экспресс-анализаторов, регистрирующих изменения электрического сопротивления (импеданса) питательной среды, происходящие под влиянием процессов роста и жизнедеятельности микроорганизмов в исследуемой пробе, а также автоматического микробиологического анализатора. Штаммы, резистентные к 3 и более группам антимикробных веществ, относятся к полирезистентным.

1.2. Методы количественного определения способности к пленкообразованию изолятов микроорганизмов

Способность бактерий формировать биопленки рассматривается как фактор их патогенности. Бактерии, живущие внутри биопленок, проявляют значительно более высокую устойчивость — до 1000 раз — к антибиотикам и другим лекарственным средствам, что крайне затрудняет борьбу с инфекциями, вызванными такого рода агентами. Образование биопленок бактериями способствует инфицированию большинства органов (верхних дыхательных путей, легких, сердца, почек, кожи, костей, системы пищеварения) и практически всех искусственных имплантатов. Среди всех инфекционных поражений около 65–80% вызываются бактериями, формирующими биопленки. Изучение экологических закономерностей возникновения и развития микробных сообществ (биопленок) является ключевым моментом дальнейшего развития микробиологии. Определение способности к образованию биопленок проводится на основании выявления и количественной оценки сформированного вокруг микробных клеток межклеточного экзополисахаридного матрикса биопленки.

1.3. Методы выявления способности к персистенции изолятов микроорганизмов

Выживанию и накоплению микроорганизмов в объектах внешней среды, а также существованию в условиях макроорганизма способствуют факторы персистенции. Для выявления способности к персистенции изолятов микроорганизмов определяют наличие и степень проявления антилизоцимной активности (способность инактивировать лизоцим клеток и тканей) и

антиинтерфероновой активности (способность подавлять антибактериальное действие интерферона) изолятов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных при исследовании пищевых продуктов, объектов окружающей среды и клинического материала. Экспериментально доказано, что вышеперечисленные виды активности являются факторами, способствующими персистенции бактерий. Также предложен метод выявления в образцах пищевых продуктов и сырья, смывов с технологического оборудования и рук персонала, пробах воды и образцах клинического материала бактерий родов *Staphylococcus* и *Escherichia* с персистентными свойствами.

1.4. Методы определения лецитовителлазной и гемолитической активности микроорганизмов

Лецитиназа, являющаяся экзоферментом бактерий, действует на фосфолипиды мембран мышечных волокон, эритроцитов и других клеток, нарушает гомеостаз клеток и тканей, приводя к их повреждению, определяет инвазивность микроорганизмов. Гемолизины — ряд ферментов, способных вызывать гемолиз эритроцитов.

Выявление у микроорганизмов лецитовителлазной (лецитиназной) и гемолитической активности прямым методом посева в дифференциально-диагностические среды свидетельствует о высокой степени вероятности участия данных бактерий в развитии инфекционного процесса.

1.5. Методы определения антагонистической активности микроорганизмов

Наличие у патогенных и условно-патогенных бактерий антагонистической активности значительно повышает колонизационный потенциал штамма. При определении антагонистической активности микроорганизмов проводится оценка типа межмикробных взаимодействий путем сокультивирования исследуемых штаммов.

1.6. Метод модификации факторов патогенности

Проводится предварительный посев чистых культур микроорганизмов на чашки с питательным агаром (два штамма на 1 чашку в соответствии с описанной далее методикой) для оценки модификации факторов агрессии патогенных биологических агентов (ПБА) бактериальной этиологии, входящих в состав микст-культур. Согласно данным исследований установлено, что взаимодействия представителей нормофлоры носят в основном индифферентный характер по проявлению факторов агрессии. Изменение выраженности факторов патогенности (ослабление или усиление) у индигенной микрофлоры (микроорганизмов, постоянно обитающих в данном биотопе) под влиянием исследуемого штамма условно-патогенных бактерий способствует поддержанию дисбиоза, что повышает возможность участия микроорганизма в развитии инфекционного процесса.

2. После определения наличия и степени выраженности факторов агрессии в рекомендуемых объемах (приложение 1) проводится оценка эпидемиологической значимости штамма. Количество и частота встречаемости условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, выделенных при

исследовании пищевых продуктов, объектов окружающей среды и клинического материала, таксономическая характеристика выделенных штаммов, антибиотикорезистентность, способность к образованию биопленок, персистентный потенциал, наличие лецитовителлазной, гемолитической активности, способность к антагонизму и модификации факторов агрессии бактериальных штаммов являются индикаторами степени потенциальной опасности микроорганизмов, а также могут служить эпидемиологическими маркерами бактерий. На основании анализа полученных данных оформляется «Карта эпидемиологической значимости штамма» (приложение 2).

ГЛАВА 3 ОБОРУДОВАНИЕ, ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА И МАТЕРИАЛЫ, РЕАКТИВЫ, ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

1. Для оценки факторов агрессии патогенных и условно-патогенных микроорганизмов используется нижеперечисленное оборудование, лабораторная посуда и материалы, растворы, реактивы и питательные среды:

Оборудование:

- анализатор автоматический микробиологический;
- анализатор потенциометрический, погрешность измерений $pH \pm 0,1$ (рН-метр) по ГОСТ 19881-74;
- баня водяная с терморегулятором, позволяющая поддерживать температуру $45 \pm 5^\circ C$ по ГОСТ 12026-76;
- весы лабораторные по ГОСТ 24104-2001;
- вортекс для встряхивания жидкости в пробирках;
- денситометр (прибор для измерения мутности);
- диспенсер суспензионного раствора;
- дистиллятор электрический;
- дозаторы пипеточные объемом 2–20; 20–200; 100–1000 мкл;
- дозатор пипеточный фиксированного объема 145 мкл;
- дозатор пипеточный фиксированного объема 280 мкл;
- микроскоп световой биологический с увеличением 90–1000^x с приспособлением для фазово-контрастной микроскопии;
- морозильная камера;
- прибор для мембранной фильтрации под вакуумом с диаметром фильтрующей поверхности 35 или 47 мм и устройство для создания разрежения 0,5–1,0 атм;
- спектрофотометр многоканальный со светофильтрами 540 нм или иммуноферментный анализатор;
- стерилизатор паровой с рабочим давлением пара не более 0,22 МПа (2,2 кгс/см²);
- стерилизатор суховоздушный для температурного режима $180 \pm 5^\circ C$;
- термометр ртутный с диапазоном измерения от 0 до $100^\circ C$ с ценой деления шкалы $1^\circ C$ по ГОСТ 24498-90;
- термостат электрический суховоздушный;

- холодильник бытовой по ГОСТ 16317-87;
- шкаф ламинарный (бокс биологической защиты);
- экспресс-анализатор с импедиметрической детекцией;
- электроплитка бытовая по ГОСТ 14919-83.

Лабораторная посуда и материалы:

- бумага фильтровальная лабораторная по ГОСТ 12026-76;
 - бусы стеклянные;
 - карты для определения чувствительности к антибиотикам;
 - колбы плоскодонные конические или круглые различной вместимости по ГОСТ 25336-82;
 - линейка;
 - маркеры водостойкие;
 - мембранные фильтры для микробиологических целей с диаметром пор не более 0,45 мкм и размером диска 35 или 47 мм или другие фильтрующие мембраны с аналогичной способностью фильтрации;
 - многоразовые измерительные ячейки для микробиологического анализатора с импедиметрической детекцией (стеклянные) на 10 мл с 4 электродами с пластиковыми крышками;
 - наконечники к дозаторам по ГОСТ 21241-89;
 - петли бактериологические с диаметром 2 мм;
 - пинцеты для работы с мембранными фильтрами;
 - пипетки стерильные стеклянные или пластиковые объемом 1; 5; 10 мл;
 - планшеты полистироловые плоскодонные 96-луночные;
 - пластиковые пробирки для анализатора;
 - пробирки бактериологические типов П1 и П2 по ГОСТ 25336-82;
 - пробки различных размеров: силиконовые, резиновые и др., выдерживающие высокую температуру, стерилизацию;
 - спиртовки лабораторные стеклянные по ГОСТ 23932-90Е;
 - стандарты мутности по Мак-Фарланду (McF);
 - стекла предметные по ГОСТ 9284;
 - стекла покровные;
 - тампоны стерильные ватные;
 - фильтры бумажные или ватно-марлевые;
 - флаконы стеклянные;
 - чашки биологические (Петри) диаметром 90 мм по ГОСТ 23932-90Е;
 - штативы для пробирок;
- Растворы, реактивы, компоненты сред:
- агар микробиологический по ФС 42-188ВС-90;
 - вода дистиллированная по ГОСТ 7609 – 72;
 - вода мясная;
 - гидролизат казеина;
 - гидрофосфат натрия;
 - глюкоза безводная по ГОСТ 6038-79;
 - динатрийгидрофосфат;
 - дрожжевой экстракт;

