МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Руководства по клинической лабораторной диагностики

Бактериологический анализ мочи

ID: **КЛД8**

URL:

Профессиональные ассоциации:

- **Федерация лабораторной медицины**

Разработчики:

Р.С. Козлов[1], В.В. Меньшиков[2], В.С. Михайлова[3], Б.Ф. Шуляк[4], Т.И. Долгих[5], А.Н. Круглов[6], Е.В. Алиева[7], В.Е. Маликова[8]

[1] НИИ антимикробной химиотерапии ГБОУ ВПО Смоленская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России

[2,3] ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздравсоцразвития России

[4] ООО ГЕМ, Москва

[5] Центра лабораторной диагностики Омской государственной медицинской академии

[6] Лаборатория микробиологии Национального агентства клинической фармакологии и фармации, Москва

[7] ГБОУ ВПО Ставропольская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России

[8] ГКУЗ Инфекционная клиническая клиническая больница №1 Департамента здравоохранения Москвы

Ключевые слова: стандартизация, стандартизированные технологии, бактериологический анализ мочи, инфекции мочевых путей (ИМП), уропатогены, питательные среды, посев

Настоящая стандартизованная аналитическая технология устанавливает единые требования при выполнении бактериологического анализа мочи в бактериологических лабораториях медицинских учреждений.

Одобрены на V научно-практической междисциплинарной конференции "Актуальные вопросы диагностики и лечения заболеваний микробной этиологии" в г. Железноводске 5-6 декабря 2013 года.

Утверждены Профильной комиссией Минздрава России по клинической лабораторной диагностике 25 декабря 2013 года. Представлены от Ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины».

Оглавление

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ 4
Показания для проведения 4
2. ТРЕБОВАНИЯ К ОБЕСПЕЧЕНИЮ ВЫПОЛНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ 5
2.1 Требования к специалистам и вспомогательному персоналу 5
2.2 Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала 5
2.3. Условия выполнения технологии бактериологического анализа мочи и функциональное назначение 6
2.4. Материальные ресурсы, необходимые для выполнения технологии: приборы, средства измерения, лабораторное оборудование 6
2.4.1. Питательные среды 7
2.4.2. Реагенты и средства дезинфекции 7
2.4.3. Лабораторная посуда и расходные материалы 7
2.4.5. Оборудование 8
3. Технологический поток БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МОЧИ 9
3.1. Преаналитический этап 9
3.1. 1. Взятие образцов мочи 9
3.1. 2. Хранение и транспортировка проб мочи 12
3.2. Идентификация образца 12
3.3. Оценка пригодности образца для исследования 13
3.4. Аналитический (лабораторный) этап 13
4. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА МОЧИ 20
5. ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА МОЧИ 21
5.1. Программы обеспечения качества 21
5.2. Контроль качества бактериологических исследований 21
5.3. Образование специалистов 22
6. ТРЕБОВАНИЯ К РЕЖИМУ ТРУДА И ОТДЫХА, ДИЕТЕ И ОГРАНИЧЕНИЯМ ПРИ ПОДГОТОВКЕ ПАЦИЕНТА К СБОРУ МОЧИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА МОЧИ 23
7. ЗАТРАТЫ ТРУДА НА ВЫПОЛНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ «БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОЧИ» 23
ПРИЛОЖЕНИЯ 23
Приложение 1. Применение тест-систем типа «дипстрик» для бактериологического анализа мочи. 23
Приложение 2. МЕТОДЫ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКИ НАЛИЧИЯ БАКТЕРИЙ В МОЧЕ 26
Приложение 3. МИНИМАЛЬНЫЕ ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЕ ПРИЗНАКИ БАКТЕРИЙ, НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ОБНАРУЖИВАЕМЫХ В МОЧЕ 28
Литература 32

1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Цели бактериологического анализа мочи

Технологию «Бактериологический анализ мочи» выполняют для диагностики и мониторинга течения бактериальных болезней органов мочевой системы, определения чувствительности их возбудителей к антимикробным препаратам и профилактического скрининга групп повышенного риска по бактериальным инфекциям мочевыводящих путей (ИМП).

Этой цели достигают посредством проводимого в определенном порядке технологического потока и с помощью регламентированных данной Стандартизированной технологией методов.

Показания для проведения

Основными показаниями для проведения бактериологического исследования служит наличие у пациента симптомов заболеваний мочевой системы. В случае неосложненных ИМП при отсутствии структурных и функциональных нарушений мочевой системы, а также сопутствующих заболеваний, которые могут повышать риск их развития, или неэффективности лечения, стартовая терапия может быть назначена эмпирически без проведения бактериологического исследования мочи. Выбор препарата в этом случае проводится на основании имеющихся данных локального эпидемиологического мониторинга чувствительности к антимикробным препаратам основных возбудителей ИМП.

Бактериологическое исследование мочи следует проводить в следующих случаях [1]:

- Подозрение на пиелонефрит;
- Подозрение на ИМП, связанную с проведением медицинских манипуляций (цистоскопия, катетеризация), а также оказанием медицинской помощи (в т.ч. нозокомиальные ИМП);
- Наличие симптоматики ИМП у мужчин;
- Наличие симптоматики ИМП у беременных женщин;
- Осложненные и/или рецидивирующие ИМП у женщин старше 65 лет;
- Клинические признаки ИМП у лиц с иммунодефицитами, почечной недостаточностью, сахарным диабетом, аномалиями развития мочевой системы, мочекаменной болезнью, после трансплантации почек;
- Повышение температуры тела у пациентов с постоянным катетером и детей в возрасте до 3 лет при отсутствии очевидных причин лихорадки;

- Неэффективность предшествующей антибиотикотерапии ИМП;

Скрининговое бактериологическое исследование мочи рекомендуется проводить 2 группам пациентов повышенного риска развития осложненных ИМП:

- беременным женщинам (при первом и последующих посещениях женской консультации, а в случае проведения лечения ИМП – после его завершения);
- пациентам, которым планируется проведение хирургических операций на органах мочевой системы.

2. ТРЕБОВАНИЯ К ОБЕСПЕЧЕНИЮ ВЫПОЛНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ

2.1 Требования к специалистам и вспомогательному персоналу

В выполнении данной технологии принимают участие:

- врач-бактериолог, в обязанности которого входит контроль всего технологического процесса и непосредственное выполнение этапов бактериологического анализа мочи, требующих высокой квалификации и специальной подготовки.

- специалист со средним медицинским образованием (медицинский технолог, медицинский лабораторный техник, фельдшер-лаборант, лаборант). В его обязанности входит прием поступающих в лабораторию проб мочи и сопроводительных документов, проведение технических манипуляций, не требующих высокой квалификации: подготовка стерильных комнат, ламинарных боксов, расходных материалов, включая приготовление реагентов и питательных сред (при наличии такой необходимости), посев проб мочи на питательные среды, культивирование посевов в термостате, количественный учет выросших в посевах колоний бактерий, утилизацию использованных расходных материалов и остатков исследованных проб.

Врач-бактериолог и специалист со средним медицинским образованием должны иметь соответствующие специальное образование и квалификацию, подтвержденные дипломом и сертификатом специалиста, периодически проходить курсы повышения квалификации и профессиональной переподготовки в установленном порядке.

Требования к знаниям и умениям специалистов, осуществляющих данную технологию, должны соответствовать требованиям образовательных стандартов.

2.2 Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала

Лица, отвечающие за сбор, доставку и анализ образцов мочи, должны владеть навыками безопасной работы с биологическим материалом и соблюдать

соответствующие правила. Все пробы мочи считают потенциально опасными, т.к. они могут содержать патогенные микроорганизмы.

