

УДК 579.843.94.083.18

Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae**

В методических рекомендациях приведены общие сведения об одном из основных возбудителей внебольничных бактериальных инфекций – *Haemophilus influenzae* (гемофильной палочке). Подробно обсуждаются забор клиниче-

ского материала, селективные и неселективные питательные среды для выделения, морфологические и фенотипические подходы к идентификации. Рассмотрены преимущества и недостатки различных методов определения чувствительности

Haemophilus influenzae к современным антимикробным препаратам, приведены критерии интерпретации полученных результатов на основе международных рекомендаций (NCCLS).

Для врачей-микробиологов, эпидемиологов, лаборантов.

Isolation, identification and antimicrobial susceptibility testing of *Haemophilus influenzae**

These guidelines are focused on the one of the most frequent bacterial pathogen causing community-acquired infections – *Haemophilus influenzae*. Collection of clinical specimens, selective and non-selective

media for isolation, morphological and phenotypic approaches to identification are described in details. Advantages and disadvantages of different susceptibility testing methods are highlighted. Criteria for interpretation of

results based on international guidelines (NCCLS) are presented.

These guidelines are designed for microbiologists, epidemiologists, and laboratory assistants.

Род *Haemophilus*

Род *Haemophilus* относится к семейству *Pasteurellaceae*, которое также включает роды *Pasteurella* и *Actinobacillus*. Гемофилы представляют собой мелкие (1×0,3 мкм) полиморфные неподвижные неспорообразующие грам(-) палочки. Они являются факультативными анаэробами. Их культивирование требует наличия в питательных средах X и/или V факторов роста.

X фактор представляет собой группу термостабильных тетра-

пиррольных соединений, входящих в состав железосодержащих пигментов (например, гемин, гематин). Виды, нуждающиеся в X факторе, не способны синтезировать протопорфирин из δ-аминолевулиновой кислоты, что используется в качестве одного из идентификационных тестов.

Большинство видов гемофил также нуждается в термолабильном V факторе – *никотинамидадениндинуклеотиде* (НАД, кофермент I) или *никотинамидадениндинуклеотидфосфа-*

те (НАДФ, кофермент II), который участвует в окислительно-восстановительных реакциях.

X и V факторы присутствуют в крови (отсюда название рода *Haemophilus* – “любящие кровь”). Однако в нативной бараньей и человеческой крови находятся ферменты (НАДазы), разрушающие V фактор. Поэтому V-зависимые виды гемофил плохо или совсем не растут на *кровяном агаре* (КА), приготовленном на основе бараньей или человеческой крови.

Авторский коллектив:

Т.М. Богданович, О.У. Стецюк, О.И. Кречикова (*НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии*), Л.Г. Боронина (*Уральская государственная медицинская академия*), Л.К. Катосова (*Научный центр здоровья детей РАМН*), М.Е. Фаустова (*Институт пульмонологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. И.П. Павлова*).

Под редакцией Л.С. Страчунского (*НИИ антимикробной терапии Смоленской государственной медицинской академии*)

*Рекомендованы Межрегиональной ассоциацией по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ), Научно-исследовательским институтом антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии.

Таблица 1. Виды рода *Haemophilus*, выделенные у человека и животных

Выделенные виды	
у человека	у животных
<i>H. influenzae</i>	<i>H. parasuis</i> (свиньи)
<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. paragallinarum</i> (домашние птицы)
<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. paracuniculus</i> (кролики)
<i>H. parahaemolyticus</i>	<i>H. haemoglobinophilus</i> (собаки)
<i>H. aphrophilus</i>	<i>H. felis</i> (кошки)
<i>H. paraphrophilus</i>	
<i>H. paraphrohaemolyticus</i>	
<i>H. segnis</i>	
<i>H. ducreyi</i>	

Потребность бактерий в X и V факторах является важным критерием для внутривидовой идентификации *Haemophilus* spp. К настоящему времени известно 9 видов гемофил, вызывающих инфекций у человека (табл. 1) [1].

Основным возбудителем заболеваний у человека является *H. influenzae* – гемофильная палочка. Некоторые штаммы *H. influenzae* имеют полисахаридную капсулу и могут быть подразделены на 6 серовариантов в зависимости от антигенных свойств капсулы: a, b, c, d, e, f [2].

Наличие капсулы имеет большое клиническое значение, так как она является основным фактором вирулентности. Большинство инвазивных инфекций вызывается штаммами *H. influenzae* типа b (Hib). Капсула Hib состоит из полирибозилрибитолфосфата (ПРФ), то есть содержит в качестве мономера пентозу (рибозу) в отличие от других типов, содержащих гексозу, что, вероятно, и определяет более высокую вирулентность. Бескапсульные штаммы обозначаются как нетипируемые.

Клиническое значение и эпидемиология инфекций, вызываемых *Haemophilus influenzae*

H. influenzae впервые была идентифицирована как патоген

Р. Кохом (R. Koch) в 1883 г., который описывал грамтрицательные мелкие палочки в гное от больных конъюнктивитом. В 1892 г. Р. Пфейффер (R. Pfeiffer) выделил *H. influenzae* в чистых культурах из мокроты больных гриппом (influenza). Несмотря на то, что позднее была установлена вирусная этиология гриппа, за бактериями сохранилось первоначальное видовое название.

H. influenzae является патогеном исключительно человека. Инфицирование происходит воздушно-капельным путем или при контакте с контаминированным материалом. Гемофильные палочки, преимущественно нетипируемые штаммы, часто входят в состав нормальной микрофлоры слизистых оболочек верхних дыхательных путей (ВДП) у здоровых взрослых и детей.

Частота назофарингеального носительства у взрослых варьирует в широких пределах, достигая в некоторых случаях 75% [3]. В США до внедрения конъюгированной вакцины штаммы Hib обнаруживались в носоглотке 3–5% детей. В России частота носительства Hib у детей составляет не более 5%, а нетипируемые формы колонизируют ротоглотку здоровых детей с частотой 35–78% в зависимости от возраста (Катосова Л.К.). Длительное изучение носительства у взрос-

лых здоровых жителей г. Санкт-Петербурга показало, что частота носительства не превышала 10%, увеличивалась только в периоды эпидемий гриппа до 30–40% (Фаустова М.Е.). Нетипируемые штаммы *H. influenzae* часто колонизируют нижние дыхательные пути (НДП) у пациентов, страдающих хроническими obstructивными заболеваниями легких и муковисцидозом.

Колонизация слизистых оболочек нетипируемыми штаммами представляет динамический процесс, в котором “новые” штаммы периодически замещают “старые” [4]. Дети, у которых обнаруживаются нетипируемые штаммы *H. influenzae* на первом году жизни, имеют более высокий риск развития острого среднего отита. Существует прямая связь между колонизацией нетипируемыми штаммами и числом эпизодов среднего отита [5].

H. influenzae вызывают большое количество различных инфекций, в том числе угрожающих жизни пациентов. В целом все инфекции, обусловленные гемофильной палочкой, можно подразделить на 2 типа: инвазивные и неинвазивные (табл. 2) [3].

Неинвазивные инфекции возникают в процессе распространения микроорганизмов по слизистой оболочке дыхательных путей. Острый синусит, острый средний отит и обострение хронического бронхита, как правило, являются осложнениями вирусных инфекций, которые снижают местный иммунитет и нарушают мукоцилиарный клиренс.

Большинство неинвазивных инфекций вызывается нетипируемыми штаммами, для которых наличие протеина P2 наружной мембраны является основным фактором вирулентности. В патогенезе пневмонии важную роль играют протеаза, разрушающая IgA1, и цилиотоксин [3].

Таблица 2. Инфекционные болезни, вызываемые *H. influenzae*

Инфекции	Возрастная группа	Штамм
Инвазивные:	90% – дети до 4 лет;	90% – тип b
менингит	10% – дети старшего возраста и взрослые	10% – нетипируемые
эпиглоттит		1% – типы e и f
пневмония		
септический артрит		
остеомиелит		
целлюлит		
бактериемия		
Сепсис	Новорожденные, рожицы	> 90% – нетипируемые
Неинвазивные:	Дети и взрослые	>90% – нетипируемые
средний отит		
синусит		
конъюнктивит		
обострение хронического бронхита		

Инвазивные инфекции, особенно менингит и эпиглоттит, преимущественно вызываются штаммами *Hib* и имеют гематогенное происхождение. Капсула типа b, состоящая из ПРФ, является наиболее важным фактором вирулентности, так как защищает микроорганизм от фагоцитоза, опсонизации и комплементопосредованного лизиса. Низкая частота развития инвазивных инфекций у детей первых двух месяцев жизни обусловлена наличием материнских антител к ПРФ. С ростом популяции людей, обладающих антителами к ПРФ, уменьшается и частота инвазивных инфекций [6].