- желчь очищенная сухая;
 - калия гидрофосфат;
 - карбенициллин;
 - карбонат натрия;
 - кристаллический фиолетовый;
 - кровь стерильная дефибринированная или цитратная животного (барана, кролика, крупного рогатого скота) или человека;
 - лактоза;
 - лизоцим яичный;
 - маннит;
 - мясной экстракт;
 - набор реактивов для окраски по Граму;
 - натрия хлорид х/ч;
 - суспендиальный раствор (0,45% раствор хлорида натрия);
 - панкреатический гидролизат рыбной муки;
 - папаиновый перевар соевой муки;
 - пептон сухой микробиологический;
 - препарат человеческого лейкоцитарного интерферона;
 - раствор кристаллического фиолетового 0,1%;
 - растворители и разбавители, используемые для приготовления рабочих растворов различных антибактериальных веществ;
 - спирт этиловый 96%;
 - субстанции антибактериальных веществ с известной активностью;
 - сульфит натрия;
 - уголь активированный;
 - феноловый красный;
 - физиологический раствор;
 - фосфатный буферный раствор $pH = 7,2 \pm 1$;
 - фузидин;
 - фуксин основной;
 - хлористый натрий х/ч;
 - хлороформ технический по ГОСТ 20015;
 - экстракт дрожжей пекарных;
 - яйца куриные или желточная эмульсия;
- Питательные среды:
- желточно-солевой агар;
 - желточный агар;
 - кровяной агар;
 - кесслера среда;
 - недифференцированный питательный агар (мясопептонный агар или другая плотная питательная среда с аналогичными ростовыми свойствами);
 - питательная среда ViMedia 001B;
 - солевой бульон с маннитом;
 - триптон-соевый бульон с глюкозой;
 - Среда Эндо.

Допускается применение оборудования и материалов с аналогичными по назначению техническими и метрологическими характеристиками, а также других коммерческих питательных сред и диагностических препаратов аналогичного назначения для проведения исследований в соответствии с данным документом. При их применении следует руководствоваться рекомендациями изготовителя. Питательные среды и биологические препараты импортного производства должны иметь международный сертификат качества ИСО 9000 или EN 29000, питательные среды и препараты отечественного производства должны вырабатываться по нормативной документации, утвержденной в установленном порядке.

ГЛАВА 4 ПОДГОТОВКА К ПРОВЕДЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Подготовка штаммов микроорганизмов

1.1. Оценка факторов агрессии патогенных и условно-патогенных микроорганизмов проводится с чистой культурой. С использованием стандартных микробиологических методов определяется грампринадлежность изолятов и идентификация выделенных микроорганизмов до вида. Затем чистая культура микроорганизма пересеивается петлей или стерильным тампоном на чашки Петри с недифференцированным питательным агаром. Чашки инкубируются в течение 18–24 ч при температуре, оптимальной для роста данного вида микроорганизмов (при идентификации микроорганизмов с использованием автоматического микробиологического анализатора возможна параллельная идентификация выделенного организма до вида и определение антибиотикорезистентности).

1.2. Для приготовления суспензии микроорганизмов необходимо отобрать несколько однотипных, четко изолированных колоний суточных культур микроорганизмов. Стандартной микробиологической петлей переносится незначительное количество материала с вершечек колоний в пробирку со стерильным физиологическим раствором или суспендиальным раствором и гомогенизируется там до достижения требуемой плотности бактериальной суспензии.

Суспензию следует использовать в течение 15 мин после приготовления.

1.3. При анализе антилизоцимной и антиинтерфероновой активности в качестве тест-штаммов используются музейные культуры *Micrococcus luteus* (для определения антилизоцимной активности) и *Corynebacterium xerosis* (для определения антиинтерфероновой активности), обладающие типичными морфологическими и биохимическими свойствами. Аналогично способу подготовки изолятов бактерий готовится суточная культура тест-штамма, а затем суспензия микроорганизма в физиологическом растворе с концентрацией 10^9 клеток/мл. Хранение музейных штаммов, а также проверка их биохимических и морфологических свойств проводится согласно действующей нормативной документации.

2. Подготовка растворов и питательных сред

2.1. Микробиологические исследования проводят с использованием стерильных растворов, сред, посуды, инструментов. Подготовку и стерилизацию посуды для микробиологического анализа производят согласно требованиям СТБ ISO 7218-2010 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования к выполнению микробиологических исследований».

2.2. При выполнении микробиологического анализа предпочтительно использовать стандартизированные сухие питательные среды промышленного производства (их готовят в соответствии с указаниями изготовителя) либо готовые питательные среды. Последние хранятся в холодильнике и перед посевом должны быть прогреты до комнатной температуры. Не допускается использовать питательные среды ненадлежащего качества или с истекшим сроком годности. Необходимо проверять стерильность и ростовые свойства каждой полученной или приготовленной партии среды до использования их в рутинных анализах.

2.3. *Физиологический раствор.* Растворить в 100 см³ дистиллированной воды 0,85 г хлористого натрия, разлить по флаконам или пробиркам, стерилизовать при температуре 121±1°C в течение 20 мин.

2.4. *Мясопептонный бульон (агар).* Растворить в 1 дм³ мясной воды 10,0 г пептона, 5 г хлористого натрия, профильтровать через бумажный фильтр. Установить pH = 7,0–7,2, разлить в пробирки или флаконы, стерилизовать при температуре 121±1°C в течение 20 мин.

Для приготовления агара перед стерилизацией в мясопептонный бульон добавить 15–20 г агара и кипятить на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения агара.

Для приготовления полужидкого мясопептонного агара (0,7% агар) добавить 7 г агара и кипятить на слабом огне при постоянном помешивании до полного растворения агара.

2.5. Приготовление растворов и питательных сред для количественного определения резистентности микроорганизмов к антимикробным веществам, для количественного определения способности к пленкообразованию изолятов микроорганизмов

2.5.1. *Триптон-соевый бульон с глюкозой.* Размешать в 1 дм³ дистиллированной воды 17,0 г гидролизата казеина, 3,0 г папаинового перевара соевой муки, 5,0 г хлорида натрия, 2,5 г гидрофосфата калия, 2,5 г глюкозы. Прокипятить до полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием при 1,1 атм и температуре 121±1°C в течение 15 мин.

2.5.2. *Фосфатный буферный раствор pH = 7,2–7,4:*

- раствор А. В 1 дм³ дистиллированной воды растворить 1,78 г динатрийгидрофосфата (Na₂HPO₄);

- раствор Б. В 1 дм³ дистиллированной воды растворить 1,36 г гидрофосфата калия (KH₂PO₄).

К 850 см³ раствора А добавить 250 см³ раствора Б. В 1 дм³ полученной смеси растворить 8,5 г хлористого натрия. Полученный раствор стерилизовать автоклавированием при температуре 121±1°С в течение 20 мин.

2.6. Приготовление питательных сред для выявления способности к персистенции изолятов микроорганизмов

2.6.1. *Солевой бульон с маннитом.* Растворить в 1 дм³ дистиллированной воды 10,0 г пептона, 1,0 г мясного экстракта, 75,0 г хлорида натрия, 10,0 г D-маннита, 0,025 г фенолового красного. Прокипятить до полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием при температуре 121±1°С в течение 15 мин.

2.6.2. *Среда Кесслера.* Размешать в 1 дм³ дистиллированной воды 7,0 г пептона, 3,0 г панкреатического гидролизата рыбной муки, 10,0 г лактозы, 3,0 г желчи очищенной сухой, 0,04 г кристаллического фиолетового, 0,02±0,01 г карбоната натрия. Нагреть до кипения и кипятить 2–3 мин. Горячую среду профильтровать через ватно-марлевый или бумажный фильтр и разлить в стеклянные пробирки или флаконы. Стерилизовать автоклавированием 2.6.3.