Персонал, непосредственно участвующий в проведении бактериологического анализа мочи, обязан соблюдать общие правила работы в бактериологической лаборатории (СП 1.3.2322-08) [2], строго придерживаться общих стандартов по формированию и поддержанию безопасности рабочей среды в медицинских лабораториях при манипуляциях с пробами пациентов, химическими реактивами и другими объектами потенциальной опасности для здоровья людей (ГОСТ Р 52905 —2007 (ИСО 15190:2003) [3]. Все сотрудники обязаны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в технических паспортах к электрическим приборам, используемым в технологии (микроскопы, автоклавы, ламинарные боксы и др.).

Сбор, временное хранение, обеззараживание и транспортировка потенциально опасных отходов, загрязненных остатками биологического материала, образующихся в процессе выполнения технологии, должна производиться в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами (СанПиН 2.1.7.2790-10) [4].

Для предупреждения пожаров необходимо соблюдать правила пожарной безопасности в соответствии с действующими нормативными документами.

2.3. Условия выполнения технологии бактериологического анализа мочи и функциональное назначение

Комплекс исследований «Бактериологический анализ мочи» выполняется в бактериологических лабораториях амбулаторно-поликлинических и стационарных учреждений здравоохранения (любой формы собственности), имеющих лицензию на осуществление медицинской деятельности по разделу «Бактериология» [5].

Функциональное назначение услуги: диагностика и мониторинг течения ИМП, определение чувствительности возбудителей ИМП к антимикробным препаратам, профилактические обследования групп повышенного риска возникновения бактериальных ИМП.

2.4. Материальные ресурсы, необходимые для выполнения технологии: приборы, средства измерения, лабораторное оборудование

Для выполнения микробиологического исследования мочи пользуются стандартыми для микробиологической лаборатории оборудованием, реагентами и материалами, имеющими надлежащий сертификат качества и действующий срок годности.

2.4.1. Питательные среды

Стандартные питательные среды для культивирования микроорганизмов:

- универсальные (например, кровяной агар, CLED);
- селективные (Эндо, МакКонки, колумбийский CNA агар и др.);
- дифференциально-диагностические (хромогенные и др.).

Питательные среды приобретают в готовом для применения виде или в форме сухих смесей, предназначенных для самостоятельного приготовления. Среды готовят в строгом соответствии инструкциям производителя.

2.4.2. Реагенты и средства дезинфекции

В зависимости от используемых методов выполнения данной технологии следует применять соответствующие реагенты с неистекшим сроком годности.

Для дезинфекции и утилизации остатков проб и контаминированных пробами объектов следует использовать зарегистрированные в России и рекомендованные к применению в медицинских учреждениях и лабораториях дезинфицирующие средства в концентрации и времени экспозиции, указанных в рекомендациях по их использованию [3].

2.4.3. Лабораторная посуда и расходные материалы

При проведении бактериологического анализа мочи к перечисленным ниже расходным материалам предъявляют такие же требования, как и при бактериологическом исследовании других биологических материалов.

Одноразовые стерильные контейнеры для сбора и транспортировки мочи с устойчивым основанием, изготовленные из прозрачного материала (желательно пластика, что предотвращает поломку, облегчает дезинфекцию и утилизацию контейнера), инертного к компонентам мочи [6]. Крышка должна герметично закрывать контейнеры и легко открываться; она может быть сплошной или содержать специальные закрывающиеся прорези для вакуумных пробирок и специальных приспособлений типа «дипстрик». Контейнер не должен содержать химических веществ, негативно влияющих на жизнеспособность находящихся в моче бактерий.

Тест-системы типа «дипстрик» — устройства, представляющие собой контейнер со стерильной пластиковой подложкой с диагностической средой для экспресс-анализа мочи.

Стекла предметные и покровные стандартных размеров для микропрепаратов.

Слайд-планшет, совпадающий по размерам с предметным стеклом, имеющий определенное количество ячеек, каждая из которых предназначена для исследования отдельной пробы мочи.

Чашки бактериологические (Петри) для выращивания культур микроорганизмов на питательных средах.

Штативы и переноски для пробирок, контейнеров, чашек Петри

Кюветы и штативы-рельсы для фиксации и окрашивания мазков.

Петли бактериологические известного объема.

Дозаторы переменного объема полуавтоматические и стерильные наконечники для них.

Пипетки градуированные и пастеровские.

Шпатели Дригальского стерильные.

Посуда мерная лабораторная.

Диски (таблетки) с антибиотиками, Е-тесты, планшеты и стрипы с лиофилизированным бульоном и серийными разведениями антимикробных препаратов для определения чувствительности к ним выделенных из мочи культур бактерий и грибов.

Перчатки резиновые.

2.4.5. Оборудование

Ламинарный бокс.

Микроскоп бинокулярный (с набором объективов и окуляров) и осветитель для обнаружения бактерий в моче и изучения морфологии культур бактерий.

*Центрифуга лаборато*рная для осаждения бактерий (для слайд-планшетов применяют специальный ротор).

Термостаты электрические для выращивания посевов на питательные среды, поддерживающие температуру в камере в пределах 35 ± 2°С.

Весы лабораторные общего назначения.

Дистиллятор.

Автоклав электрический.

Холодильник, поддерживающий температуру 4-6°С, для хранения проб мочи, культур и реагентов.

Спиртовки и газовые горелки.

Счетчики колоний автоматические и полуавтоматические для подсчета колоний.

Диспенсор для распределения дисков (таблеток) с антимикробными препаратами на поверхности питательных сред в чашках Петри, засеянных тестируемыми бактериями.

Анализаторы микробиологические для идентификации микроорганизмов и определения их чувствительности к антимикробным препаратам.

3. Технологический поток БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ МОЧИ

Технологический поток бактериологического анализа мочи состоит из преаналитического и аналитического (лабораторного) этапов.

3.1. Преаналитический этап

При проведении преаналитического этапа необходимо учитывать требования ГОСТ Р 53079.4-2008 [7] и МУ 4.2.2039-05 [6].

3.1. 1. Взятие образцов мочи

Необходимость определения точного количества микроорганизмов в 1 мл исследуемой мочи для диагностики ИМП определяет особые требования к сбору и технике посева образцов мочи.

В условиях стационара средний медицинский персонал отделения отвечает за подготовку пациента, правильный сбор мочи самим пациентом, соблюдение режима хранения и доставки проб в лабораторию. Специалистами лаборатории должна быть составлена для медицинского персонала клинических отделений письменная инструкция по правилам взятия, регистрации, хранению и первичной подготовке мочи для бактериологического анализа. При необходимости сбора мочи через катетер, дренаж или пункцией мочевого пузыря эти процедуры выполняет врач или обученный средний медицинский персонал с использованием соответствующего оборудования и инструментов.

В амбулаторных условиях пациент собирает мочу дома без наблюдения медицинского персонала. В связи с этим необходимо обеспечить его письменными инструкциями (памятками), подготовленными специалистами лаборатории, для обеспечения унифицированных условий сбора материала. Так же, как и в стационаре, при сборе мочи в амбулаторных условиях пациентам рекомендуется предоставлять специальные стерильные контейнеры для сбора образца и приспособление для полуавтоматического посева мочи типа «дипстрик». Использование этих устройств позволяет проводить посев мочи не только в лабораторных условиях, но и непосредственно в месте сбора проб (у постели больного, в поликлиниках и лечебных учреждениях). С их помощью можно свести к минимуму преаналитический период, что

исключает получение завышенных результатов оценки тяжести бактериурии, обусловленных размножением бактерий в пробах мочи в процессе их хранения и транспортировки в лабораторию (Приложение 1).