Для предотвращения тяжелых, угрожающих жизни инфекций, вызываемых штаммами *Hib*, разработаны конъюгированные вакцины, отличающиеся высокой безопасностью и иммуногенностью, в том числе у детей младше 18 мес.

В настоящее время конъюгированная *Hib* вакцина внесена в календарь прививок детей в США, Великобритании, Финляндии и других странах. [7]. Обсуждается возможность включения вакцинации против *Hib* в

расширенную программу иммунизации ВОЗ.

Учитывая высокую медико-социальную значимость инфекций, обусловленных *H. influenzae*, чрезвычайно важно обеспечить ее своевременную и качественную микробиологическую диагностику.

Клинический материал

Для подтверждения этиологии заболевания и определения чувствительности выделенного возбудителя к антимикробным препаратам обязательным является микробиологическое исследование.

В связи с тем, что гемофильная палочка вызывает широкий спектр инфекций, для микробиологического исследования может направляться различный клинический материал. Наибольшую диагностическую ценность представляют исследования стерильных в норме биологических жидкостей: крови, плевральной, перикардальной, синовиальной и спинномозговой жидкости (СМЖ).

Основным условием для доказательств этиологической роли *H. influenzae* в развитии ин-

фекции НДП является предупреждение контаминации клинического материала микрофлорой ВДП. Для этого желательно использовать методики, позволяющие избежать контакта с микрофлорой ВДП (бронхоальвеолярный лаваж, бронхоскопия с “защитными” щетками).

Забор материала у пациентов с эпиглоттитом (мазок с надгортанника) имеет ограниченную диагностическую значимость и может представлять большую угрозу для жизни пациента (риск развития ларингоспазма). Поэтому это исследование должно проводиться только при наличии условий для оказания экстренной помощи по сохранению проходимости дыхательных путей.

Нецелесообразно микробиологическое исследование назофарингеальных мазков. Даже положительные культуры имеют сомнительную диагностическую ценность в связи с высокой частотой носительства гемофильной палочки здоровыми детьми и взрослыми.

В связи с тем, что гемофильная палочка отличается низкой жизнеспособностью во внешней среде, рекомендуется использовать транспортные среды и немедленно (не позднее 2 ч) доставлять материал в клиническую лабораторию.

Питательные среды и условия инкубации при первичном выделении *Haemophilus influenzae*

H. influenzae отличается высокой прихотливостью при культивировании на искусственных питательных средах. Обязательным условием для их роста является наличие в среде X и V факторов.

На КА, приготовленном на основе лошадиной или кроличьей крови, гемофильные палочки могут расти в виде мельчайших точечных колоний. Исключение со-

ставляет КА, содержащий нативные бараньи или человеческие эритроциты, в связи с присутствием в них ферментов, инактивирующих V фактор. Поэтому КА не подходит для выделения *H. influenzae*.

Для улучшения выделения *H. influenzae* из клинического материала рекомендуется использовать шоколадный агар или селективный агар для гемофил.

Шоколадный агар (см. также приложение 1.1.) готовится добавлением крови к обогащенной агаровой основе, имеющей температуру около 80°C, для того чтобы разрушить эритроциты и высвободить X и V факторы. При этом следует избегать чрезмерного и/или длительного нагревания для предупреждения инактивации термолабильного V фактора. Для улучшения ростовых свойств питательной среды рекомендуется в охлажденный до температуры 45–50°C шоколадный агар добавлять НАД до получения конечной концентрации 15 мкг/мл (см. приложение 4.1.).

Коммерческие готовые чашки с шоколадным агаром (bioMerieux, BBL) обычно содержат смесь гемина (X фактор) и “коктейль” ростовых факторов, добавленных к основе – гонококковому агару [1, 8].

Гонококковый агар содержит пептон, кукурузный крахмал, моно- и диосновные фосфатные буферы, хлорид натрия и агар. Ростовые факторы включают НАД (V фактор), витамины (B₁, B₁₂), цистеин, глютамин и глюкозу.

Ряд компаний предлагает готовые добавки, содержащие перечисленные ростовые факторы: PolyVitex (bioMerieux), IsoVitalex (BBL) и Supplement B (Difco Laboratories).

Недостатком шоколадного агара является невозможность наблюдать гемолитические свой-

ства гемофил, которые позволяют дифференцировать *H. haemolyticus* и *H. parahaemolyticus* от *H. influenzae* и *H. parainfluenzae*.

Селективный агар для выделения бактерий рода *Haemophilus*. Для селективного выделения гемофил из клинического материала НДП могут быть использованы питательные среды, содержащие бацитрацин. Высокая концентрация этого антибиотика подавляет рост большинства других микроорганизмов, являющихся представителями микрофлоры дыхательных путей (стафилококков, микрококков и стрептококков), что позволяет получить рост гемофильной палочки из сильно контаминированного клинического материала. Помимо готовых коммерческих сред, содержащих антибиотик, в клинических лабораториях возможно приготовление и использование шоколадного агара с бацитрацином в концентрации 300 мкг/мл [1, 8].

Вместо содержащих антибиотик сред при выделении гемофильной палочки из контаминированного материала (например, мокроты) могут быть использованы коммерческие диски с бацитрацином (10 ЕД). Природно устойчивые к бацитрацину гемофилы будут расти вокруг диска.

Предложена селективная среда для выделения и дифференцирования *H. influenzae* и *H. parainfluenzae* (Taylor D.C. и др.). Она состоит из гемин- и НАД-обогащенного сердечно-мозгового агара, сахарозы (10 мг/мл), индикатора – фенолового красного (100 мкг/мл) и бацитрацина (300 мкг/мл). На этой среде колонии *H. parainfluenzae* имеют желтую окраску в связи с их способностью продуцировать кислоту из сахарозы, а колонии *H. influenzae* – бесцветные, так как не ферментируют сахарозу. Недостаток данной среды состоит в

невозможности наблюдать гемолитические свойства гемофил.

Условия инкубации *H. influenzae*. Оптимальными условиями инкубации *H. influenzae* являются влажная атмосфера с повышенным содержанием CO₂ (5–10%) и температура 35–37°C. Подобные условия могут быть созданы в CO₂-термостате или при инкубации чашек в эксикаторе с зажженной свечой. В результате горения свечи уменьшается концентрация кислорода и повышается уровень CO₂, достигая 3%.

Выделение *Haemophilus influenzae* из клинического материала

Окраска клинического материала по Граму и метиленовым синим. Предварительный диагноз инфекции, вызванной *H. influenzae*, может быть сделан на основе исследования мазка клинического материала, окрашенного по Граму и/или метиленовым синим.

При окраске по Граму бактерии рода *Haemophilus* выглядят как мелкие, бледно окрашенные грам(–) палочки, иногда формирующие тонкие филаменты. Небольшие размеры, клеточный полиморфизм и недостаточное прокрашивание сафранином могут существенно затруднять обнаружение гемофильной палочки. Поэтому некоторые авторы предлагают наряду с окраской по Граму проводить окраску метиленовым синим. В этом случае микроорганизмы имеют синий цвет на серо-голубом фоне.

Отрицательные результаты микроскопии не исключают возможности гемофильной инфекции, так как в клиническом материале может присутствовать недостаточное количество микроорганизмов (разрешающая способность световой микроскопии составляет 10⁴–10⁵ бак-

териальных клеток в 1 мл). Поэтому обязательно культуральное бактериологическое исследование.

Обнаружение капсульного антигена Н1b. Для быстрой диагностики инфекций, вызванных *H. influenzae* типа b, разработаны иммунологические методики обнаружения капсульного антигена в СМЖ, крови, плевральной жидкости и моче: латекс-агглютинация (ЛА), коагглютинация со стафилококковым протеином А (КОА), встречный иммуоэлектрофорез (ВИЭФ) и иммуоферментный анализ (ИФА) [1, 8].