Желточно-солевой агар с фузидином. К 850 мл расплавленного питательного агара добавить 85 мл NaCl, затем среду стерилизовать при температуре 121±1°С в течение 20 мин, остудить до 45±5°С и добавить 150 г желточной взвеси (желток асептически извлечь из яйца, взболтать с 200 мл физиологического раствора). Перед заливкой чашек Петри во флаконы внести 0,0002 г/л антибиотика фузидина. Все тщательно перемешать, готовую среду разлить в стерильные чашки, подсушить в термостате при 37±1°С или ламинарном боксе в течение 10 мин. Чашки со средой хранить не более 5 сут при температуре +4±2°С.

2.6.4. *Среда Эндо с карбенициллином.* Размешать в 1 дм³ дистиллированной воды 12,0 г панкреатического гидролизата рыбной муки, 1,0 г экстракта пекарных дрожжей, 10,0 г лактозы, 3,4 г хлорида натрия, 0,8 г сульфита натрия, 0,5 г гидрофосфата натрия, 0,2 г фуксина основного, 15,0 г агара, нагреть до кипения и кипятить 3 мин до полного расплавления агара. Горячую среду профильтровать через ватно-марлевый фильтр и снова довести до кипения; рН готовой среды — 7,4±0,2. В готовую среду, охлажденную до температуры 45±5°С, добавить 1,0 г карбенициллина, растворенного в 10 мл физиологического раствора, на 1,0 дм³ среды Эндо (конечная концентрация антибиотика в агаре — 0,001 г/мл). Чашки со средой хранить не более 5 сут при температуре 4±2°С.

2.7. Приготовление питательных сред для определения лецитовителлазной активности микроорганизмов

2.7.1. *Желточный агар.* Расплавить и охладить до температуры 45±5°С 1 дм³ мясопептонного агара и добавить 100 см³ яично-желточной взвеси. Смесь тщательно перемешать и разлить в стерильные чашки Петри. Чашки хранить в холодильнике при температуре 4±2°С не более 5 сут.

При исследовании свойств бактерий рода *Listeria* перед стерилизацией

МПА в среду добавить 0,5% активированного угля, измельченного до порошкообразного состояния.

2.7.2. *Яично-желточная взвесь (примерно 20% концентрации)*. Свежие куриные яйца с неповрежденной скорлупой помыть щеткой с применением жидких моющих средств, ополоснуть проточной водой, дезинфицировать погружением на 30 с в 70% (объем/объем) этиловый спирт с последующим просушиванием на воздухе или после того как раствор спирта стечет, яйца фламбировать в пламени горелки. С соблюдением правил асептики разбить скорлупу яйца и отделить желток от белка, поочередно перенося желток из одной половинки скорлупы в другую. Желтки поместить в стерильную колбу и добавить 4-кратное количество (по объему) стерильной воды. Смесь тщательно перемешать, выдержать на водяной бане при температуре $45\pm 5^\circ\text{C}$ в течение 2 ч, а затем оставить на 18–24 ч при температуре $4\pm 2^\circ\text{C}$ для образования осадка. Для использования собрать в асептических условиях в стерильную колбу надосадочную жидкость. Приготовленную эмульсию можно хранить при температуре $4\pm 2^\circ\text{C}$ не более 72 ч. Допускается использовать готовую эмульсию промышленного производства, в этом случае эмульсию применять в соответствии с инструкцией изготовителя.

2.8. Приготовление питательных сред для определения гемолитической активности микроорганизмов

2.8.1. *Кровяной агар*. К 100 см^3 МПА, расплавленного и охлажденного до $45\pm 5^\circ\text{C}$, прибавить 10 см^3 раствора глюкозы концентрации 200 г/дм^3 и $5\text{--}10\text{ см}^3$ стерильной дефибринированной или цитратной крови животного (барана, кролика, крупного рогатого скота) или человека. Агар с кровью тщательно перемешать, избегая образования пены и разлить в стерильные чашки Петри. Чашки хранить в холодильнике при температуре $4\pm 2^\circ\text{C}$ не более 5 сут.

2.8.2. *Дефибринированная кровь*. Необходимо кровь животных или человека собрать в стерильную посуду со стеклянными бусами и дефибринировать путем встряхивания в течение 10–15 мин. В результате встряхивания находящийся в крови фибрин выпадает в осадок, обволакивая бусы, а дефибринированная кровь, слитая в другую колбу, утрачивает способность свертываться.

3. Подготовка антибактериальных веществ (АБВ)

3.1. Крайне важным этапом является приготовление растворов АБВ. Различают «основные» растворы АБВ (пригодные для хранения) и «рабочие» (которые необходимо использовать «ex tempore» для приготовления питательных сред).

3.2. Для приготовления основных растворов АБВ необходимо использовать субстанции АБВ с известной активностью. Для взвешивания субстанций необходимо использовать электронные лабораторные весы с точностью до 4 знака, для измерения объемов — калиброванные дозаторы и пипетки.

3.3. Основные растворы АБВ готовят в концентрации 1000,0 мкг/мл и выше. Навески АБВ для приготовления базовых растворов готовят с учетом их активности. Расчет навески АБВ для приготовления базового раствора

проводят по формуле (1):

$$m_{\text{АБВ}}^{\text{теор}}(\text{мг}) = \frac{C(\text{мкг/мл}) \times V_{\text{теор}}(\text{мл})}{A(\text{содержание АБВ в мкг/мл})}, \quad (1)$$

где $m_{\text{АБВ}}^{\text{теор}}$ — расчетная (теоретическая) навеска АБВ;

C — необходимая концентрация АБВ;

$V_{\text{теор}}$ — объем растворителя для растворения теоретической навески;

A — активность АБВ (количество активного вещества, содержащегося в субстанции).

3.4. Взвесить точно расчетное количество порошка практически невозможно. Поэтому готовят близкую к расчетной навеску, а затем пересчитывают количество необходимого растворителя:

$$V_{\text{практ}}(\text{мл}) = \frac{m_{\text{АБВ}}^{\text{практ}}(\text{мг}) \times V_{\text{практ}}(\text{мл})}{m_{\text{АБВ}}^{\text{теор}}(\text{мг})}, \quad (2)$$

где $V_{\text{практ}}$ — объем растворителя для растворения практической навески;

$m_{\text{АБВ}}^{\text{практ}}$ — полученная навеска АБВ;

$m_{\text{АБВ}}^{\text{теор}}$ — расчетная (теоретическая) навеска АБВ;

$V_{\text{теор}}$ — объем растворителя для растворения теоретической навески.

3.5. В связи с тем, что АБВ существенно различаются по растворимости, в ряде случаев возникает необходимость использовать различные вещества для первичного растворения (солюбилизации) антибиотиков (растворители) и для доведения их до заданной концентрации (разбавители). В тех случаях, когда растворители и разбавители являются разными веществами, для растворения АБВ необходимо использовать минимально возможное количество растворителя.

3.6. Основные растворы необходимо хранить при температуре не выше минус 18°C (сроки хранения отдельных АБВ при этой температуре существенно различаются). Оптимальными условиями для хранения основных растворов АБВ является температура -60°C и ниже, длительность не более 6 мес. При этом необходимо иметь в виду, что основные растворы β-лактамов АБВ могут терять активность и в более ранние сроки.

3.7. После извлечения из холодильника перед открыванием флаконов с основными растворами их необходимо довести до комнатной температуры для предотвращения конденсации влаги. Размороженные основные растворы должны быть использованы для приготовления рабочих растворов, повторное замораживание не допускается. Для приготовления рабочих растворов используется дистиллированная вода.

3.8. Из рабочих растворов готовят двукратные разведения АБВ. При расчетах за основу берется конечная концентрация АБВ в питательной среде, равная 1,0 мкг/мл (более высокие — 2; 4; 8 и т. д.; более низкие — 0,5; 0,25;

0,125 и т. д.). При этом реальные концентрации растворов должны учитывать фактор разбавления раствора АБВ при инокуляции. Диапазон двукратных серийных разведений АБВ зависит от вида тестируемого микроорганизма, предполагаемой активности АБВ и целей исследования.

4. Подготовка анализатора

4.1. Установка параметров измерения при работе на микробиологическом анализаторе с импедиметрической детекцией роста микроорганизмов:

4.1.1. Установить температуру измерения на инкубаторном блоке прибора.