По возможности, взятие проб материала для исследований следует выполнять до начала антимикробной терапии или в интервалах между курсами лечения. Для контроля эффективности лечения ИМП процедуру проводят после его окончания.

Наиболее достоверные результаты могут быть получены при исследовании средней порции мочи (3…20 мл), собранной после ночного отдыха до завтрака. Случайный образец собирают в любое неустановленное время. Такая необходимость обычно возникает при бактериологическом анализе мочи грудных детей, т.к. у этой категории пациентов невозможно собрать образец за длительный или строго определенный промежуток времени, а также в экстренных случаях. Не следует форсировать диурез посредством приема пациентом жидкости, т.к. при этом происходит разбавление мочи, ведущее к снижению титра бактерий.

Катетеризацию мочевого пузыря для рутинного исследования не применяют из-за риска инфицирования и возможности травмирования слизистой оболочки мочевых путей. В некоторых случаях к ней прибегают для уточнения того, где локализуется инфекция — в мочевом пузыре или почках.

В особых случаях (новорожденные и грудные дети, пациенты с заболеваниями предстательной железы или отсутствием контроля мочеиспускания, а также при необходимости определения локализации инфекции) проводят пункцию мочевого пузыря. Риск колонизации мочевого пузыря микроорганизмами при правильно выполненной надлобковой пункции ниже, чем при катетеризации мочевого пузыря. Однако, инвазивный характер процедуры не позволяет использовать ее в качестве рутинной.

Для сбора мочи у грудных и маленьких детей используют специальные мешки с гипоаллергенным адгезивным средством, обеспечивающим плотное прилегание приспособления к коже. Их проверяют каждые 15 мин, собранный образец переливают в контейнер для сбора мочи, который маркируют и транспортируют в бактериологическую лабораторию.

В каждом конкретном случае метод взятия мочи определяет врач-клиницист.

Методы взятия проб мочи [6-10]

1. Средняя порция свободно-выпущенной мочи:

- руки вымыть с мылом и насухо вытереть;

- провести тщательный туалет наружных половых органов теплой водой без применения антисептиков и просушить их салфеткой;
- открыть стерильный контейнер, не дотрагиваясь до внутренних его поверхностей;
- при мочеиспускании собрать в контейнер среднюю порцию мочи (первая порция не собирается, т.к. всегда контаминирована микрофлорой уретры; мочеиспускание завершается в туалет);
- плотно закрыть крышку контейнера со взятым образцом.

Примечание. Не следует собирать мочу для бактериологического анализа у женщин в период менструации. Нельзя использовать для бактериологического анализа мочу из мочеприемника и подкладного судна.

2. Катетеризация мочевого пузыря:
- выполняется врачом или обученным медицинским персоналом;
- с учетом правил асептики/антисептики и правильного положения пациента после обработки наружного отверстия уретры установить стерильный катетер в мочевой пузырь, при необходимости предварительно смочив его стерильным вазелиновым маслом;
- выпустить первые 15-30 мл мочи;
- собрать для исследования следующую порцию, при необходимости надавливая левой рукой на переднюю брюшную стенку над лобком;
- после прекращения выделения мочи осторожно извлечь катетер.

3. Моча, полученная из эпицистосомы, дренажа или установленного постоянного мочевого катетера.

Отбор пробы проводит врач или обученный медицинский персонал после замены дренажа/катетера или путем стерильной пункции. В этом случае с соблюдением правил асептики/антисептики после обработки спиртом наружного порта катетера необходимо собрать достаточное количество мочи с помощью стерильного шприца.

Примечание. Нельзя использовать для бактериологического анализа мочу из мочеприемника, соединенного с дренажем/катетером.

4. Надлобковая пункция
- выполняется врачом или обученным медицинским персоналом;
- перед процедурой аспирации мочевой пузырь должен быть наполнен и пальпироваться над лоном;
- при необходимости следует выбрить переднюю брюшную стенку в предполагаемом месте пункции;
- провести пункцию стерильным шприцом с иглой путем аспирации мочи из мочевого пузыря и перенести мочу в стерильный контейнер.

5. Моча, полученная при цистоскопии

Сбор проб мочи проводит врач-уролог в специально оборудованных цистоскопических комнатах лечебно-профилактических учреждений с помощью инструментов, необходимых для проведения цистоскопии.

3.1. 2. Хранение и транспортировка проб мочи

Образец мочи необходимо доставить в лабораторию в течение 2 ч после взятия.

При невозможности доставки проб мочи в лабораторию в указанный срок разрешается хранить их при +4°С в течение 24 ч с момента взятия. Образцы нельзя замораживать!

В случае если хранение в охлажденном виде и доставка проб в лабораторию в течение суток невозможны, допускается добавление в них 1 % борной кислоты, стабилизирующей концентрацию бактерий. Пробы с указанным консервантом можно хранить при комнатной температуре в течение срока, не превышающего 24 ч. Для избежания чрезмерной ингибиции уропатогенов следует применять борную кислоту в концентрации, не превышающей указанную, или применять коммерческие транспортные системы с этим консервантом. Кроме того, следует учитывать, что борная кислота снижает жизнеспособность и высеваемость псевдомонад.

Возможен экспресс-посев мочи в специальные приспособления типа «дипстрик» непосредственно в месте сдачи проб мочи пациентами. Устройства отправляют в лабораторию сразу после засева или в течение последующих 24 ч (их хранят не в холодильнике, а при комнатной температуре!). При наличие термостата в месте сбора проб мочи рекомендуется также инкубировать в них засеянные устройства в течение 18-24 ч и отправлять в лабораторию только те из них, в которых по истечению указанного срока появились признаки роста микроорганизмов.

3.2. Идентификация образца

Маркировка. Контейнеры и тест-системы с пробами мочи маркируют любым способом (несмываемым маркером, этикетками и пр.), обеспечивающим точную идентификацию проб.

Заявка (направление) на исследование. Каждый *о*бразец мочи должен поступать в лабораторию в сопровождении направления (заявки) на исследование, составляемого врачом-клиницистом. В направлении указывают ФИО пациента, пол, возраст или год рождения, способ получения пробы мочи (например, взятие мочи катетером), время ее сбора, характеристику образца (утренний или случайный), наличие в пробах консерванта (если его использовали, то указывают название реагента и его концентрацию),

предварительный клинический диагноз, использованные для лечения пациента антимикробные препараты, фамилию и инициалы назначившего исследование лечащего врача.

Сопроводительный документ. К каждой партии образцов мочи и засеянных ими устройств прилагают сопроводительный документ, в котором перечисляют количество направляемых в лабораторию материалов, их маркировку и соответствие заявкам на исследование.

3.3. Оценка пригодности образца для исследования

После доставки образцов мочи в лабораторию ее сотрудник, принимающий материал, должен проверить правильность оформления направления на исследование, маркировку (код или ФИО пациента должны быть идентичны данным, указанным в бланке-направлении), целостность контейнеров и зарегистрировать поступивший материал.

Не пригодными для бактериологического исследования являются образцы:

- немаркированные или несущие неверную маркировку;
- для которых не указаны дата, время и место сбора мочи;
- собранные ранее 24 ч до момента доставки в лабораторию;
- при нарушении целостности и/или герметичности контейнеров (в т.ч. пролитые пробы);
- направленные для выделения анаэробных бактерий, за исключением образцов, полученных методом надлобковой пункции.