Наибольшее распространение получили ЛА и КОА с образцами СМЖ. Антитела (IgG) против капсульного антигена Н1b наносят на частицы латекса (ЛА) или на стафилококковые клетки (КОА) в качестве "носителя". При взаимодействии антигена, содержащегося в клиническом материале, со специфическими антителами менее чем через 10 мин образуются видимые хлопья.

Коммерческие ЛА наборы, доступные в нашей стране, включают: Slidex Meningite *H. influenzae* b и Slidex meningite-Kit 5 (bioMerieux), Directigen *H. influenzae* type b Test Kit и Directigen Meningitis Combo Test Kit (BBL) и Pastorex (Meningitis) (Sanofi Diagnostics Pasteur).

Тесты проводятся в соответствии с рекомендациями изготовителей с обязательным использованием положительных и отрицательных контролей. Необходимо помнить, что тесты могут быть ложноположительными, если ребенок был недавно привит Н1b вакциной (в течение 21 дня после иммунизации). Кроме того, могут наблюдаться неспецифические ложноположительные результаты при некоторых заболеваниях, не связанных с гемофильной палочкой.

Разрабатываются другие экс-

пресс-тесты для обнаружения *H. influenzae* (как типа b, так и нетипируемых) в клиническом материале (с помощью моноклональных антител, конъюгированных с иммунопероксидазой, радиоактивно меченые ДНК-пробы и др.).

Однако ни одно из перечисленных исследований не может заменить культуральное исследование, которое остается "золотым стандартом" микробиологической диагностики.

Исследование спинномозговой жидкости. При поступлении образца СМЖ необходимо безотлагательно начать исследование или хранить материал в термостате при температуре 35–37°C или в крайнем случае при комнатной температуре не более 30 мин. Образцы СМЖ не должны помещаться в холодильник!

Длительное хранение образцов может привести к гибели бактерий и ложноотрицательным результатам (за исключением теста на определение антигенов!).

Для увеличения концентрации микроорганизмов рекомендуется центрифугировать СМЖ (не менее 1 мл образца клинического материала 5–15 мин при 1500–3000 об/мин). Надосадочную жидкость следует асептически перенести в стерильную пробирку, после чего тщательно перемешать полученный осадок с помощью многократного пипетирования.

Исследование СМЖ включает следующие диагностические тесты:

1) окраску отцентрифугированного осадка по Граму и/или метиленовым синим. Для этого на поверхность стерильного предметного стекла наносится капля осадка, после высыхания которой добавляется вторая капля, что позволяет увеличить количество бактериальных клеток в мазке. Не следует распределять

осадок по большой поверхности, так как это уменьшает вероятность обнаружения микроорганизмов, находящихся в материале в небольшом количестве;

2) определение антигена Н1b в надосадочной жидкости. Некоторые авторы считают, что определение антигенов является более чувствительным тестом, чем культуральное исследование у пациентов, получавших антибиотиков до забора СМЖ;

3) бактериологическое исследование осадка. Проводится посев нескольких капель осадка СМЖ на поверхность чашек с шоколадным и кровяным агаром, а также в двухфазную или жидкую среду. Чашки инкубируют при температуре 35–37°C в атмосфере с 5–10% CO₂.

Другие биологические жидкости (синовиальная, перикардальная, плевральная) должны окрашиваться по Граму и исследоваться культурально.

Исследование крови. Образцы крови, помещенные во флаконы с двухфазной или жидкой средой, инкубируют в течение 18–24ч при температуре 35–37°C. Из-за слабого роста гемофильной палочки в жидкой среде может отсутствовать выраженное помутнение среды. Поэтому рекомендуется проводить "слепое" субкультивирование или приготовление и окрашивание мазка через 6–12 ч после начала инкубации из флакона без видимого роста. Предпочтение отдается субкультивированию, так как разрешающая способность световой микроскопии (10⁴–10⁵ КОЕ/мл) незначительно превосходит плотность, при которой становится видимым рост во флаконе (10⁶–10⁷ КОЕ/мл).

Для субкультивирования асептически забирается несколько капель предварительно тщательно перемешанной среды и распределяется по поверхности

шоколадного агара. Чашки инкубируются при температуре 35–37°C и 5–10% CO₂ в течение 24–48 ч.

После промежуточного субкультивирования следует продолжить инкубирование флаконов. Через 24 ч инкубации независимо от отсутствия или наличия мутности во флаконе следует приготовить мазок.

Результаты микроскопии следует немедленно сообщать лечащему врачу. Если имеется видимое помутнение среды даже при отрицательном мазке или положительный мазок при отсутствии мутности, то следует субкультивировать материал на шоколадном агаре и КА.

Исследование материалов, содержащих микробные ассоциации (мокрота, материал из среднего уха и пазух носа и т. д.). Перед посевом полученного клинического материала рекомендуется проводить микроскопическое исследование окрашенных мазков. Это позволяет получить предварительные данные о возможных возбудителях, а также оценить качество материала (мокроты).

Оценка качества мокроты позволяет повысить эффективность микробиологического исследования и снизить расходы лаборатории. Критерием пригодности мокроты для бактериологического исследования является наличие более 25 сегментоядерных лейкоцитов и не более 10 эпителиальных клеток в поле зрения при просмотре не менее 20 полей зрения мазка, окрашенного по Граму (при увеличении × 100).

Для улучшения выделения гемофильной палочки рекомендуется использовать среды, содержащие бацитрацин (300 мкг/мл) или диски с бацитрацином (10 ЕД), или сапонинобацитрациновые диски.

Идентификация *Haemophilus influenzae*

После инкубации в течение 24 ч колонии *H. influenzae* на шоколадном агаре могут иметь следующие формы:

- капсульные штаммы формируют слизистые, круглые, сочные, сероватого цвета, иррадиирующие (дающие радужную окраску) в проходящем свете колонии диаметром до 2 мм. Штаммы с менее выраженной капсулой образуют полупрозрачные, круглые, гладкие, неиррадиирующие колонии;

- неинкапсулированные штаммы образуют мелкие, непрозрачные, неиррадиирующие колонии с неровными краями.

Для чистой культуры гемофильной палочки характерно наличие специфического “мышинного” запаха.

H. influenzae обладают цитохромоксидазной и каталазной активностью (см. приложения 2.1 и 2.2.) и нуждаются в X и V факторах, что является одним из основных качеств, отличающих их от других представителей рода гемофил.

Потребность *H. influenzae* в указанных факторах определяется с помощью полосок или дисков с X и V факторами (см. приложение 2.3.). При их отсутствии можно воспользоваться тестом с сапонином или определением способности к сателлитному росту (метод “кормушек”).

Тест с сапонином основан на способности сапонины лизировать эритроциты. Сапонин приводит к высвобождению находящихся в эритроцитах X и V факторов, что обеспечивает рост гемофильной палочки.

Диск с сапонином помещают на поверхность 5% КА, инокулированной испытуемой культурой (суспензией в изотоническом растворе хлорида натрия).

Результаты теста учитывают через 24–48 ч инкубации при температуре 35–37°C и 5–10% CO₂.

Рост колоний вокруг дисков с сапонином и его отсутствие вне зоны гемолиза служит дифференциальным признаком принадлежности исследуемого микроорганизма к роду *Haemophilus*.

Тест на способность к сателлитному росту (метод “кормушек”). Принцип метода “кормушек” аналогичен описанному выше методу дисков с сапонином. Поверхность 5% КА инокулируют суспензией тестируемой культуры в изотоническом растворе хлорида натрия, после чего наносят две параллельные линии гемолитического штамма *S. aureus* (расстояние между линиями – 5–6 мм). После инкубации при температуре 35–37°C в атмосфере с повышенным (5–10%) содержанием CO₂ в течение 18–24 ч рост колоний (в виде валика) в зоне гемолиза, вызванного *S. aureus*, указывает на принадлежность исследуемого микроорганизма к *Haemophilus* spp.

Определение β-галактозидазы. Важным диагностическим тестом для идентификации *H. influenzae* является тест на наличие β-галактозидазной активности (см. приложение 2.4.). Гемофильная палочка не обладает этим ферментом. Таким образом, на основании данного теста она может быть дифференцирована от других видов гемофилов, нуждающихся в X и V факторах.