4.1.2. В основном меню программы выбрать подменю «Параметры блока» и установить следующие параметры:

- время исследования — 1 ч;
- интервал — 10 мин;
- масштаб измерений (М-параметр — 5–30%, Е-параметр — 5–50%).

4.1.3. В основном меню программы выбрать подменю «Параметры ячейки» и ввести следующие параметры:

- установить параметры для учета результатов — «Порог М» и «Порог Е», ввести пороговые значения для М-параметра (4%) и Е-параметра (10%);
- ввести пороговые значения по времени «Интервал 1» — 1 ч.

Сохранить введенные параметры измерения. Созданный список исследований использовать в дальнейшем для задания параметров измерений.

4.1.4. Выбрать в основном меню программы подменю «Начать измерение».

4.1.5. После того как каждая позиция блока будет отмаркирована как свободная на экране монитора, установить для каждой позиции параметры измерения и поместить измерительные ячейки в инкубаторный блок.

Измерение начнется автоматически через 1 ч после загрузки ячеек в прибор.

4.1.6. При пересечении заданных пороговых значений для М-параметра или Е-параметра проба оценивается по светофорной системе — красному, желтому, зеленому цветам (если были заданы временные интервалы).

4.1.7. Подробное описание программы и порядок действий при работе на приборе представлены в инструкции для пользователя.

4.2. Подготовка автоматического микробиологического анализатора

4.2.1. Перед началом работы необходимо, следуя инструкциям программного обеспечения, ввести информацию об используемых картах, а также произвести ряд общих настроек: настроить печать (автоматическая или по требованию) и прочие параметры, следуя инструкции пользователя по программному обеспечению.

4.2.2. Приготовленная суспензия вносится в пластиковую пробирку с суспендиальным раствором при помощи автоматических пипеток с фиксированным объемом. Для определения резистентности грамположительных бактерий в пробирку помещают 280 мкл бактериальной суспензии; грамотрицательных бактерий — 145 мкл.

4.2.3. Выбор карты для исследования производится на основании окраски

по Граму, позволяющей разделить бактерии на грамположительные и грамотрицательные. Пробирки с суспензиями устанавливаются в кассету, напротив них в специальные прорези (слоты) помещаются соответствующие карты, так, чтобы относящаяся к карте пластиковая трубочка была погружена в пробирку.

ГЛАВА 5 ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Выявление и количественная оценка резистентности микроорганизмов к антибактериальным веществам с использованием автоматического микробиологического анализатора

1.1. Работа в режиме виртуальной кассеты:

1.1.1. Виртуальная кассета создается согласно инструкции по программному обеспечению. В соответствующие ячейки образовавшейся таблицы вводится номер штрих-кода (путем считывания штрих-кода ридером либо вручную), рядом с которым проставляются лабораторные номера или другие идентификационные имена для выделенных микроорганизмов. Необходимо указывать вид выделенного штамма (кроме случаев одновременной идентификации микроорганизма и определения его антибиотикорезистентности с использованием автоматического микробиологического анализатора). Затем созданную «виртуальную кассету» необходимо сохранить в памяти компьютера. (Время от момента сохранения «виртуальной кассеты» до момента загрузки собственно кассеты с картами в прибор не должно превышать 30 мин.)

1.1.2. Далее следует приступить к загрузке кассеты с картами в вакуумную камеру анализатора. Перед тем как загружать кассету в камеру, следует убедиться (это отображено на маленьком собственном мониторе анализатора), что статус прибора «ok», вакуумная камера готова к работе и в карусели имеется достаточное количество свободных мест. В том случае, если все эти условия соблюдены, можно открыть дверцу вакуумной камеры, поместить туда кассету с картами, плотно закрыть дверцу и нажать на клавишу «Начать заполнение».

1.1.3. В процессе заполнения карт суспензией в вакуумной камере не рекомендуется отходить от анализатора; дождавшись (ожидание занимает 70 с) сигнала и мигания стрелки индикатора, следует открыть камеру. При этом разблокируется дверца загрузочного модуля, которую следует открыть и переставить кассету с заполненными картами из одной камеры в другую. Затем дверцы анализатора следует закрыть в произвольной последовательности. Если кассета не будет перенесена из вакуумной камеры в загрузочный модуль в течение 10 мин, прибор не примет ее для дальнейшего исследования.

1.1.4. После помещения кассеты в загрузочный модуль рекомендуется дождаться окончания процесса считывания штрих-кодов (занимает примерно 1 мин), не отходя от анализатора. Мелодичный сигнал говорит о нормально

прошедшем процессе считывания. Грубый звук сигнализирует об имеющихся ошибках. В последнем случае следует установить причину ошибок, вызвав их описание на дисплее анализатора. После нормально прошедшей загрузки индикатор загрузочного модуля будет показывать мигающую синюю стрелку. Кассету с оставшимися пробирками из этой камеры прибора можно извлечь сразу или в другое время (например, при загрузке следующей кассеты).

1.2. Работа в режиме постановки тестов с последующим описанием:

1.2.1. При данном режиме работы кассета с картами помещается в вакуумную камеру и дальше — в загрузочный модуль без предварительного этапа внесения данных в компьютер. В этом случае данные обработки карт в окне результатов изолята появятся только после внесения необходимой информации (лабораторного номера) в таблицу окна постановки тестов с последующим описанием.

1.3. Внесение данных об образце:

1.3.1. Внести данные об образце (если эта функция активирована) можно как до момента загрузки карт в анализатор, так и после завершения обработки карт. При этом нужно иметь в виду, что результаты анализов с отсутствующей информацией об образце не будут переноситься в архив.

1.4. Обработка результатов

1.4.1. После считывания карт полученные результаты анализируются программным обеспечением.

1.4.2. Результаты исследования карт можно просмотреть (распечатать) в соответствующем окне интерфейса.

1.5. Ограничение метода

1.5.1. Корректная идентификация и определение чувствительности к антибактериальным веществам с использованием микробиологического анализатора возможны только для микроорганизмов, имеющих клиническое значение.

2. Выявление и количественная оценка резистентности микроорганизмов к антибактериальным веществам с использованием микробиологического экспресс-анализатора с импедиметрической детекцией

2.1. В основе импедиметрического метода определения резистентности микроорганизмов к антимикробным препаратам лежит макрометод серийных разведений антибиотиков.

2.2. Импеданс — сопротивление потоку переменного тока через проводящий материал; является функцией активной проводимости, емкостного сопротивления и применяемой частоты. Приборы на основе метода разделенного импеданса регистрируют 2 определенных показателя импеданса для каждого измерения. Эти величины показаны как М-величина (импеданс среды) и Е-величина (импеданс электрода). Импедансная микробиология является непрямым культуральным методом обнаружения микроорганизмов с использованием определения электрического импеданса. Изменения импеданса обычно происходят в питательной среде по мере того, как ее химический состав изменяется в результате роста и метаболической активности

микроорганизмов. Под действием микроорганизмов заряженные конечные продукты метаболизма выделяются в ростовую среду. В основном незаряженные или слабо заряженные субстраты превращаются в сильно заряженные конечные продукты. Так, например, белки метаболизируются до аминокислот, углеводы и жиры — до органических кислот. Образующиеся метаболиты имеют меньший размер и, таким образом, более подвижны. Эти электрохимические изменения в ростовой среде приводят к существенным изменениям импеданса. Экспоненциальные изменения импедансного сигнала могут наблюдаться, когда количество микроорганизмов достигает порога около 10^6 – 10^7 клеток/мл.

2.3. Проведение исследования:

2.3.1. Добавить в каждую измерительную ячейку по 9 мл среды ViMedia 001В (готовится в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя).

2.3.2. Добавить в каждую измерительную ячейку по 1,0 мл двукратных серийных разведений АБВ. Предварительно в пробирках со средой ViMedia 001В готовится ряд серийных разведений АБВ, концентрации которых отличаются в соседних пробирках в 2 раза. Серия разведений обязательно должна включать в себя пограничные концентрации и допустимые диапазоны МИК для контрольных штаммов. При этом реальные концентрации растворов должны учитывать фактор разбавления раствора АБВ при инокуляции. Диапазон двукратных серийных разведений АБВ зависит от вида тестируемого микроорганизма, предполагаемой активности АБВ и целей исследования. Для получения качественных результатов допускается использовать только две пороговые концентрации антибиотиков (в этом случае штаммы распределяются по чувствительности на 3 категории).