В случае непригодности доставленного образца необходимо в кратчайшие сроки уведомить врача, назначившего исследование, и рекомендовать повторное взятие материала с соблюдением всех перечисленных выше правил. До получения уточнений образцы можно хранить в холодильнике (4…6°С) до 24 ч с момента их взятия.

В случаях, когда повторное взятие образцов мочи у пациента невозможно, то при оформлении результатов бактериологического анализа необходимо отразить возможность влияния нарушения регламента преаналитического этапа на полученный результат.

3.4. Аналитический (лабораторный) этап

3.4.1. *Методы предварительной оценки наличия бактерий* в моче пациента используют для быстрого получения информации о наличии, количестве и типе микроорганизмов в

моче. К ним относятся: микроскопические методы и методы обнаружения продуктов метаболизма бактерий. Выполняются по запросу лечащего врача в экстренных ситуациях как первый этап специфической диагностики, а также в качестве скрининга отдельных категорий пациентов и определения показаний для дальнейшего обследования. При рутинном бактериологическом анализе мочи они не обязательны. Экспресс-методы не требуют участия высококвалифицированного персонала и применения специализированного оборудования, поэтому ими можно пользоваться не только в микробиологических лабораториях, но также в лечебных учреждениях и клинико-диагностических лабораториях. Детальное описание этих методов приведено в Приложении 2.

3.4.1. *Методы бактериологического (культурального) исследования мочи*

Целью бактериологического анализа мочи является: выделение и идентификация возбудителя ИМП и определение его концентрации в образце мочи (степени бактериурии). Если сопоставление полученных результатов с данными анамнеза и клинического обследования пациента позволяет констатировать этиологическую значимость выделенного микроорганизма в заболевании, далее определяют его чувствительность к антимикробным препаратам.

Для выделения бактерий из мочи применяют универсальные, селективные и дифференциально-диагностические среды.

Универсальные питательные среды (кровяной агар, среда CLED) поддерживают рост как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Кровяной агар пригоден для культивирования как неприхотливых, так и прихотливых бактерий, но при высокой концентрации многие быстро растущие микроорганизмы дают на нем газонный рост, ингибируют формирование колоний других микроорганизмов и маскируя их. На среде CLED ингибируется феномен роения протеев и одновременно по изменению цвета среды можно судить о способности изолятов ферментировать лактозу. Колумбийский CNA агар предназначен для селективной изоляции грамположительных микроорганизмов. Из числа селективных сред для грамотрицательных бактерий чаще всего применяют среды МакКонки и Эндо, позволяющие проводить первичную дифференциацию выросших культур по способности ферментировать лактозу). Хромогенные среды облегчают и ускоряют идентификацию изолятов бактерий на основании выявления у них специфической ферментативной активности, обеспечивающей их специфическое окрашивание.

1. Титр бактерий в моче определяют на неселективных средах следующими методами:

А. Несекторный метод

- В чашку Петри с питательной средой вносят строго определенный объем исследуемого образца (таблица 1): пробы, полученные пункцией мочевого пузыря в объеме 10 или 100 мкл, взятые другими способами — в объеме 1 или 10 мкл. Процедуру осуществляют тарированной на определенный объем стерильной бактериологической петлей или полуавтоматическим микродозатором со сменными стерильными наконечниками. Перед посевом образцы хорошо перемешивают, но не центрифугируют;
- Распределяют материал по поверхности питательной среды несколькими вертикальными, а затем перпендикулярными им горизонтальными штрихами, отстоящими друг от друга на небольшое расстояние. В качестве альтернативы ее распределяют по поверхности среды шпателем Дригальского (вручную или в процессе вращения чашки Петри на платформе).

Б. Метод секторных посевов [11]

Метод стандартизирован для исследования объема мочи, равного 0,005 мл.

- Дно чашки Петри делят на 4 равные сектора, обозначаемые буквами А, Б, В и Г;
- Стерильной микробиологической петлей, тарированной на объем 0,005 мл, выполнить посев мочи 30-40 штрихами в секторе А;
- Прожечь петлю и провести 4 штриховых посева из сектора А в сектор Б, а затем аналогичным путем из сектора Б в сектор В и из сектора В в сектор Г.

2. Сделать посев тестируемого образца бактериологической петлей на селективные и дифференциально-диагностические среды для выделения и идентификации уропатогенов.

В. Полуколичественные штриховой метод

Осуществляется с помощью тест-системы «дипстрик» (методика посева мочи на эти устройства приведена в Приложении 1).

Инокулированные чашки Петри и тест-системы типа «дипстрик» инкубируют в условиях обычной атмосферы при 35-37 °С в течение 18-24 ч. В следующих случаях следует продлить инкубацию до 48 ч:

- образец мочи получен посредством надлобковой пункции;
- после суточной инкубации рост микроорганизмов проявляется настолько слабо, что невозможно оценить морфологию культур и выделить их в чистом виде;
- результат не соответствует информации, полученной при микроскопии мазков, клиническим данным и пр.;

- исследуемый образец получен от пациентов с тяжелыми нарушениями иммунной системы (например, у реципиентов трансплантированных органов);
- если необходимо исключить наличие в образце грибов.

После окончания инкубации посевов проводят учет результатов.

5. При обнаружении роста микроорганизмов учитывают морфологические типы и определяют их концентрацию в исследованной пробе.

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 1).

Таблица 1

Определение степени бактериурии несекторным методом

Объем высеянной 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

Определение титра бактерий в моче при ее посеве 4-секторным методом проводят согласно таблице 2.

Таблица 2

Определение степени бактериурии 4-секторным методом

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 сосчитать	20-30	-	-	500000
-"-	40-60	-	-	1 млн.
-"-	100-140	10-20	-	5 млн.
-"-	нельзя сосчитать	30-40	-	10 млн.
-"-				100 млн.

Определение титра бактерий в моче при ее посеве на тест-системы типа «дипстрик» 4-секторным методом проводят по шаблону плотности роста бактерий, приведенному в инструкциях по применению приспособлений (Приложение 1).

6. Оценивают этиологическое значение выросших микроорганизмов по установленной степени бактериурии (п. 3.4.2, таблица 3).

7. При установлении диагностически значимой степени бактериурии проводят идентификацию выделенных из мочи микроорганизмов по культуральным, биохимическим и тинкториальным свойствам, которые определяют ручными методами, коммерческими тест-системами, автоматическими микробиологическими анализаторами или масс-спектрометрическим анализом [13]. Минимальные идентификационные критерии для наиболее часто обнаруживаемых в моче бактерий приведены в Приложении 3.

7. Дальнейшую идентификацию проводят только для вероятных уропатогенов. С этой целью пользуются стандартными методами, внедренными в повседневную практику работы лабораторий, включающие: изучение культуральных, биохимических, тинкториальных и агглютинационных свойств в формате ручных методов, коммерческих панелей для визуального учета или для автоматических анализаторов. С этой целью можно применять масс-спектрометрический анализ белковых профилей выделенных культур при наличии соответствующей аппаратуры (MALDI-TOF, SELDI-TOF) [13]. Минимальные идентификационные критерии уропатогенов приведены в Приложении 3.

3.4.2. ***Интерпретация результатов бактериологического исследования мочи***

При интерпретации результатов бактериологического исследования мочи следует учитывать следующие критерии:

- наличие у пациента клинических проявлений ИМП;
- соблюдение стандартных процедур взятия, транспортировки и исследования (инокулированный объем, техника посева) проб мочи;
- результаты отдельных лабораторных исследований – количество выделенных бактерий (моно- или смешанная культура), их уропатогенность, их титр в моче.