Зависимость гемофилов от факторов роста, а также другие свойства приведены в табл. 3.

Биотипирование *H. influenzae*. М. Килиан (M. Kilian), изучавший таксономию рода *Haemophilus*, предложил использовать ряд биохимических тестов для биотипирования *H. influenzae*. На основании тестов на продукцию индола, уреазную и орнитинде-

Таблица 3. Дифференциально-диагностические свойства рода *Haemophilus*

Вид	Потребность		Каталаза	Оксидаза	ONPG	Гемолиз*	Образование кислоты из			
	в X и V факторах	в CO ₂					гл	сх	лз	мн
<i>H. influenzae</i>	X, V	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>H. influenzae</i> биовар <i>aegypticus</i>	X, V	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	X, V	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	V	-	v	+	+	-	+	+	-	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	V	-	+	+	v	+	+	+	-	-
<i>H. aphrophilus</i>	h	+	-	-	+	-	+	+	+	+
<i>H. paraphrophilus</i>	V	+	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>H. segnis</i>	V	-	v	-	v	-	w	w	-	-
<i>H. ducreyi</i>	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: гл – глюкоза; сх – сахароза; лз – лактоза; мн – манноза; ONPG – тест на β-галактозидазу;

h – для первичной изоляции нуждается в гемине; w – слабая реакция; v – признак варьирует.

* На лошадиной крови

Таблица 4. Биотипирование *H. influenzae*

Биотип	Индол	Уреаза	ОДК*
<i>H. influenzae</i> I	+	+	+
<i>H. influenzae</i> II	+	+	-
<i>H. influenzae</i> III	-	+	-
<i>H. influenzae</i> IV	-	+	+
<i>H. influenzae</i> V	+	-	+
<i>H. influenzae</i> VI	-	-	+
<i>H. influenzae</i> VII	+	-	-
<i>H. influenzae</i> VIII	-	-	-

* Орнитиндекарбоксилаза.

карбоксилазную активность выделяют 8 биотипов *H. influenzae* (табл. 4).

Биотипирование гемофильной палочки имеет лишь эпидемиологическое значение [1]. Показано, что различные биотипы имеют связь с определенными типами инфекций. Например, по данным ряда исследований, подавляющее количество менингитов вызываются биотипом I (93,1%), тогда как на биотипы II и IV приходится соответственно 4,6 и 2,3%. Большинство штаммов Nib принадлежит к биотипу I, а нетипируемые штаммы – к биотипам II и III.

В ряде исследований отмечена также ассоциация биотипов II и III с конъюнктивитом. Биотип IV чаще вызывает инфекции в акушерской и гинекологичес-

кой практике, перинатальные и неонатальные инфекционные заболевания.

Тест на определение уреазы. Методика определения уреазной активности описана в приложении 3.1. Приготовленную *ex tempore* смесь реактивов А и Б разливают в узкие пробирки по 0,1 мл и вносят несколько капель густой суспензии исследуемой культуры *H. influenzae* в питательном бульоне. Пробирки помещают в термостат при температуре 35–37°C. Предварительный учет возможен через 30 мин.

При положительной реакции среда приобретает малиново-красное окрашивание, при отрицательной – цвет не меняется. Учет отрицательной реакции возможен только после 24 ч инкубации.

Тест на определение индолообразования. Для определения способности бактерий образовывать индол (см. приложение 3.2.) необходимо использовать среды, содержащие триптофан. В пробирку с суточной культурой исследуемого штамма *H. influenzae*, суспензированного в питательном бульоне (шоколадный бульон), помещают индикаторную индольную тест-полоску, пропитанную реактивом, так чтобы она находилась над поверхностью суспензии. Инкубируют при температуре 35–37°C в течение 18–24 ч.

При положительном результате появляется розовое окрашивание тест-полоски.

Тест на наличие орнитиндекарбоксилазы. При определении орнитиндекарбоксилазы используются диски с орнитином (СИБ, bioMerieux, BBL). Диск помещают в пробирку с 0,3–0,5 мл физиологического раствора и добавляют несколько капель суточной бульонной культуры *H. influenzae*, после чего заливают стерильным вазелиновым маслом и инкубируют в течение 18–24 ч при температуре 35–37°C.

При положительном результате появляется синее или интенсивное зеленое окрашивание.

Определение чувствительности *Haemophilus influenzae*

Выбор антибиотиков, которые следует использовать при тестировании *H. influenzae*, зависит от спектра активности, частоты приобретенной антибиотикорезистентности в регионе, локализации и степени тяжести течения инфекционного заболевания и набора антибактериальных препаратов в формуляре учреждения здравоохранения.

Потенциальной активностью в отношении *H. influenzae* обладают следующие антибиотики: аминопенициллины (ампициллин, амоксициллин), уреидопенициллины (пиперациллин), ингибиторозащищенные пенициллины (амоксициллин/клавуланат, ампициллин/сульбактам, пиперациллин/тазобактам, тикарциллин/клавуланат), цефалоспорины II (цефуроксим, цефаклор), III (цефтриаксон, цефотаксим, цефоперазон) и IV (цефепим, цефпиром) поколений, карбапенемы, макролиды (азитромицин, кларитромицин), тетрациклины (тетрациклин, доксициклин), фторхинолоны (ципрофлоксацин, офлоксацин, пефлоксацин, левофлоксацин), рифампицин, хлорамфеникол, ко-тримоксазол.

Несмотря на то что пенициллин, аминогликозиды, эритромицин могут проявлять умеренную *in vitro* активность в отношении *H. influenzae*, терапия этими антибиотиками не может привести к микробиологической или клинической эффективности в ходе лечения.

Наиболее значимой с клинической точки зрения является проблема резистентности гемофильной палочки к аминопенициллинам за счет продукции β -лактамаз [9]. Такие микроорганизмы обычно чувствительны к

ингибиторозащищенным пенициллинам и цефалоспорином, а для быстрого выявления продукции β -лактамаз достаточно провести тест с нитроцефином.

В последние годы описаны штаммы *H. influenzae*, устойчивость которых к ампициллину связана с изменением мишени действия β -лактаменных антибиотиков (пенициллинсвязывающих белков) или снижением проницаемости наружной клеточной стенки [10]. Эти штаммы получили название *бета-лактамазонегативные ампициллинорезистентные* (БЛНАР) и считаются нечувствительными к ингибиторозащищенным пенициллинам и таким цефалоспорином, как цефаклор, цефутоксим, цефиксим, цефтибутен.

По данным зарубежных исследователей, БЛНАР штаммы *H. influenzae* встречаются очень редко (в среднем в 0,2% случаев) и не имеют существенного клинического значения.

В соответствии с международными рекомендациями для выявления ампициллинорезистентности у гемофильной палочки в рутинной лабораторной практике достаточно определения чувствительности к ампициллину диско-диффузионным методом и теста на продукцию β -лактамаз с нитроцефином.

Эти два теста позволяют подразделить штаммы на ампициллиночувствительные, β -лактамазопродуцирующие ампициллинорезистентные (чувствительные к ингибиторозащищенным пенициллинам и цефалоспорином II–IV поколений) и БЛНАР, которые следует расценивать как резистентные к ингибиторозащищенным пенициллинам и некоторым цефалоспорином [11]. Причем тестирование с диском, содержащим ингибиторозащищенные пенициллины, например амоксициллин/клавуланат, не по-

зволяет отличить БЛНАР от ампициллиночувствительных штаммов *H. influenzae*.

Определение чувствительности гемофильной палочки к макролидам (азитромицину, кларитромицину) представляет нерешенную проблему во всем мире, что связано с широким диапазоном получаемых значений и модальным распределением штаммов в популяции. Поэтому подразделение штаммов на категории чувствительности по данным исследований *in vitro* всегда носит субъективный характер и значительно подвержено влиянию минимальных различий в методике и условиях тестирования [12, 13].

К настоящему времени не получено клинических штаммов *H. influenzae*, устойчивых к цефалоспорином III–IV поколений, карбапенемам и фторхинолоном.