2.3.3. Не позднее чем через 15–30 мин в каждую измерительную ячейку добавить 0,1 мл суспензии исследуемого микроорганизма с плотностью 0,5 единиц Мак-Фарланда (конечная концентрация микроорганизмов в ячейке — 1×10^6 КОЕ/мл).

2.3.4. Для контроля используется измерительная ячейка, содержащая 10 мл питательной среды ViMedia 001В и 0,1 мл суспензии тестируемого микроорганизма в заданной концентрации.

2.3.5. Тщательно перемешать содержимое каждой измерительной ячейки, вращая ее между ладонями (не переворачивать ячейки!). Выбрать в основном меню программы «Начало измерений» и начать измерения.

2.3.6. После того как каждая позиция в блоке будет отмаркирована как свободная на экране монитора, поместить измерительные ячейки в инкубаторный блок прибора. Измерение начнется автоматически через 1 ч после загрузки ячеек в прибор. Рост микроорганизмов и время определения изменения импеданса (IDT) будут записаны автоматически.

2.4. Учет и обработка результатов

2.4.1. Учет результатов основан на сравнении степени угнетения роста исследуемого микроорганизма разведениями АБВ с ростом в контрольной ячейке.

2.4.2. Оценка проводится по двум параметрам:

- время пересечения 4% порогового значения по М-параметру менее чем за 1 ч;

- диапазон изменения импеданса по М-параметру за 2,5 ч.

2.4.3. Если исследуемый микроорганизм чувствителен к действию АБВ, то наблюдается увеличение времени пересечения порогового значения по М-параметру и уменьшение масштаба изменения импеданса по М-параметру в сравнении с контролем (тест-культура). МИК определяется по наименьшей концентрации АБВ, подавляющей рост микроорганизма.

2.4.4. В результате оценки антибиотикорезистентности штамм микроорганизма относится к одной из трех категорий:

- чувствительный — штамм подавляется при концентрациях АБВ, создающихся в органах и тканях человека при рекомендуемых режимах дозирования;

- промежуточный — МИК АБВ в отношении штаммов этой категории выше, чем в отношении чувствительных, но находится в пределах, достижимых при рекомендуемых режимах дозирования;

- устойчивый — штамм не подавляется при концентрациях АБВ, создающихся в органах и тканях при рекомендуемых режимах дозирования. Для устойчивых штаммов характерно наличие определенных механизмов резистентности.

2.5. Выражение результатов осуществляется на основании сопоставления результатов исследования (величины МИК АБВ) с пограничными значениями этих параметров, отделяющих чувствительные штаммы от промежуточных и промежуточные от устойчивых.

3. Методы количественного определения способности к пленкообразованию изолятов микроорганизмов

3.1. Пробирочный метод

3.1.1. Определения способности к формированию биопленок проводится пробирочным методом для качественной оценки способности микроорганизмов к пленкообразованию. Оценка способности бактерий к пленкообразованию пробирочным методом состоит из нескольких этапов.

3.1.2. Стандартную микробиологическую петлю, содержащую суточную культуру исследуемого микроорганизма, помещают в пробирку, содержащую 5 мл триптон-соевого бульона с глюкозой (гл. 4, 2.5.1). Для каждого штамма исследуется не менее трех пробирок. Пробирки с посевами инкубируются при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч.

3.1.3. Содержимое пробирок удаляется, пробирки аккуратно промываются фосфатным буферным раствором, высушиваются.

3.1.4. В пробирки добавляется 5 мл 0,1% раствора кристаллического фиолетового, выдерживается экспозиция 30 мин, затем пробирки промываются дистиллированной водой. Пробирки высушиваются в перевернутом виде.

3.1.5. Способность бактерий к пленкообразованию оценивается

визуально. Реакция считается позитивной, если пленка покрывает стенки и дно пробирки, формирование кольца не учитывается как позитивная реакция. Учитываются результаты во всех пробирках, засеянных одним штаммом.

3.1.6. Степень способности к образованию биопленок оценивается по баллам:

- 0 — отсутствие способности;
- 1 — слабовыраженная способность;
- 2 — средневыраженная способность;
- 3 — сильновыраженная способность.

3.2. Планшетный метод

3.2.1. Оценка способности бактерий к пленкообразованию с использованием планшетного метода минимизирует получение ложноположительных и ложноотрицательных результатов при высокой чувствительности, специфичности и точности. Сущность метода заключается в посеве изучаемых штаммов микроорганизмов в жидкую питательную среду в ячейки 96-луночного полистиролового планшета. После инкубации проводится окраска бактериальной пленки и оценка интенсивности окрашивания с использованием спектрофотометра или иммуноферментного анализатора.

3.2.2. В пробирку, содержащую 5 мл триптон-соевого бульона с глюкозой (гл. 4, 7.5.1), вносится 1 мл суспензии микроорганизмов с оптической плотностью 0,5 единиц Мак-Фарланда.

3.2.3. Питательная среда с культурой помещается в ячейки 96-луночного полистиролового планшета по 150 мкл в лунку. Для посева каждого штамма используется не менее 12 лунок. Отрицательным контролем служат 12 ячеек со стерильным триптон-соевым бульоном с глюкозой.

3.2.4. Планшет инкубируется при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч. Затем содержимое ячеек аспирируется, ячейки промываются четырехкратно фосфатным буферным раствором (гл. 4, 7.5.2) для удаления планктонных форм микроорганизмов.

3.2.5. После высушивания ячеек в каждую вносится по 150 мкл 0,1% раствора кристаллического фиолетового, краситель выдерживается в ячейках в течение 30 мин. Когда раствор кристаллического фиолетового удаляется из планшета, ячейки промывают четырехкратно дистиллированной водой. Для экстракции красителя из пленки в ячейки добавляется по 150 мкл 96% этилового спирта. Оптическая плотность в ячейках оценивается с использованием многоканального спектрофотометра или иммуноферментного анализатора при длине волны 540 нм.

3.2.6. Для оценки способности бактерий к образованию биопленок необходимо вычислить среднее значение оптической плотности 6 ячеек отрицательного контроля ($ОП_{OK}$). Для каждого штамма также определяется среднее значение оптической плотности по 6 ячейкам ($ОП_{штамма}$). Минимальное значение оптической плотности для ячеек с микроорганизмами, способными к образованию биопленки ($ОП_{min}$), является сумма среднего значения оптической плотности ячеек отрицательного контроля и 3 стандартных отклонений

среднего значения оптической плотности ячеек отрицательного контроля:

$$ОП_{\min} = ОП_{ОК} + 3 \cdot \text{стандартное отклонение } ОП_{ОК}. \quad (3)$$

3.2.7. Интерпретация результатов исследований проводится в соответствии с таблицей 1:

Таблица 1. — Степень способности к образованию биопленок исследуемых штаммов микроорганизмов

Среднее значение $ОП_{\text{штамма}}$	Способность к пленкообразованию
$\leq 2 \times ОП_{\min}$	Отсутствует/слабо выражена
$2 \times ОП_{\min} - 4 \times ОП_{\min}$	Умеренная
$> 4 \times ОП_{\min}$	Сильная

4. Методы выявления способности к персистенции изолятов микроорганизмов

4.1. Выделение стафилококков с персистентными свойствами

4.1.1. При исследовании смывов с рук персонала и технологического оборудования, а также проб пищевых продуктов и сырья, образцов клинического материала рекомендуется проводить выделение стафилококков с персистентными свойствами. Для исследования отбирается 1,0 г или 1,0 см³ образца.

4.1.2. Для предварительного селективного обогащения 1,0 г или 1,0 см³ исследуемого образца вносится в пробирку, содержащую 5 мл солевого бульона с маннитом (гл. 4, 2.6.1). Посевы инкубируются в течение 24±2 ч при температуре 37±2°С.

4.1.3. После инкубации пробирок с использованием стандартной микробиологической петли проводится посев обогащенной культуры штрихом на поверхность желточно-солевого агара с фузидином (гл. 4, 2.6.3). Посевы инкубируются в течение 24±2 ч при температуре 37±2°С. Опытным путем доказано, что стафилококки, способные к росту на питательном агаре с концентрацией фузидина 0,00015–0,0003 г/л, обладают персистентными характеристиками.