ИМП могут протекать в форме моно- и смешанных инфекций, при которых из мочи выделяют 1 или 2 вида патогенных бактерий, соответственно. Если в посевах обнаруживают 3 и большее количество морфологически различающихся колоний бактерий, то это рассматривают как признак случайной контаминации исследуемой пробы: в таких случаях у пациента повторно берут пробу мочи для бактериологического анализа с максимально возможным соблюдением правил проведения всех его этапов , предотвращающих попадание в нее посторонней микрофлоры.

Патогенный потенциал выделенных культур бактерий оценивают в соответствии со следующей классификацией:

1. Первичные возбудители ИМП (группа I)*: E. coli* и *S. saprophyticus*, лептоспиры, сальмонеллы и микобактерии. Эти бактерии способны самостоятельно вызывать поражения органов мочевой системы. *E. coli* изолируют в большинстве случаев ИМП. Частота изоляции *S. saprophyticus* значительно ниже (<10 %), однако эта бактерия является основным возбудителем острого неосложненного сезонного цистита у женщин. Лептоспиры, сальмонеллы и микобактерии изолируют спорадически.
2. Вторичные возбудители ИМП (группа II): *Enterobacter spp., Klebsiella spp., P. mirabilis, P. aeruginosa, P. vulgaris, S. aureus, Citrobacter spp., Morganella spp., Serratia spp., C. urealyticum, Haemophilus spp.* и *S. pneumoniae*. Проявляют патогенные свойства преимущественно на фоне других инфекций, ослаблении иммунитета, после инвазивных диагностических и лечебных процедур. Частота изоляции в таких случаях первых 4 упомянутых бактерий варьирует от 1 до 10%, P. *vulgaris, S. aureus, Citrobacter spp., Morganella spp., Serratia spp*. не превышает 1%, *C. urealyticum, Haemophilus spp*. и *S. pneumoniae* — менее 0,1% (последние 2 группы бактерий поражают преимущественно детей).
3. Сомнительные возбудители ИМП (группа III): коагулазо-негативные стафилококки (за исключением *S. saprophyticus*), *S. agalactiae, Acinetobacter spp., Pseudomonas spp., Stenotrophomonas maltophilia*. Вызывают клинически значимые ИМП очень редко.

Помимо патогенных бактерий из мочи нередко выделяют *G. vaginalis*, α-стрептококки, лактобациллы, бифидобактерии и дифтероидные палочки, являющиеся компонентами нормальной микрофлоры уретры и половых органов — их изоляция из мочи не имеет диагностического значения.

Диагностически значимым титром патогенных бактерий в моче считают (таблица 3):

А. При исследовании 1 мкл проб, полученных при свободном мочеиспускании от пациентов с симптомами ИМП:

- для первичных патогенов (группа I) при изоляции их в моно- или смешанной культуре с еще одной бактерией — ≥ 10^3 КОЕ/мл;
- для вторичных патогенов (группа II) при изоляции их от мужчин и женщин в монокультуре — 10^3 и 10^4 КОЕ/мл, соответственно;
- для вторичных патогенов (группа II) при изоляции их в смешанной культуре с еще одной бактерией и сомнительных патогенов (группа III) — ≥ 10^5 КОЕ/мл.

Б. При исследовании 10 мкл проб, полученных при свободном мочеиспускании от пациентов с симптомами ИМП:

- для первичных патогенов (группа I) при изоляции монокультуры — ≥ 10^2 КОЕ/мл.

В. При исследовании 100 мкл проб, полученных надлобковой пункцией (независимо от того, выражены или отсутствуют у пациентов симптомы ИМП):

- для всех групп бактерий выделенных в моно- или смешанной (не более 2 видов) культуре — ≥ 10^1 КОЕ/мл.

Г. При исследовании 10 мкл проб, полученных цистоскопией или катетеризацией (независимо от того, выражены или отсутствуют у пациентов симптомы ИМП):

- для всех групп бактерий, выделенных в моно- или смешанной (не более 2 видов) культуре — ≥ 10^2 КОЕ/мл.

Д. При исследовании 1 мкл проб, полученных через постоянный катетер:

- для всех групп бактерий, выделенных в моно- или смешанной (не более 2 видов) культуре от пациентов с симптомами ИМП — ≥ 10^4 КОЕ/мл;
- для всех групп бактерий, выделенных в моно- или смешанной (не более 2 видов) культуре от пациентов без клинических проявлений ИМП — ≥ 10^5 КОЕ/мл.

Таблица 3

Интерпретация результатов бактериологического анализа мочи

Способ взятия мочи	**Наличие симптомов ИМТ***	**Тестированный V, мкл**	**Обнаружение патогенных бактерий**		**Диагностически значимый титр (КОЕ/мл)**
			группа	**кол-во видов**	
Сбор средней порции при	+	1	I II II	1-2 1 1	10^3 10^3 (мужчины) 10^4 (женщины)

свободном мочеиспускании			II III	2 1	10^5 10^5
	—	1	I-III	1	10^5
	+	10	I	1	10^2
Надлобковая пункция	±	100	I-III	1-2	10^1
Цистоскопия, катетеризация	±	10	I-III	1-2	10^2
Постоянный катетер	+	1	I-III	1-3	10^4
	—	1	I-III	1	10^5

3.4.3. Определение чувствительности выделенных возбудителей к антимикробным препаратам

Проводят в соответствии с действующими нормативными документами (МУК 4.2. 1890-04) [12].

4. РЕГИСТРАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА МОЧИ

Результаты бактериологического анализа мочи регистрируют в лаборатории в унифицированной форме бланка. Она должна содержать название лаборатории и медицинской организации; информацию о пациенте, достаточную для его идентификации; название биологического материала и всех исследуемых показателей; дату получения пробы и, если это необходимо, время получения; результаты исследования; референтные интервалы; фамилию и подпись сотрудника, выполнившего исследование. Порядок выдачи результатов определяется инструкцией, утвержденной руководителем медицинской организации. Все отказы от выполнения исследования мочи необходимо регистрировать (с указанием их причины).

5. ОБЕСПЕЧЕНИЕ КАЧЕСТВА БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА МОЧИ

5.1. Программы обеспечения качества

Программы обеспечения качества включают последовательный мониторинг каждого аспекта процедуры для гарантии получения достоверных и воспроизводимых результатов бактериологического анализа мочи. Такие программы должны включать все этапы работы и устанавливать связи между всеми составляющими процесса (пациент, лаборатория, клиницист). Проведение контроля качества лабораторных исследований, заключающегося в тестировании контрольных материалов (внутрилабораторный контроль качества и участие во внешней оценке), является только одним из аспектов обеспечения качества. Контроль необходим на этапах сбора, хранения, доставки и ручной обработки проб мочи, ведения регистрации, выдачи документов. Нуждается в контроле техническая компетентность персонала, непрерывное продолжение образования. Для успешного осуществления всех контрольных мероприятий необходимо следовать правилам, изложенным в стандарте ГОСТ Р ИСО 15189 —2006 «Медицинские лаборатории – частные требования к качеству и компетентности»[4]. В соответствии с требованиями этого стандарта в лаборатории составляется «Руководство по качеству», в котором должны быть отражены все мероприятия, обеспечивающие качественный бактериологический анализ мочи.