Определение чувствительности гемофильной палочки к антимикробным препаратам представляет сложную задачу. В России основным агаром для определения чувствительности микроорганизмов является среда АГВ. Однако в “Методических указаниях по определению чувствительности микроорганизмов к антибиотикам методом диффузии в агар с использованием дисков” Министерства здравоохранения СССР (1983) отсутствуют указания на современные антибиотики и не описаны методики определения чувствительности “привередливых” микроорганизмов, в частности *H. influenzae*.

Результаты проспективных сравнительных исследований показали, что для определения чувствительности штаммов гемофильной палочки **нельзя** использовать среду АГВ с добавками и шоколадный агар на основе АГВ.

В настоящее время большинство исследователей при определении чувствительности микро-

организмов к антибиотикам руководствуется стандартами Национального комитета по клиническому лабораторному стандартам США (National Committee on Clinical Laboratory Standards – NCCLS). Вследствие этого основные исследования чувствительности гемофильной палочки к антибиотикам проводятся в соответствии с этими рекомендациями [14, 15, 16].

Согласно рекомендациям NCCLS для определения чувствительности гемофильной палочки необходимо использовать среду НТМ (*Haemophilus Test Medium* – среда для тестирования гемофил), которая содержит все необходимые для гемофил факторы роста. НТМ представляет собой агар Мюллера–Хинтона с добавлением дрожжевого экстракта и факторов X и V.

Среда НТМ выпускается компанией “Unipath” в виде НТМ-основы и добавок. Однако ее можно приготовить и в лаборатории на основе агара Мюллера–Хинтона (см. приложение 4.1.)

Учитывая относительно высокую стоимость и недоступность среды НТМ, при ее отсутствии **не следует** определять чувствительность *H. influenzae* на других средах в связи с высокой частотой ошибочных результатов.

Определение чувствительности диско-диффузионным методом. Процедура определения чувствительности гемофильной палочки к антибиотикам аналогична тестированию “непривередливых” микроорганизмов и имеет лишь несколько особенностей.

1. Для приготовления инокулюма суспендируют колонии суточной культуры *Haemophilus* spp., выросшей на чашке с шоколадным агаром, в подходящем питательном бульоне (например, бульоне Мюллера–Хинтона) или стерильном физиологическом растворе.

Плотность инокулюма должна соответствовать стандарту мутности 0,5 по МакФарланду ($1,5 \cdot 10^8$ КОЕ/мл). Стандарт изготавливают многие фирмы, выпускающие микробиологическую продукцию (bioMerieux, BBL, Remel Diagnostics), но он может быть приготовлен и в лаборатории (см. приложение 4.2.).

Инокуляцию чашек с НТМ агаром необходимо проводить в течение 15 мин после приготовления инокулюма. Для инокуляции используют стерильные ватные тампоны. Тампон погружают в пробирку с суспензией, отжимают избыток инокулюма о стенки пробирки и наносят на поверхность агара штрихами в 3 направлениях под углом 60°, не внося дополнительного количества суспензии.

2. Вследствие больших зон подавления роста гемофильной палочки вокруг дисков с антибиотиками на чашку диаметром 90–100 мм не следует помещать более 4 дисков с антибиотиками.

3. Инокулированные чашки инкубируют при температуре 35°C в атмосфере с повышенным содержанием CO₂ (5–10%) в эксикаторе или CO₂-инкубаторе в течение 16–18 ч, после чего измеряют полученные зоны подавления роста.

Зона ингибирования роста измеряется с помощью линейки или каллипера. Причем необходимо измерять ее диаметр (не радиус!). Конечной точкой считается расстояние, в зоне которого нет роста микроорганизмов. По величине зоны задержки роста вокруг дисков интерпретируют полученные результаты.

4. Для интерпретации результатов определения чувствительности гемофильной палочки к антибиотикам используют специфические критерии, отличные от критериев интерпретации результатов определения чувствительности “непривередливых” микроорганизмов (табл. 5).

Контроль качества определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам проводят

Таблица 5. Критерии интерпретации чувствительности гемофильной палочки диско-диффузионным методом на НТМ агаре (NCCLS, 1999)

Антибиотик	Диаметр зоны подавления роста, мм		
	Резистентный	Умеренно резистентный	Чувствительный
Ампициллин (10 мкг)	≤18	19–21	≥22
Амоксициллин/клавуланат (20/10 мкг)	≤19	–	≥20
Меропенем (10 мкг) <i>или</i>	–*	–*	≥20
Имипенем (10 мкг)	–*	–*	≥16
Триметоприм/сульфаметоксазол (1,25/23,75 мкг)	≤10	11–15	≥16
Цефотаксим (30 мкг) <i>или</i>	–	–	≥26
Цефтриаксон (30 мкг), <i>или</i>	–*	–*	≥26
Цефтазидим (30 мкг)	–*	–*	≥26
Хлорамфеникол (30 мкг)	≤25	26–28	≥29
Азитромицин (15 мкг) <i>или</i>	–*	–*	≥12
Кларитромицин (15 мкг)	≤10	11–12	≥13
Тетрациклин (30 мкг)	≤25	26–28	≥29
Ципрофлоксацин (5 мкг)	–*	–*	≥21

* Резистентные штаммы не выделены.

путем тестирования контрольных штаммов. В качестве контрольных используют штаммы Американской коллекции типовых культур (АТСС), отличающиеся генетической стабильностью и хорошо изученными фенотипическими характеристиками.

Для контроля качества при определении чувствительности гемофил на НТМ агаре используются штаммы *H. influenzae* АТСС 49247 и *E. coli* АТСС 35218 (при тестировании ингибиторозащитных пенициллинов). Методика постановки и учета соответствует методике работы с испытуемым штаммом. Результаты оцениваются по критериям, изложенным в табл. 6.

Каждая серия чашек при постановке чувствительности должна проверяться на их пригодность для роста тестируемых микроорганизмов. Для этого используется контрольный штамм *H. influenzae* АТСС 10211, из суточной культуры которого готовят микробную взвесь, соответствующую по мутности 0,5 по МакФарланду. Из полученной микробной взвеси готовят серию последовательных разведений 1:10. Затем на приготовленные чашки со средой НТМ высевают по 0,1 мл взвеси -5, -6, -7 разведений. При хороших питательных свойствах агара должен отмечаться рост микроорганизмов из -6 и -7 разведений.

Определение минимальной подавляющей концентрации

Метод серийных разведений в бульоне

Макрометод

Метод серийных разведений в бульоне (макрометод) позволяет определить МПК без значительных материальных затрат. Тестирование небольшого количества штаммов в рутинной практике целесообразно выполнять макрометодом.

Материалы:

1) стерильный НТМ бульон; можно использовать готовый коммерческий НТМ бульон или приготовленный в лаборатории на основе стерильного бульона Мюллера–Хинтона со стабилизированным катионным составом (по ионам Ca^{++} , Mg^{++}) с добавлением тех же компонентов, что и в НТМ агаре;

2) субстанции антибиотиков с известной активностью;

3) стерильные пробирки размером 13×100 мм или 14×140 мм;

4) стерильные пипетки;

5) дозирующие пипетки со стерильными наконечниками;

6) стандарт мутности 0,5 по МакФарланду.

Процедура. Тестирование проводится в объеме 1 мл каждого разведения антибиотика с конечной концентрацией гемофильной палочки примерно 5×10^5 КОЕ/мл.

Приготовление серийных разведений антибиотика. Серийные разведения антибиотика готовятся из “стартового” раствора на НТМ бульоне (табл. 7), который затем разливается по 0,5 мл в каждую пробирку. В последующем при внесении тестируемой бульонной культуры *H. influenzae* концентрация антибиотика уменьшается в 2 раза. Количество пробирок определяется необходимым диапазоном разведений антибиотика и увеличивается на две для постановки “отрицательного контроля” и “контроля роста”.

Базовый раствор антибиотика готовится из навески химически чистой субстанции препарата путем растворения ее в рассчитанном количестве растворителя для получения концентрации, превышающей стартовую концентрацию антибиотика в 100 раз (например, 3200 мг/л для ампициллина).

Недопустимо использование

лечебных препаратов вместо субстанций!