4.1.4. При росте колоний стафилококков — круглых, слегка возвышающихся над поверхностью агара колоний с ровными краями диаметром 2–2,5 мм, окрашенных в желтый, золотистый, кремовый, палевый или белый цвет, окруженных зоной лецитиназной активности либо без нее — отбирают не менее 5 типичных колоний, проводят окраску по Граму. При обнаружении в мазках грамположительных кокков проводят идентификацию микроорганизмов до вида и анализ антилизоцимной и антиинтерфероновой активности выделенных изолятов.

4.2. Выделение эшерихий с персистентными свойствами

4.2.1. При исследовании смывов с рук персонала и технологического оборудования, воды, проб пищевых продуктов и сырья, образцов клинического материала рекомендуется проводить выделение бактерий вида *Escherichia coli*

с персистентными свойствами. Для исследования отбирается 1,0 г или 1,0 см³ образца. При исследовании воды необходимый объем фильтруется через мембранный фильтр с диаметром пор 45 мкм.

4.2.2. Проводится предварительное обогащение образца. Для этого 1,0 г или 1,0 см³ образца (или мембранный фильтр при исследовании пробы воды) вносится в пробирку, содержащую 5 мл бульона Кесслера (гл. 4, 2.6.2). Посевы инкубируются в течение 24±2 часов при температуре 37±2°С.

4.2.3. После инкубации пробирок с использованием стандартной микробиологической петли проводится посев обогащенной культуры штрихом на поверхность агара Эндо с карбенициллином (гл. 4, 2.6.4). Посевы инкубируются в течение 24±2 ч при температуре 37±2°С. Опытным путем доказано, что эшерихии, способные к росту на среде Эндо, содержащей в качестве селективного агента раствор антибиотика класса полусинтетических пенициллинов карбенициллина с концентрацией 0,01 г/мл, обладают персистентными характеристиками.

4.2.4. При росте колоний *Escherichia coli* на агаре Эндо с карбенициллином — круглых, малиновых колоний с металлическим блеском или без него, блестящих, выпуклых, диаметром 1–4 мм — отбирают не менее 5 типичных колоний, проводят окраску по Граму. При обнаружении в мазках грамотрицательных неспорообразующих палочек проводят идентификацию микроорганизмов до вида и анализ антилизоцимной и антиинтерфероновой активности выделенных изолятов.

4.3. Определение антилизоцимной активности

4.3.1. Определение антилизоцимной активности микроорганизмов проводится чашечным методом на основе феномена «отсроченного антагонизма».

4.3.2. Основной раствор лизоцима готовится путем растворения 10±0,1 мг лизоцима в 10 мл физиологического раствора. Для подготовки разведений лизоцима используется основной раствор, содержащий 50 мкг/мл лизоцима. Исследуется до 5 рабочих разведений лизоцима в зависимости от ожидаемой активности штамма. В пробирку помещается 0,1 мл основного раствора и добавляется 0,9 мл физиологического раствора для получения концентрации 1 мкг/мл. Для получения концентрации лизоцима 2 мкг/мл в пробирку вносится 0,2 мл основного раствора и 0,8 мл физиологического раствора. Аналогичным образом готовятся разведения 3; 4; 5 мкг/мл и далее по необходимости.

4.3.3. Разведения лизоцима вносят в чашки Петри и заливают 4 мл 1,5% питательного агара (гл. 4, 2.4), содержимое аккуратно перемешивают и чашки подсушивают в термостате при температуре 37±1°С или в ламинарном боксе в течение 10–15 мин.

4.3.4. Для контроля используются чашки Петри, содержащие 1 мл физиологического раствора и 4 мл 1,5% питательного агара.

4.3.5. Используя стандартную микробиологическую петлю или стерильный ватный тампон, на поверхность чашек бляшками наносятся суспензии исследуемых изолятов микроорганизмов.

4.3.6. Чашки с посевами переворачивают и инкубируют при температуре

37±1°C в течение 24±2 ч.

4.3.7. Выросшие колонии обрабатывают парами хлороформа, наливая его в крышки чашек Петри на 10 мин.

4.3.8. Суспензию тест-штамма *Micrococcus luteus* с концентрацией 10⁹ клеток/мл вносят по 0,1 мл в пробирки. Затем в пробирки добавляют по 4 мл 0,7% (полужидкого) питательного агара (гл. 4, 2.4). Содержимое пробирок перемешивается, и агар с тест-штаммом заливается в чашки Петри, содержащие убитые колонии исследуемых микроорганизмов, и равномерно распределяется по поверхности чашек.

4.3.9. Чашки инкубируют при температуре 37±1°C в течение 24±2 ч не переворачивая.

4.3.10. После инкубации оценивают рост индикаторного штамма вокруг макроколоний исследуемых микроорганизмов. Учитывают антилизоцимную активность по принятой градации: 0; 1; 2; 3; 4; 5 мкг/мл. За уровень антилизоцимной активности исследуемых культур принимают максимальное значение концентрации лизоцима в среде, при которой еще наблюдается рост индикаторного штамма.

4.4. Определение антиинтерфероновой активности

4.4.1. Для определения антиинтерфероновой активности исследуемого микроорганизма определяется его антагонистическая активность по отношению к тест-штамму *Corynebacterium xerosis* при росте в питательном агаре, содержащем препарат человеческого лейкоцитарного интерферона.

4.4.2. При подготовке разведений интерферона вскрытую ампулу разводят в 4 мл физиологического раствора. Готовят рабочие разведения: 1,0 мл разведенного интерферона (10 условных единиц); к 0,5 мл разведения интерферона добавляют 0,5 мл физиологического раствора (5 усл. ед.); к 0,25 мл — 0,75 мл (2 усл. ед.); к 0,125 мл — 0,875 мл (1 усл. ед.).

4.4.3. Рабочие разведения интерферона вносят в чашки Петри и заливают 4 мл 1,5% питательного агара (гл. 4, 2.4), содержимое аккуратно перемешивают, чашки подсушивают в термостате при температуре 37±1°C или в ламинарном боксе в течение 10–15 мин.

4.4.4. Для контроля используются чашки Петри, содержащие 1 мл физиологического раствора и 4 мл 1,5% питательного агара.

4.4.5. Используя стандартную микробиологическую петлю или стерильный ватный тампон, на поверхность приготовленных сред бляшками наносятся суспензии исследуемых штаммов.

4.4.6. Чашки с посевами переворачивают и инкубируют при температуре 37±1°C в течение 24±2 ч.

4.4.7. Выросшие макроколонии обрабатывают парами хлороформа, наливая его в крышки чашек Петри на 10 мин.

4.4.8. Суспензию суточной культуры тест-штамма *Corynebacterium xerosis*

с концентрацией 10^9 клеток/мл вносят по 0,1 мл в пробирки и заливают каждую чашку вторым слоем, добавляя к индикаторной культуре по 4 мл 0,7%-го (полужидкого) питательного агара (гл. 4, 7.4). Содержимое равномерно распределяют по поверхности чашек.

4.4.9. Чашки инкубируют при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч не переворачивая.

4.4.10. Результаты учитывают по наличию роста коринебактерий вокруг колоний исследуемых культур. Учитывают уровень выраженности признака по принятой градации: 0; 1; 2; 5; 10 усл. ед. За уровень антиинтерфероновой активности исследуемых культур принимают максимальное значение концентрации интерферона в среде, при которой еще наблюдается рост индикаторного штамма.

5. Метод определения лецитовителлазной активности микроорганизмов

5.1. Для определения лецитовителлазной активности используется плотная питательная среда, содержащая яичную эмульсию (гл. 4, 2.7.1.). При исследовании бактерий рода *Staphylococcus* допускается использовать среду желточно-солевой агар. При исследовании бактерий рода *Listeria* используется желточный агар с активированным углем. Посев проводится на чашки Петри со средой комнатной температуры ($20\text{--}22^\circ\text{C}$).

5.2. Стандартной бактериологической петлей диаметром 2 мм проводится посев штрихом на чашку Петри с желточным агаром таким образом, чтобы можно было увидеть ширину возможной зоны лецитиназной активности штамма.

5.3. После посева чашки перевернуть и инкубировать при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 22–24 ч.

5.4. Лецитовителлазная активность определяется непосредственно при просмотре чашек в виде образования мутной зоны и радужных венчиков вокруг колоний. Чтобы избежать ошибок в определении желточной реакции, необходимо иметь в виду, что иногда наблюдается помутнение среды без радужного ободка; в этом случае проба на лецитовителлазу считается отрицательной. Учитывается наличие зоны лецитиназной активности, при необходимости — ее ширина (с обязательным указанием точного времени инкубации штамма).