В бактериологических лабораториях определяют обоснованные критерии приема и отказа в приеме проб, требования по их регистрации, обработке маркировке и хранению до анализа. Аналитический этап проводят в соответствии с методиками исследований. На постаналитчиеском этапе необходимо разработать правила оценки приемлемости результатов анализа, включающие проверку их аналитической достоверности по данным внутрилабораторного контроля качества, оценку возможного влияния лекарственных препаратов, сравнения результатов с референтным интервалом, проверку правильности регистрации. Форму выдачи результатов утверждает руководство учреждения после согласования с лечебными отделениями.

5.2. Контроль качества бактериологических исследований

5.2.1. Контроль качества материалов и оборудования

Контроль качества материалов и оборудования должен охватывать:

- условия хранения и соблюдение сроков годности реактивов, диагностических полосок, питательных сред, приспособлений для бактериологического анализа мочи, что

предотвращает использование испорченных или просроченных средств и материалов, являясь важной составляющей обеспечения качества;

- наличие на рабочем месте инструкции по применению приспособлений и эксплуатации, необходимой для проведения исследований аппаратуры;
- наличие журналов регистрации сервисного обслуживания и ремонта оборудования.

5.2.2. Внутрилабораторный контроль качества бактериологического анализа мочи

Представляет собой систему повседневного слежения за точностью получаемых в лаборатории результатов. Контроль качества микроскопических исследований выполняют в день их проведения. Для контроля воспроизводимости результатов тестируют дубликаты тех же проб мочи.

5.2.2.. *Внешняя оценка качества*

Необходима для подтверждения правильности результатов лабораторных исследований и сопоставимости результатов, полученных в разных лабораториях. Все бактериологические лаборатории обязаны участвовать во внешней оценке качества. Специальными организациями, имеющими лицензию на проведение межлабораторной оценки качества выполнения лабораторных исследований, в т.ч. анализа мочи, между лабораториями периодически (несколько раз в год) распределяются контрольные образцы с установленным содержанием бактерий для контроля правильности проводимых анализов. Полученные результаты регистрируют и возвращают в лаборатории заключения для сравнительной оценки правильности выполнения исследований. В случае неудовлетворительной оценки результатов лаборатория должна принимать соответствующие меры для исправления ошибок.

5.3. Образование специалистов

Квалификация персонала должна соответствовать сложности выполняемых исследований. Весь персонал лаборатории должен периодически (раз в 5 лет) проходить обучение на циклах усовершенствования, проводимых медицинскими образовательными учреждениями, имеющими соответствующую лицензию. Специалистам следует регулярно заниматься самообразованием. В лаборатории должна быть доступна для пользования современная литература, в т.ч. справочники, периодические издания по лабораторной диагностике и атласы. Специалистам лаборатории необходимо участвовать в конференциях и семинарах.

Все этапы бактериологического анализа мочи должен выполнять только специально обученный персонал.

6. ТРЕБОВАНИЯ К РЕЖИМУ ТРУДА И ОТДЫХА, ДИЕТЕ И ОГРАНИЧЕНИЯМ ПРИ ПОДГОТОВКЕ ПАЦИЕНТА К СБОРУ МОЧИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА МОЧИ

На результаты бактериологического анализа мочи могут влиять прием пациентом лекарственных препаратов, соблюдение правил сбора мочи и ряд других факторов. Поэтому условия подготовки пациента к сбору проб мочи должны быть стандартизованы и подробно описаны в соответствующей инструкции для пациента.

7. ЗАТРАТЫ ТРУДА НА ВЫПОЛНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИИ «БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОЧИ»

Учитываются в соответствии с нормативами, утвержденными приказами Минздрава РФ от 19 января 1995 г. № 8 и от 25 декабря 1997 г. № 380.

==========

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Применение тест-систем типа «дипстрик» для бактериологического анализа мочи.

Эти устройства состоят из подложки, покрытой с обеих сторон 2-3 питательными средами. Подложки хранят, транспортируют и инкубируют в стерильном контейнере. В качестве питательных сред в них используют CLED, МакКонки, колумбийский CNA агар, Uriselect 3 или другую хромогенную среду. Их комбинация в одном приспособлении обеспечивает изоляцию и идентификацию находящихся в моче бактерий с одновременной полуколичественной оценкой их титра.

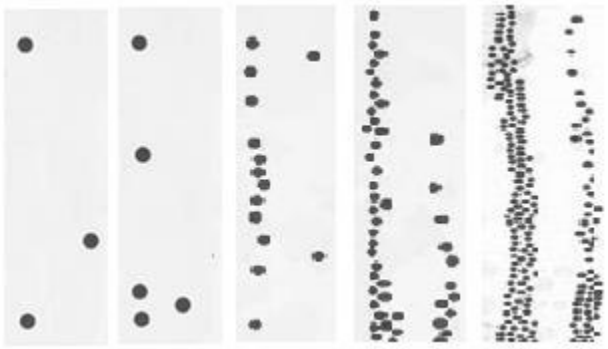
В «дипстрике» реализован штриховой полуавтоматический метод посева, осуществляемый приспособлением, которое состоит из кольца с 6 зубцами (по 3 с каждой стороны подложки). При погружении в мочу нижней части зубцов на каждом из них остается по 1,0…1,2 мкл мочи. Во время возвращения подложки в контейнер кольцо фиксируется на его горловине, обеспечивая дозированный штриховой посев. Транспортируют засеянный «дипстрик» с плотно закрученной крышкой, а перед постановкой на инкубацию в теромостат крышку поворачивают на ½ оборота для обеспечения аэробных условий культивирования.

Наиболее точные результаты получают при использовании этих приспособлений в месте отбора проб мочи и помещении в течение непродолжительного времени в термостат. При отсутствии такой возможности засеянные приспособления хранят и

транспортируют в лабораторию при комнатной температуре в течение срока, не превышающего 24 ч.

После инкубации в термостате оценивают количество колоний, выросших на средах CLED и/или МакКонки. Сопоставляя полученные данные с шаблонами плотности роста бактерий, поставляемых производителями приспособлений, определяют титр бактерий в исследованных пробах мочи.

Шаблон оценки плотности роста бактерий в «дипстрике» на средах CLED и МакКонки

Число колоний	≤3	4-10	11-20	21-50	50 и более
					
Титр бактерий (КОЕ/мл)	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6-10^7

При использовании приспособлений для бактериологического анализа мочи основные операции может выполнять технический персонал лаборатории или учреждения, в котором проводится сбор проб мочи пациентов. Окончательный учет результатов проводит в лаборатории врач-бактериолог.

Использование устройств с комбинацией хромогенной и универсальной или селективной сред ускоряет бактериологический анализ мочи и облегчает идентификацию выросших культур (табл. 4).

Таблица 4

Основные идентификационные признаки ряда бактерий в хромогенной среде Uriselect 3

Бактерии	**Морфология колоний**	**Выявляемые ферменты бактерий**		**Дополнительные тесты**	
		β-глюкуронидаза	β-глюкозидаза	Индол	Триптофан-дезаминаза

E. coli	Средней величины, плоские, розово-красные	+	—	+	—
*Группа KES**	Крупные, слизистые, бирюзово-голубые или синие с металлическим блеском	—	+	±	+
E. faecalis	Мелкие, бирюзовые	—	+	—	—
S. agalactiae	Мелкие, светло-голубые	—	+	—	—
p. aeruginosa	Мелкие, желто-зеленые с металлическим блеском	—	—	—	+
P. mirabilis, P. vulgaris	Крупные, оранжево-коричневые	—	—	—	+
Morganells spp., Providencia spp.	Крупные, оранжево-коричневые	—	—	+	+
P. stuartii	Крупные, оранжево-коричневые	—	+	±	—
Staphylococcus spp.	Средней величины и крупные, белые	—	—	—	—

Примечание. *Группа KES — бактерии родов *Klebsiella*, *Enterobacter и Serratia*.