Подробно методика приготовления базового раствора изложена в приложении 4.3. Стартовый раствор антибиотика приготавливается путем добавления 0,1 мл базового раствора антибиотика к 9,9 мл НТМ бульона, 0,5 мл которого переносят микропипеткой со стерильным наконечником в первую пробирку, содержащую 0,5 мл бульона. Тщательно перемешивают и новым стерильным наконечником переносят 0,5 мл раствора антибиотика в бульоне во вторую пробирку, содержащую первоначально 0,5 мл бульона.

Эту процедуру повторяют, пока не будет приготовлен весь необходимый ряд разведений. Из последней пробирки 0,5 мл бульона удаляют. Таким образом получается ряд пробирок с растворами антибиотиков в количестве 0,5 мл, концентрация которых отличается в соседних пробирках в 2 раза. Одновременно готовятся ряды серийных разведений антибиотика для тестирования контрольных штаммов гемофильной и кишечной палочек.

Приготовление инокулюма.

Для приготовления инокулюма используют суточную культуру гемофильной палочки на шоколадном агаре. Колонии *H. influenzae* суспендируют в стерильном 0,9% растворе натрия хлорида до мутности, эквивалентной 0,5 по стандарту МакФарланда.

Последующее разведение этой суспензии в 100 раз готовится на НТМ бульоне, после чего концентрация гемофильной палочки составит примерно 10^6 КОЕ/мл. По 0,5 мл инокулюма вносят в каждую пробирку, содержащую по 0,5 мл соответствующего разведения антибиотика, и в 2 пробирки с 0,5 мл НТМ бульона без антибиотика (“отри-

Таблица 6. Допустимые диапазоны значений диаметров зон подавления роста для контрольных штаммов *H. influenzae* ATCC 49247 и *E. coli* ATCC 35218 (NCCLS, 1999)

Антибиотик	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	<i>E. coli</i> ATCC 35218
Ампициллин (10 мкг)	13–21	–
Амоксициллин/клавуланат (20/10 мкг)	15–23	18–22
Триметоприм/сульфаметоксазол (1,25/23,75 мкг)	24–32	–
Меропенем (10 мкг)	20–28	–
Имипенем (10 мкг)	21–29	–
Цефотаксим (30 мкг)	31–39	–
Цефтриаксон (30 мкг)	31–39	–
Хлорамфеникол (30 мкг)	31–40	–
Азитромицин (15 мкг)	13–21	–
Кларитромицин (15 мкг)	11–17	–
Тетрациклин (30 мкг)	14–22	–
Ципрофлоксацин (5 мкг)	34–42	–

Таблица 7. Тестируемые антибиотики и диапазон разведений

Антибиотик	Диапазон разведений, мг/л	Стартовая концентрация, мг/л
Ампициллин	0,016–16	32
Амоксициллин/клавуланат	0,032/0,016–32/16	64/32
Триметоприм/сульфаметоксазол	0,032/0,608–32/608	64/1216
Меропенем <i>или</i>	0,004–4	8
Имипенем	0,016–16	32
Цефтриаксон <i>или</i> цефотаксим, <i>или</i> цефтазидим	0,008–8	16
Хлорамфеникол	0,064–64	128
Азитромицин <i>или</i>	0,032–32	64
Кларитромицин	0,064–64	128
Тетрациклин	0,064–64	128
Ципрофлоксацин	0,004–4	8

цательный контроль” и “контроль роста”).

Конечная концентрация гемофильной палочки в каждой пробирке достигнет необходимой – примерно 5×10^5 КОЕ/мл. Инокулюм должен быть внесен в пробирку с разведениями антибиотика не позднее 30 мин с момента его приготовления.

Инкубация. Пробирки с тестируемыми штаммами, кроме пробирки “отрицательный контроль”, инкубируются в обычной атмосфере при температуре 35°C 20–24 ч. Пробирка “отрицательный контроль” помещается в хо-

лодильник (температура 4°C), где хранится до учета результатов.

Учет результатов. Для определения наличия роста гемофильной палочки пробирки с посевами просматриваются в проходящем свете. Рост культуры в присутствии антибиотика сравнивается с референтной пробиркой (“отрицательный контроль”), содержащей исходный инокулюм и хранившейся в холодильнике. МПК определяется по наименьшей концентрации антибиотика, которая подавляет видимый рост *H. influenzae*.

Микрометод

В случае необходимости определения МПК у 8 и более штаммов целесообразно использовать микрометод. Он позволяет тестировать одновременно большое количество штаммов к нескольким антибиотикам.

Тестирование проводится в объеме 0,1 мл (0,05 мл НТМ бульона и 0,05 мл инокулюма), что позволяет значительно сократить количество расходного материала. Методика не имеет отличий от макрометода, за исключением объема, но требует дополнительного оснащения лаборатории многоканальными пипетками, микротитровальными плашками (с круглым или коническим дном) со стерильными крышками, специальным устройством с непрямой подсветкой для учета результатов.

Рост микрофлоры в присутствии антибиотика сравнивается с ростом культуры в ячейке без антибиотика.

Каждая партия тестируемых штаммов сопровождается внутренним контролем с использованием контрольных штаммов *H. influenzae* ATCC 49247 и *E. coli* ATCC 35218.

Метод Е-тестов

Е-тест представляет собой пластиковую полоску размером 5×50 мм с нанесенным градиентом концентрации антибиотика (0,002–32, 0,016–256 или 0,063–1024 мг/л в зависимости от препарата). Метод основан на диффузии антибиотиков в агар, что создает градиент концентрации антибиотика в агаре. Зона задержки роста имеет форму эллипса, размеры которого увеличиваются от меньшей концентрации антибиотика на полоске к большей.

Материалы:

1) НТМ агар, приготовленный в лаборатории, или коммер-

ческие готовые чашки с агаром;

2) полоски Е-тестов с антибиотиками;

3) стерильный бульон Мюллера–Хинтона;

4) стандартные стерильные тампоны;

5) стандарт мутности 0,5 по МакФарланду.

Процедура приготовления НТМ агара и нанесения культуры аналогична таковой при диско-диффузионном методе. Поверхность микробного газона должна быть сухой, для чего Е-тесты наносят не ранее, чем через 15 мин от момента нанесения инокулюма. Полоски Е-тестов помещаются на поверхность агара пластиковой поверхностью с отметками градиента концентраций кверху. На чашку диаметром 90 мм наносят не более 2 полосок. Посевы инкубируют в течение 20–24 ч при температуре 35°C в атмосфере с повышенным содержанием CO₂.

Учет результатов. Результаты следует учитывать только при наличии сплошного плотного газона культуры. Если рост слабый, необходимо продлить инкубацию. В случае “разреженного” роста газона тестирование нужно повторить, проверив качество агара и инокулюма. Результаты учитываются в отраженном свете и/или под лупой, чтобы хорошо рассмотреть край роста. Учитывается зона **полного** подавления роста. Величина МПК определяется тем значением концентрации, на уровне которой эллипс пересекается со шкалой полоски.

Интерпретация. Метод Е-тестов определяет МПК исходя из непрерывного градиента концентраций, включая значения между двукратными разведениями. Для определения категории чувствительности полученные значения следует округлять до ближайших значений двукратных разведений. Например:

1) для чувствительных штаммов значения МПК ампициллина ≤ 1 мг/л; методом Е-тестов получена МПК 0,064 мг/мл, результат интерпретируется как чувствительный;

2) МПК умеренно резистентных штаммов – 2 мг/л; методом Е-тестов определена МПК 1,5 мг/л, результат интерпретируется как умеренно резистентный.

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности к некоторым антибиотикам методом разведений и Е-тестов приведены в табл. 8.

Контроль качества. Используются штаммы *H. influenzae* ATCC 49247, *H. influenzae* ATCC 49766 (при тестировании карбапенемов) и *E. coli* ATCC 35218 (при тестировании ингибиторозащищенных пенициллинов). Методика постановки и учета соответствует методике работы с испытуемым штаммом. Результаты интерпретируются по приведенным ниже критериям (табл. 9).

Тест на определение продукции β -лактамаз

β -Лактамазы – ферменты, разрушающие β -лактамные анти-

биотики. Продукция β -лактамаз является основным механизмом устойчивости к аминопеницилинам и некоторым цефалоспорином у штаммов *H. influenzae*. Разработано несколько методов определения продукции β -лактамаз. Наиболее распространенный – хромогенный метод с использованием дисков с нитроцефином.