6. Метод определения гемолитической активности микроорганизмов

6.1. Для определения гемолитической активности штамма используется плотная питательная среда, содержащая стерильную дефибрированную или цитратную кровь животного (барана, кролика, крупного рогатого скота) или человека (гл. 4, 2.8.1.). Посев проводится на чашки Петри со средой комнатной температуры ($20\text{--}22^\circ\text{C}$).

6.2. Поверхностным методом с использованием стандартной бактериологической петли диаметром 2 мм проводится посев штрихом суспензии микроорганизмов на кровяной агар.

6.3. Чашки инкубируются в перевернутом виде при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$

в течение 22–24 ч.

6.4. Наличие зон гемолиза выявляется в проходящем свете с определением типа гемолиза:

- α -гемолиз, или неполный гемолиз, отмечается при потемнении агара и появлении зон зеленоватого цвета;

- β -гемолиз проявляется полным лизисом эритроцитов в среде вокруг и под колониями. Среда вокруг колоний прозрачная и желтоватая.

7. Определение антагонистической активности

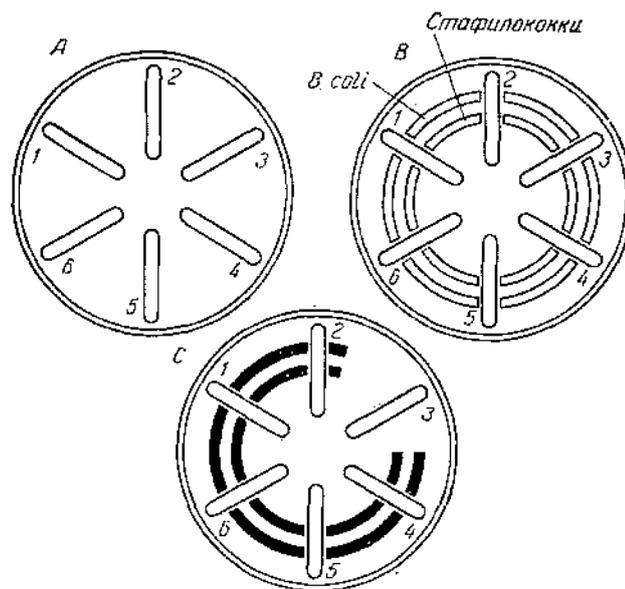
Для определения антагонистической активности можно использовать штаммы микроорганизмов либо культуральную жидкость, полученную методом фильтрации жидкой питательной среды.

7.1. Метод отсроченного антагонизма

7.1.1. Наиболее распространенным для определения антагонистической активности бактерий является метод отсроченного антагонизма. На плотную питательную среду (1,5% мясопептонный агар) засеивается бактериальная суспензия штамма микроорганизма – продуцента фактора ингибирования в виде прямой полосы в центре чашки Петри. Посевы инкубируются при температуре $37\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч (среда и условия выращивания могут меняться в зависимости от свойств изучаемого микроба). После инкубации проводится посев штрихами культур тех микробов, по отношению к которым ожидается проявление антагонистического действия — тест-штаммов. Посевы тест-штаммов бактерий не должны соприкасаться с бактерией-антагонистом, должны отступать от центрального штриха на 1–2 мм. Чашки инкубируются в течение 24–48 ч при температуре, оптимальной для роста тест-штаммов. Величина зон задержки роста тест-штаммов может быть различной и при выраженном антагонистическом действии достигать 20 мм и более. Для контрольного посева вместо тест-штамма используется штамм-антагонист.

7.1.2. Следует учитывать, что размер зоны ингибирования может зависеть от множества факторов, в т. ч. от толщины слоя питательного агара. Для получения воспроизводимых результатов в чашки заливается точно $20,0\pm 1,0$ мл МПА и при застывании агара чашки находятся в строго горизонтальном положении.

7.1.3. При одновременном исследовании нескольких штаммов-антагонистов можно проводить их посев в одной чашке Петри радиальными штрихами: на поверхность застывшего агара засеивают предполагаемые штаммы-антагонисты (до 6 различных штаммов). Засеянные чашки Петри помещают в термостат при температуре $37\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч (среда и условия выращивания могут меняться в зависимости от свойств изучаемого микроба). После этого между выросшими полосками штамма-антагониста засеивают прерывистым кругом культуры тест-штаммов. Полукруглые полоски не должны соприкасаться с радиальными, они должны отступать от них на 1–2 мм. Чашки вновь ставят в термостат на 1 сут, а после учитывают результаты опыта. Если среди испытуемых штаммов имеется штамм-антагонист, рост тест-микроба вокруг участка его роста отсутствует (рисунок 1).



А — чашка Петри через 48 ч после посева микроба-антагониста; Б — стафилококк и кишечная палочка нанесены прерывистыми кругами; С — результат опыта через 24 ч: штамм № 3 обладает антагонистическим действием

Рисунок 1. — Выявление микробного антагонизма методом радиальных посевов

7.1.4. Регуляция антагонистической активности осуществляется за счет продукции антимикробных веществ, в частности литических ферментов. Жидкая питательная среда после выращивания в ней микроба-антагониста, как правило, приобретает антагонистические свойства, характерные для испытуемого штамма. Для количественной оценки антагонистической активности штамма проводится посев культуральной жидкости на поверхность питательного агара, засеянного культурой тест-штамма.

7.1.5. При наличии антагонистической активности исследуемого микроорганизма к одному или нескольким тест-штаммам проводится его посев в пробирку с жидкой питательной средой (мясопептонный бульон). После инкубации при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч суточная бульонная культура центрифугируется для осаждения клеточных элементов (4000 об./мин, 15 мин при 4°C). Полученный супернатант фильтруется через мембраны «Millipore» с диаметром пор 45 мкм.

7.2. Метод посева в полужидкий агар (исследование культуральной жидкости)

7.2.1. Суточная культура тест-штамма засеивается уколом микробиологической петли в пробирку с 5 мл полужидкого (0,7%) МПА. На его поверхность наслаивают культуральную жидкость штамма-антагониста. Посевы инкубируются в течение 24 ± 2 ч при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$. После выдерживания пробирки в термостате в полужидком агаре учитывается размер светлой зоны, где рост тест-микроба подавлен диффундирующими с поверхности в нижние слои веществами-антагонистами.

7.3. Количественный метод оценки антагонистической активности

культуральной жидкости штамма-антагониста

7.3.1. Для количественной оценки антагонистической активности микроорганизма также можно учитывать процент выживания клеток тест-штамма при посеве глубинным методом в плотный питательный агар, содержащий культуральную жидкость штамма-антагониста. Проводится ряд десятикратных последовательных разведений суточной культуры тест-штамма физиологическим раствором для получения бактериальных суспензий с плотностью 10^3 – 10^6 клеток на мл. Расплавленный и охлажденный до температуры $45\pm 5^\circ\text{C}$ 2,0% МПА смешивается в пропорции 10:1 с культуральной жидкостью штамма-антагониста. Проводится посев глубинным методом исследуемых разведений 1,0 мл суспензии тест-штамма. В чашку заливается 20 мл смеси МПА и культуральной жидкости. После застывания чашки переворачиваются и инкубируются при температуре $37\pm 2^\circ\text{C}$ в течение 24 ± 2 ч. После инкубации учитывается количество выросших колоний тест-штамма. Исследование проводится не менее чем в двух повторностях. Контролем служат чашки с тест-штаммами, залитые смесью МПА и стерильного физиологического раствора в соотношении 1:10.

7.3.2. Сила антагонистической активности штамма определяется по степени интенсивности подавления роста тест-штаммов по сравнению с контролем:

- 1 степень (слабая) — подавление на 1 – $2 \lg$ КОЕ/мл;
- 2 степень (умеренная) — на 3 – $4 \lg$ КОЕ/мл;
- 3 степень (сильная) — на 5 – $9 \lg$ КОЕ/мл, вплоть до полного подавления роста штамма.

7.3.3. При вычислении процента выживших клеток тест-штамма необходимо учитывать разведение культуральной жидкости питательным агаром.