Для идентификации бактерий по комплексу биохимических признаков применяют карточные и планшетные наборы реагентов. Учет результатов таких тестов проводят визуально или с помощью автоматических анализаторов и специальных компьютерных программ.

Приложение 2. МЕТОДЫ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ ОЦЕНКИ НАЛИЧИЯ БАКТЕРИЙ В МОЧЕ

1. Микроскопические методы исследования мочи

Микроскопия мазка, окрашенного по Граму:

1. Нанести на предметное стекло 10 мкл хорошо перемешанной, но нецентрифугированной мочи. Обвести место расположения капли маркером и высушить на воздухе.
2. Окрасить препарат по Граму стандартным методом.
3. Микроскопировать препарат при увеличении ×1000.

Учет результатов: 1 бактериальная клетка соответствует концентрации бактерий в моче, равной 10^5 клеток/мл .

Слайд-планшетный центрифужный метод

Наиболее надежный метод предварительной оценки степени бактериурии: его чувствительность и специфичность при концентрации бактерий в моче 10^8 КОЕ/мл составляют 98 и 90 %, а при концентрации 10^6 КОЕ/мл — 63 и 91 %, соответственно. Использование слайд-планшетов вместо предметных и покровных стекол создает более стандартизованные условия для микроскопии.

Порядок проведения

1. Вносят в ячейки слайд-планшеты хорошо перемешанные пробы мочи в объеме 200 мкл.
2. Центрифугируют слайд-планшету при 200 g в течение 5 мин.
3. Удаляют надосадочную жидкость из ячеек.
4. Окрашивают осадок в ячейках по Граму.
5. Вносят в ячейки иммерсионное масло и подсчитывают число бактерий в 12 полях зрения (в соответствии с приведенной ниже схемой).
6. Определяют концентрацию бактерий в моче умножением полученного числа на коэффициент 5.

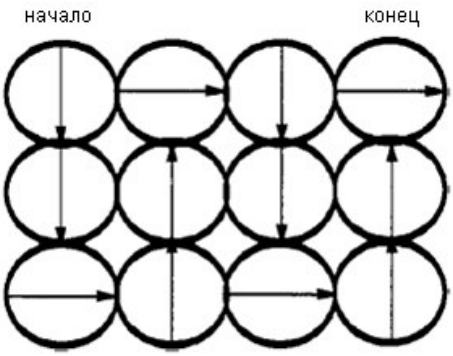


Схема микрокопирования предметного стекла в 12 полях зрения

2. ***Методы обнаружения продуктов метаболизма бактерий***

Обнаружение в моче продуктов метаболизма бактерий служит косвенным подтверждением наличия у пациента бактериурии, но не дает оснований для постановки окончательного диагноза. Чаще других применяют нитритный тест и тест с хлористым трифенилтетразолием.

Метод обнаружения нитритов

Нитриты являются продуктами метаболизма многих энтеробактерий. Однако, часть грамотрицательных бактерий (например, энтерококки и псевдомонады) и грамположительные бактерии (стрептококки и др.) такой способностью не обладают, что ограничивает информативность теста. Кроме того, он может давать ложнонегативные результаты на фоне голодания, при отсутствии в рационе овощей, кратковременного пребывания мочи в мочевом пузыре до взятия ее проб для анализа, приеме пациентом витамина С и в случаях инфекций грамположительных бактерий. Ложноположительные результаты дают окрашенные, а также длительно хранившиеся в теплом месте пробы мочи.

Для получения достоверных результатов используют либо утреннюю порцию мочи, либо пробу, собранную после 4-часового перерыва. За 3 дня до анализа необходимо отменить антимикробные препараты и аскорбиновую кислоту.

Чувствительность теста соответствует содержанию в моче около 10^5 бактерий/мл, т.е. детектируемый уровень нитритов составляет 0,8 мг/л.

Для проведения теста готовят реактив Грисса из двух растворов:

- 1,25 г сульфаниловой кислоты растворяют в 500 мл 30%-й уксусной кислоты;
- 2,5 г альфа-нафтиламина растворяют в 500 мл 30%-й уксусной кислоты.

Растворы хранят в защищенном от света месте и перед проведением теста смешивают в равных количествах. 1 мл полученного реактива добавляют к 1 мл мочи.

Эффективность метода может быть значительно повышена добавлением в мочу нитратов с последующей инкубацией при 37 °С в течение 2…4 ч перед постановкой пробы.
Оценка результатов. Розовое окрашивание реакционной смеси или индикаторной тест-полоски свидетельствует о присутствии в моче не менее 10 бактерий/мл. Отсутствие изменения окраски реакционной смеси при однократном тестировании не исключает наличия инфекции из-за колебания содержания нитритов в моче. В этих случаях необходим повторный анализ.

ТТХ-тест

Аналитическая чувствительность теста составляет 10 бактерий/мл. Он основан на том, что хлористый трифенилтетразолий (ТТХ) является окислительно-восстановительным индикатором. Под воздействием дегидрогеназ, образующихся в процессе жизнедеятельности бактерий, он восстанавливается из бесцветного вещества в красное.
Перед постановкой теста готовят 3 раствора:

- насыщенный раствор двузамещенного фосфорнокислого натрия (срок хранения до 1 мес);
- 750 мг ТТХ растворяют в 100 мл раствора 1 (срок хранения до 2 мес);
- рабочий раствор: смешивают 4 мл раствора 1 со 100 мл раствора 2 (срок хранения не более 2 нед);

Тест проводят в стерильной посуде в следующем порядке. К 2 мл мочи прибавляют 0,5 мл рабочего раствора и инкубируют в термостате (при 37°С в течение 4 ч).

Появление на дне пробирки красного осадка свидетельствует о наличии в моче не менее 10 бактерий/мл.

Приложение 3. МИНИМАЛЬНЫЕ ИДЕНТИФИКАЦИОННЫЕ ПРИЗНАКИ БАКТЕРИЙ, НАИБОЛЕЕ ЧАСТО ОБНАРУЖИВАЕМЫХ В МОЧЕ

Для идентификации грамположительных и грамотрицательных бактерий, наиболее часто изолируемых из мочи людей, пользуются приведенными ниже идентификационными критериями. Их следует считать «минимальными», поскольку они являются основными, но не абсолютными: из-за вариабельности свойств для окончательной идентификации изолятов ряда видов бактерий требуются дополнительные тесты (биохимические, иммунологические и др.).

Грамположительные бактерии

1. Стафилококки

Грамположительные каталазопозитивные кокки, формирующие в мазках грозди.

1.1. *S. saprophyticus*

- культуральные свойства: на CLED формирует желтые колонии, на кровяном агаре — колонии цвета слоновой кости;
- наличие каталазы;
- отсутствие ДНК-азы;
- отсутствие коагулазы (тест проводят в пробирках с плазмой крови кролика в случаях, когда получены сомнительные результаты ДНК-азной пробы);
- резистентность к новобиоцину (при использовании дисков с 5 мг антибиотика зона задержки роста не превышает 16 мм).

1.2. *S. aureus*

- культуральные свойства: на CLED и кровяном агаре формирует желтые, крупные колонии (менее вариабельные по размеру, чем у коагалазонегативных стафилококков);
- наличие коагулазы;
- наличие ДНК-азы;
- положительная реакция агглютинации со специфической антисывороткой (дополнительный тест).