Принцип метода основан на том, что β -лактамазы гидролизуют аминую связь в β -лактамном кольце нитроцефина, в результате чего происходит видимое невооруженным глазом изменение цвета.

Материалы:

- 1) диски с цефиназой (BBL);
- 2) стерильная дистиллированная вода;
- 3) стеклянные предметные стекла или чашки Петри;
- 4) стерильные пипетки;
- 5) стерильные деревянные палочки-аппликаторы или петли.

Процедура:

- 1) поместить необходимое количество дисков на чистое предметное стекло или на чашку Петри;
- 2) смочить каждый диск 1 каплей стерильной дистиллированной воды;

Таблица 8. Критерии интерпретации чувствительности *H. influenzae* методом разведений и Е-тестов (NCCLS, 2000)

Антибиотик	МПК, мг/л		
	Резистентный	Умеренно резистентный	Чувствительный
Ампициллин	≥ 4	2	≤ 1
Амоксициллин/клавуланат	$\geq 4/2$	–	$\leq 2/1$
Триметоприм/сульфаметоксазол	≥ 4	1	$\leq 0,5$
Цефтриаксон <i>или</i> цефотаксим, <i>или</i> цефтазидим	–*	–*	≤ 2
Меропенем <i>или</i>	–*	–*	$\leq 0,5$
Имипенем	–*	–*	≤ 4
Хлорамфеникол	≥ 8	4	≤ 2
Азитромицин <i>или</i>	–	–*	≤ 4
Кларитромицин	≥ 32	16	≤ 8
Тетрациклин	≥ 8	4	≤ 2
Ципрофлоксацин	–*	–*	≤ 1

* Резистентных штаммов не выделено.

Таблица 9. Допустимые диапазоны значений МПК для контрольных штаммов (NCCLS, 2000)

Антибиотик	<i>H. influenzae</i> ATCC 49247	<i>H. influenzae</i> ATCC 49766	<i>E. coli</i> ATCC 35218
Ампициллин	2–8	–	–
Амоксициллин/клавуланат	2/1–16/8	–	4/2–16/8
Триметоприм/сульфаметоксазол	0,03–0,25	–	–
Меропенем	–	0,03–0,12	–
Имипенем	–	0,25–1	–
Хлорамфеникол	0,25–1	–	–
Цефотаксим	0,12–0,5	–	–
Цефтриаксон	0,06–0,25	–	–
Азитромицин	1–4	–	–
Кларитромицин	4–16	–	–
Тетрациклин	4–32	–	–
Ципрофлоксацин	0,004–0,03	–	–

3) с помощью стерильной петли или палочки-апликатора нанести несколько хорошо изолированных, морфологически сходных колоний на поверхность диска; следует использовать чистую суточную культуру на шоколадном агаре;

4) наблюдать изменение цвета; положительные результаты появляются в течение 15 с – 5 мин; при отсутствии изменения цвета в течение 5 мин тест считается отрицательным.

Интерпретация теста: поло-

жительный – образование красного окрашивания диска в месте нанесения культуры исследуемого микроорганизма, *отрицательный* – отсутствие изменения цвета.

Контроль качества: положительный контроль – *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, отрицательный контроль – *Haemophilus influenzae* ATCC 10211.

Примечание. “Рабочие” контрольные штаммы следует хранить на косяках с триптиказосоевым (*S. aureus*) и шоколадным агаром (*H. influenzae*) при температуре 2–8°C до 1 мес. Перед тестированием следует субкультивировать штаммы на чашке с КА и шоколадным агаром. Контроль качества следует проводить ежедневно и при тестировании каждого нового лота дисков.

Приложение 1

1.1. Шоколадный агар для выделения и идентификации *H. influenzae*

Состав: 2% мясopептонный агар (МПА), 10% крови и 5% дрожжевого экстракта от объема МПА, рН 7,4–7,6.

Приготовление. К охлажденному до температуры 75°C МПА асептически добавляют половину необходимого объема крови, тщательно перемешивают и нагревают в течение 3–5 мин на водяной бане при температуре 80°C, непрерывно помешивая. Затем остужают при комнатной температуре до 75°C, добавляют

вторую часть крови и снова нагревают в течение 3–5 мин, непрерывно помешивая. Остужают при комнатной температуре до 45–50°C и добавляют дрожжевой экстракт. Агар тщательно взбалтывают и разливают по пробиркам и/или чашкам Петри.

Готовую питательную среду хранят в холодильнике, избегая высушивания, не более 2 нед.

1.2. Шоколадный бульон

Основа – питательный бульон (рН 7,4–7,6). Приготовление аналогично приготовлению шоколадного агара.

Пример: на 180 мл питательного бульона добавляют 18 мл крови (9 мл эритроцитной массы и 9 мл сыворотки крупного рогатого скота) и 9 мл дрожжевого экстракта.

1.3. Двухфазная среда для посева крови и спинномозговой жидкости

Приготовление. Твердая фаза – шоколадный агар, разлитый и скошенный в стерильных флаконах в условиях бокса. Жидкая фаза – шоколадный бульон, асептически добавленный во флаконы с застывшим скошенным шоколадным агаром.

Приложение 2

2.1. Тест на продукцию цитохромоксидазы

Цитохромоксидаза является железосодержащим гемопротеином, участвующим в аэробной

дыхательной цепи передачи электронов кислороду с формированием воды.

В данном тесте используются определенные красители, такие,

как *p*-фенилендиамина дигидрохлорид, которые замещают кислород как искусственные акцепторы электронов. В присутствии цитохромоксидазы и кисло-

рода эти бесцветные вещества подвергаются оксидации и образуют индофенол синий.

Реагенты и материалы

А. Тетраметил-*p*-фенилендиамина дигидрохлорид, 1% (реагент Ковача).

Б. Диметил-*p*-фенилендиамина дигидрохлорид, 1% (реактив Гордона и МакЛеода).

В. Коммерческие диски (bio-Merieux, BBL, Difco).

Контроль качества: положительный контроль – агаровая культура *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), отрицательный контроль – агаровая культура *Escherichia coli* (ATCC 25922).

Контроль качества следует проводить перед использованием каждого нового лота реактивов и каждый день.

Методы

А. Прямой метод. Нанести 1 каплю реактива на тестируемую колонию. Изменение цвета (темно-лиловый или фиолетовый) указывает на наличие цитохромоксидазы.

Б. Не прямой метод с использованием бумажных полосок или дисков. Поместить в чашку Петри полоску фильтровальной бумаги и добавить 1–2 капли реактива либо поместить в чашку Петри коммерческие полоски или диски, пропитанные реактивом, и смочить дистиллированной водой. Тетраметильный дериват *p*-фенилендиамина лучше хранится и отличается большей чувствительностью для определения цитохромоксидазы, а также менее токсичен, чем диметильный дериват. С помощью деревянной или стеклянной палочки, или платиновой петли нанести на полоски или диски суточную агаровую культуру исследуемого микроорганизма.

Изменение цвета (появление темно-синего или фиолетового окрашивания) регистрируется в течение 10–30 с.

Примечание

Не используйте железные или вольфрамовые петли или иглы, так как это может привести к ложноположительным результатам за счет продуктов окисления, образующихся на поверхности металла при стерилизации на огне. Рекомендуется применять платиновые или нихромовые петли. После смачивания импрегнированные полоски и диски должны быть использованы в течение 1 дня.

2.2. Тест на способность к продукции каталазы

Каталаза – это фермент, превращающий пероксид водорода (H_2O_2) в воду и кислород. Химически каталаза является гемопротеином, сходным по структуре с гемоглобином, за исключением того, что содержит трехвалентное железо, а не двухвалентное.

Реагенты и материалы

А. 3% раствор перекиси водорода (хранить во флаконе из темного стекла в холодильнике)

Б. Суточная культура тестируемого микроорганизма.

Контроль качества: положительный контроль – агаровая культура *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), отрицательный контроль – агаровая культура *Streptococcus pyogenes* (ATCC 12344).

Методика

На предметном стекле суточная агаровая культура микроорганизма суспендируется в капле 3% раствора перекиси водорода. Пузырьки различной интенсивности появляются сразу или через 3–5 с.