8. Модификация факторов патогенности

8.1. Для определения способности к модификации факторов патогенности выделенными штаммами условно-патогенных и патогенных микроорганизмов проводится оценка взаимного влияния штаммов, выделенных в ассоциации, методом перекрестного посева. При отсутствии штаммов-ассоциантов рекомендуется для оценки модификации факторов патогенности использовать штамм *Staphylococcus epidermidis* или штамм *Bifidobacterium spp.*, типичный по биохимическим и морфологическим признакам.

8.2. Из суточных культур микроорганизмов, выделенных в ассоциации, готовится суспензия с бактериальной плотностью 0,5 единиц McF. Для приготовления суспензии чистая культура с помощью бактериологической петли или тампона вносится в стеклянную пробирку, содержащую 5 мл фосфатного буферного раствора ($\text{pH} = 7,2\pm 0,1$), и гомогенизируется там до достижения требуемой плотности бактериальной суспензии.

8.3. На поверхность стерильной чашки Петри диаметром 90 мм с питательным агаром стандартной микробиологической петлей диаметром 2 мм, содержащей первую культуру, проводится два небольших (длина — 15 мм, ширина — 2 мм) горизонтальных штриха, один — сверху чашки,

другой — посередине. С другой стороны чашки вертикально аналогичными штрихами высевается второй штамм, так чтобы штрихи в центре чашки пересекались под прямым углом. В месте пересечения двух штаммов находится область взаимного влияния микроорганизмов.

8.4. Посевы инкубируются в течение 24 ± 2 ч при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Для оценки взаимного влияния микроорганизмов отбираются колонии, находящиеся в зоне влияния штамма-ассоцианта — отступая 2 мм от точки пересечения штрихов (рисунок 2).

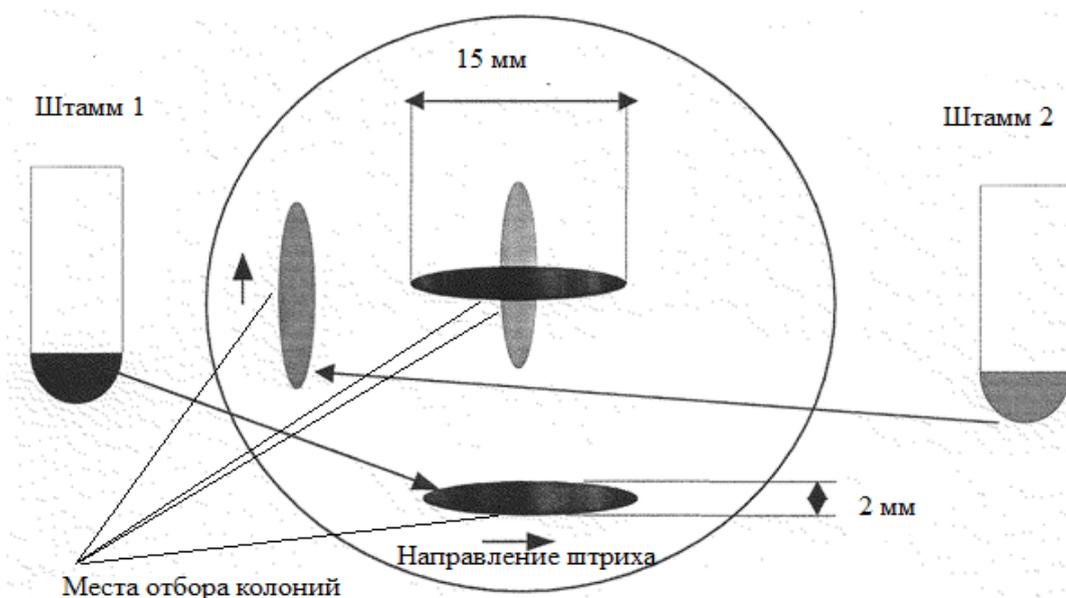


Рисунок 2. — Техника посева штаммов-ассоциантов на плотную питательную среду для выявления модификации факторов патогенности микроорганизмов

8.5. Исследуется модификация факторов агрессии у выделенных штаммов условно-патогенных и патогенных бактерий. Модификация факторов агрессии может проявляться взаимным или односторонним усилением, ослаблением свойств, а также индифферентным отношением штаммов-симбионтов.

ГЛАВА 6 ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Данные, полученные на основании результатов исследований наличия и степени выраженности факторов агрессии у выделенных штаммов условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, выражаются в баллах, определяющих патогенный потенциал и эпидемиологическую значимость штамма.

2. Балльная оценка эпидемиологической значимости патогенных и условно-патогенных микроорганизмов проводится согласно таблице 2:

Таблица 2. — Определение эпидемиологической значимости штаммов

патогенных и условно-патогенных микроорганизмов

Факторы агрессии	Оценка выраженности фактора в баллах			
	0	1	2	3
Антибиотико-резистентность	Отсутствие	К 1 группе АБВ	К 2 группам АБВ	К ≥ 3 группам АБВ
Способность к пленкообразованию	$\leq 2 \times \text{ОП}_{\min}$ (отсутствует или слабо выражена)	$2 \times \text{ОП}_{\min} - 4 \times \text{ОП}_{\min}$ (умеренная)	$> 4 \times \text{ОП}_{\min}$ (сильная)	-
Персистентные свойства: - антилизоцимная активность - антиинтерфероновая активность; - способность к росту на специфических средах (для <i>E. coli</i> , стафилококков)	0 мкг/мл (отсутствует)	1–2 мкг/мл (слабая)	3–4 мкг/мл (умеренная)	≥ 5 мкг/мл (сильная)
	0 у.е. (отсутствует)	1–2 у.е. (слабая)	3–5 у.е. (умеренная)	> 5 у.е. (сильная)
	Нет роста	Рост	–	–
Гемолитическая активность	Отсутствие	Наличие	–	–
Лецитиназная активность	Отсутствие	Наличие	–	–
Антагонистическая активность	Отсутствует	Подавление на $1-2 \lg$ КОЕ/мл (слабая)	$3-4 \lg$ КОЕ/мл (умеренная)	$5-9 \lg$ КОЕ/мл (сильная)
Модификация факторов патогенности	Индифферентное отношение	Усиление или ослабление	–	–

Средние показатели наличия и степени выраженности факторов агрессии условно-патогенных микроорганизмов (согласно данным литературы)

Род микроорганизмов	Антибиотико-резистентность	Пленкообразование	Способность к персистенции		Гемолизины	Лецитиназа	Антагонистическая активность	Модификация факторов патогенности
			АЛА	АИА				
<i>Escherichia</i>	В	Сильн.	Сильн.	Сильн.	+	+	В	В
<i>Klebsiella</i>	В	Слаб.	Сильн.	Сильн.	+	+	В	В
<i>Proteus</i>	В	У	Сильн.	Сильн.	+	+	В	В
<i>Citrobacter</i>	В	У	У	У	+	+	В	В
<i>Enterobacter</i>	В	У	У	У	+	+	В	В
<i>Serratia</i>	В	Слаб.	У	У	+	+	В	В
<i>Staphylococcus</i>	В	У	У	У	+	+	В	В
<i>Streptococcus</i>	В	Сильн.	Слаб.	У	+	–	В	В
<i>Enterococcus</i>	В	У	Слаб.	Слаб.+	+	–	В	В
<i>Pseudomonas</i>	В	Сильн.	У	Сильн.	+	+	В	В

Примечание — В — переменные значения; У — умеренно выраженные; Слаб. — слабо выраженные; Сильн. — сильно выраженные; «+» — было выявлено у отдельных штаммов, «–» — не выявлено; АЛА — антилизосимная активность; АИА — антиинтерфероновая активность. Наличие и выраженность факторов агрессии может варьировать у различных штаммов микроорганизмов.

Форма «Карты эпидемиологической значимости штамма»

1. Вид микроорганизма _____
2. Дата выделения штамма _____
3. Место выделения _____
4. Морфологические характеристики _____
5. Факторы агрессии

№ п/п	Исследованные факторы агрессии	Наличие и степень выраженности факторов	Баллы
1	Антибиотикорезистентность		
2	Способность к пленкообразованию		
3	Способность к персистенции: - антилизоцимная активность - антиинтерфероновая активность - дополнительные тесты		
4	Лецитовителлазная активность		
5	Гемолитическая активность		
6	Антагонистическая активность (указать исследуемые штаммы)		
7	Модификация факторов патогенности (указать исследуемые штаммы)		
Итого			

6. Заключение _____

Подпись ответственного лица