1.3. *Другие коагулазонегативные стафилококки*:

- морфология колоний: на CLED и кровяном агаре белые или желтые;
- несоответствие идентификационным критериям *S. saprophyticus* и *S. aureus*.

2. Стрептококки

Грамположительные, каталозонегативные кокки, формирующие в мазках цепочки.

2.1. *Энтерококки*

- морфология колоний: на кровяном агаре — серовато-белые без признаков гемолиза, с α- или β-гемолизом, на CLED — желтоватые;
- способность расти в средах с высоким (≥ 6,5%) содержанием NaCl;
- *E. faecium* в отличие от *E. faecalis* ферментирует арабинозу;
- пониженная чувствительность к цефалоспоринам.

2.2. *S. agalactiae*

- морфология колоний: на кровяном агаре — голубые или серовато-белые колонии, окруженные узкой зоной β-гемолиза, иногда вызывающие α-гемолиз или негемолитические; на CLED — мелкие, бесцветные колонии, иногда становящиеся заметными через 48 ч после посева;

- положительная реакция агглютинации со специфической антисывороткой к стрептококкам группы B или положительный CAMP-тест;
- чувствительность к цефалоспоринам

2.3. Другие β-гемолитические стрептококки

- морфология колоний: на кровяном агаре — β-гемолиз, на CLED плохо растут;
- положительная реакция агглютинации со специфическими антисыворотками к соответствующим группам стрептококков

2.4. α-стрептококки

- морфология колоний: на кровяном агаре — α-гемолиз, на CLED не растут или формируют мелкие колонии;
- зона задержки роста оптохином не превышает 14 мм.

3. *Lactobacillus spp*.

Грамположительные, каталазонегативные палочки с типичной морфологией

- морфология колоний: на кровяном агаре — α-гемолиз, на CLED не растут или формируют мелкие колонии, иногда ферментирующие лактозу (пожелтение среды);
- отсутствие каталазы.

4. *Bacillus spp.*

- культуральные свойства: на кровяном агаре формируют крупные сухие гемолитические колонии, сходные с колониями энтеробактерий и псевдомонад;
- морфология бактерий: крупные грамположительные палочки правильной формы, иногда содержат споры;
- наличие каталазы;
- наличие/отсутствие оксидазы.

5. *Corynebacterium urealyticum*

- культуральные свойства: на кровяном агаре растут медленно, формируя мелкие блестящие колонии;
- наличие каталазы;
- наличие уреазы;
- резистентны ко многим антимикробным препаратам.

6. «Дифтероидные» палочки

- культуральные свойства: на CLED растут плохо;
- морфология бактерий: часто конические, в мазках образуют скопления в форме буквы V или частокола;

- наличие каталазы.

Перечисленные критерии не исключают, что отвечающий им изолят не является листерией.

Грамотрицательные бактерии

1. Энтеробактерии

Грамотрицательные, оксидазонегативные палочки, ферментирующие глюкозу, растущие на среде МакКонки.

А. Энтеробактерии, ферментирующие лактозу (в средах CLED или МакКонки)

- индольный тест на кровяном агаре: положительный результат дает E. coli, отрицательный — другие энтеробактерии;
- наличие β-глюкуронидазы (определяют биохимическими тестами или в хромогенных средах типа Uriselect) подтверждает принадлежность изолята к *E. coli*;
- для дифференциации неэшерихиозных энтеробактерий проводят тест Фогес-Проскауера: положительный результат дают бактерии родов *Klebsiella* и *Enterobacter*, отрицательный — другие энтеробактерии;

Б. Энтеробактерии, не ферментирующие лактозу (в средах CLED или МакКонки)

- при наличие феномена роения на кровяном агаре проводят только индольный тест: положительный результат дает *Proteus vulgaris*, отрицательный — *Proteus mirabilis*;
- при отсутствии феномена роения на кровяном агаре проводят тесты Фогес-Проскауера, ONPG и индольный:

✓ изоляты, давшие отрицательный результат в тесте Фогес-Проскауера и положительный - в индольном тесте и ONPG, идентифицируют как *E. coli* (дополнительным подтверждением этого служит наличие β-глюкуронидазы);

✓ изоляты, давшие отрицательный результат в тестах Фогес-Проскауера и ONPG, идентифицируют на основании дополнительных биохимических исследований.

2. Неферментирующие глюкозу грамотрицательные палочки

- культуральные свойства: хороший рост на агаре МакКонки;
- наличие оксидазы, отсутствие способности ферментировать глюкозу.

Идентифицируют до рода/вида только изоляты *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia u Acinetobater*. Остальные изоляты данной группы обозначают как «грамотрицательные палочки, не относящиеся к сем. *Enterobacteriaceae»*.

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

- культуральные свойства: способна расти при 42°С, колонии и среда окрашиваются в зелено-синий цвет и издают характерный запах (земляники, жасмина), часто проявляет феномен радужного лизиса;
- наличие оксидазы;
- наличие аргинин-дигидролазы;
- отсутствие лизин-декарбоксилазы (тест проводят с положительным и отрицательным контролями).

2.2. *Stenotrophomonas (Pseudomonas) maltophilia*

- особенности роста на питательных средах: колонии формируются в течение 2 дней, при росте на кровяном агаре издают запах аммиака;
- отсутствие оксидазы;
- наличие ДНК-азы;

2.3. *Acinetobacter spp.*

- культуральные свойства: формируют выпуклые, круглые, гладкие, слизистые, полупрозрачные или мутные, непигментированные колонии; на кровяном агаре через 48 ч после посева может проявляться гемолиз;
- морфология бактерий: кокковидные палочки.
- отсутствие оксидазы;
- отсутствие ДНК-азы.

Литература

1. Naber K. G, Scaeffer A. J., Heyns C. F., Matsumoto T., Shoskes D. A. Bjerklund Johansen T. E. Urogenital Infection. European Association of Urology Ed. 2010.
2. СП 1.3.2322-08 Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила.
3. ГОСТ Р 52905–2007 (НСО 15190:2003). Требования безопасности.
4. СанПиН 2.1.7.2790-10 Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами.
5. Федеральный закон Mb 99-ФЗ от 04.05.2011 О лицензировании отдельных видов деятельности.
6. МУ 4.2.2039-05 Техника сбора и транспортировки биоматериалов в микробиологические лаборатории.

7. ГОСТ Р 53079.4-2008. Технологии лабораторные медицинские. Обеспечение качества клинических лабораторных исследовании. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа.
8. Методики клинических лабораторных исследовании: Справочное пособие. Том 3. Клиническая микробиология. Бактериологические исследования. Микологические исследования. Паразитологические исследования. Инфекционная иммунодиагностика. Молекулярные исследования в диагностике инфекционных заболеваний / Под ред. В. В. Меньшикова. М.: Лабора. 2009.
9. Clinical Microbiology Procedure Handbook. 3»’ ed. /editor in chief, third edition and 2007 update. Lynne S. Garcia. ASM Press. Washington. DC. 2010.
10. Набер К., Бишоп М., Бперклунд-Иохансеи Т. и соавт. Рекомендации по ведению больных с инфекциями почек, мочевых путей и мужских половых органов. Смоленск. 2008.
11. Приказ Минздрава СССР от 22.04.1985 от 535 Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений.
12. МУК 4.2.189004. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам.
13. ООО Лаборатория «Литех» «Идентификация микроорганизмов с помощью MALDI TOF масс спектрометрии». Новая медицинская технология. Москва. 2011.
14. ГОСТ Р ИСО 15189-2006. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
15. Инструкция по мерам профилактики распространения инфекционных заболеваний при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. М., 1991.