Примечание

Не следует использовать для тестирования культуры старше 24 ч, так как фермент присутствует только в живых микроорганизмах, и может быть получен ложноотрицательный результат. Некоторые микроорганизмы

имеют другие ферменты, разрушающие перекись водорода. Поэтому маленькие пузырьки в небольшом количестве, появляющиеся через 20–30 с, не рассматриваются как положительный тест.

Кроме того, каталаза присутствует в эритроцитах, поэтому может наблюдаться ложноположительный результат при заборе колоний со среды, содержащей кровь.

2.3. Идентификация *H. influenzae* с использованием X и V факторов

Потребность гемофил в X и/или V факторах может быть определена при использовании полосок или дисков, импрегнированных X, V и XV факторами. При помещении на поверхность среды дисков с соответствующими факторами они легко диффундируют в питательную среду вокруг дисков. После инкубации потребность оценивается в зависимости от характера роста исследуемого микроорганизма вокруг дисков.

Материалы:

1) полоски или диски из фильтровальной бумаги, импрегнированные X и V факторами (BBL, Oxoid);

2) питательная среда, не содержащая X и V факторы (триптиказосоевый агар, сердечно-мозговой агар – brain-heart infusion agar);

3) питательный бульон (brain-heart infusion broth).

Контроль качества: *Haemophilus parainfluenzae* – требует V фактор, *Haemophilus influenzae* – требует X и V факторы.

Методика

Приготовить легкую суспензию чистой суточной культуры исследуемого микроорганизма в питательном бульоне. Необходимо избегать переноса вместе с колониями геминсодержащей сре-

ды, что может привести к ложным результатам. С помощью стерильного тампона инокулировать поверхность питательной среды приготовленной суспензией. Поместить на поверхность агара диски или полоски, содержащие X, V и XV факторы, на расстояние 2 см друг от друга. Инкубировать 18–24 ч при температуре 35–37°C в атмосфере с 5–10% CO₂.

Учет характера роста производится визуально. Наличие роста микроорганизма только вокруг дисков с X и XV или V и XV факторами указывает на потребность соответственно в X или V факторе. Рост только вокруг диска с XV факторами характерен для гемофил, нуждающихся в обоих факторах (например, *H. influenzae*).

2.4. Тест на определение О-нитрофенил-β-D-галактопиранозидазы (ONPG, β-галактозидазы)

Для демонстрации ферментации лактозы в обычных тестах

требуется наличие двух ферментов. Пермеаза обеспечивает проникновение молекул лактозы в бактериальную клетку, а β-галактозидаза непосредственно гидролизует лактозу до галактозы и глюкозы.

У микроорганизмов, которые истинно не ферментируют лактозу, отсутствуют оба фермента. Однако некоторые бактерии могут не иметь пермеаз, но сохранять β-галактозидазу. ONPG (О-нитрофенил-β-D-галактопиранозидаза) – бесцветное вещество, сходное по структуре с лактозой. В присутствии β-галактозидазы ONPG разрушается на галактозу и О-нитрофенол, имеющий желтый цвет. *H. influenzae* в отличие от всех остальных видов рода не имеет β-галактозидазы.

Реактивы и материалы

В связи с большими техническими трудностями при изготовлении реактивов рекомендуется использовать готовые коммерческие диски, пропитанные ONPG (СИБ, Н.-Новгород; биоМерье, BBL, Oxoid, Difco).

Контроль качества: положительный контроль – агаровая культура *Escherichia coli* (ATCC 25922), отрицательный контроль – агаровая культура *Proteus mirabilis* (ATCC 29245).

Контроль качества следует проводить перед использованием каждого нового лота реактивов и перед тестированием каждого микроорганизма.

Методика

Приготовить густую суспензию исследуемого микроорганизма (эквивалентную стандарту мутности 2 по МакФарланду) в 0,5–1 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Внести в пробирку таблетку или диск, содержащий ONPG, и инкубировать при температуре 35–37°C. Предварительный учет реакции возможен через 1 ч.

Положительная реакция – появление желтого окрашивания в результате образования О-нитрофенола. Отрицательный результат может быть сообщен только после 24 ч инкубации.

Приложение 3

3.1. Определение мочевины

Используются 2 реактива.

Реактив А: стерильная дистиллированная вода – 4 мл, этиловый спирт 96% – 2 мл, мочевина – 2 г.

Реактив В: 0,2% раствор фенол-рот – 1 мл, КН₂РО₄ – 0,1 г, К₂НРО₄ – 0,1 г, NaCl – 0,5 г, дистиллированная вода – 100 мл.

Приготовление. Реактив А хранится при температуре 4–10°C

(не автоклавировать!). Реактив В стерилизуют при 1,5 атм. 30 мин. Перед употреблением *ex tempore* смешать 1 часть реактива А и 19 частей реактива В.

3.2. Индикаторные индольные тест-полоски

Состав:

- *p*-диметиламидобензальдегид – 3,0–5,0 г;

- этиловый спирт 96% – 50 мл;
- концентрированная Н₂РО₄ – 10 мл.

Приготовление. Ингредиенты растирают в ступке и перемешивают. Готовым раствором пропитывают фильтровальную бумагу, высушивают и нарезают полосками.

Приложение 4

4.1. Приготовление НТМ агара

После растворения основы в нее добавляют дрожжевой экстракт до конечной концентрации

5 мг/мл и раствор гематина до конечной концентрации 15 мг/л. Для приготовления основного раствора гематина к 50 г порошка добавляют 100 мл 0,01N NaOH

(0,01 моль/л) и нагревают при тщательном перемешивании до полного растворения.

В подготовленную для автоклавирования среду на 1 л вносят

30 мл основного раствора гематина. После автоклавирования и охлаждения основы на водяной бане до температуры 45–50°C в нее асептически вносят матричный раствор НАД 3 мл на 1 л агара до конечной концентрации 15 мг/л.

Для приготовления матричного раствора 50 мг НАД растворяют в 10 мл дистиллированной воды и стерилизуют фильтрацией через мембранные фильтры с размером пор 0,45 мкм.

При тестировании триметоприма или ко-тримоксазола следует дополнительно асептически добавить 0,2 МЕ/мл тимидинфосфоорилазы.

Приготовленный агар разливают в стерильные чашки Петри на ровном, строго горизонтальном рабочем столе. На чашку диаметром 100 мм необходимо 25 мл агара, диаметром 90 мм – 20 мл, для того чтобы толщина агара в чашке была $4 \pm 0,5$ мм.

Агар застывает при комнатной температуре. Чашки с застывшим агаром необходимо подсушить с приоткрытыми крышками в термостате при температуре 35°C в течение 10–30 мин, чтобы удалить избыток конденсата.

4.2. Приготовление стандарта мутности 0,5 по МакФарланду

Необходимые материалы:

- 0,048 М BaCl_2 (1,175% раствор $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)
- 0,18 М (0,36 N) H_2SO_4 (1% раствор).

Методика приготовления

1. Добавить 0,5 мл 0,048 М BaCl_2 (1,175% раствор $\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$) к 99,5 мл 0,18 М (0,36 N) H_2SO_4 (1% раствор).

2. В идеале оптическая плотность приготовленного стандарта мутности должна быть проверена с помощью спектрофотометра с

длиной светового пути 1 см и подходящей кюветой для определения поглощения. Поглощение при длине волны 625 нм должно быть 0,08–0,10 для стандарта мутности 0,5 по МакФарланду.

3. Разлить полученную взвесь по 4–6 мл в пробирки с хорошо закручивающимися крышками такого же размера, как и те, что используются для приготовления инокулюма.

4. Плотно закрыть пробирки и хранить их в темном месте при комнатной температуре.

5. Интенсивно взбалтывать приготовленный стандарт мутности непосредственно перед использованием.

6. Стандарт мутности необходимо менять на новый или проверять его оптическую плотность ежемесячно.

4.3. Приготовление базового раствора антибиотика

Базовые растворы готовятся из химически чистых коммерческих субстанций с известной активностью.

Нельзя использовать соответствующие лечебные препараты!

При расчетах следует учитывать наличие в субстанции балластной части, которая в некоторых солях антибиотиков составляет значительную долю. Активность субстанции, как правило, указана на упаковке и выражается либо в процентном содержании действующего вещества, либо в миллиграммах действующего вещества на 1 г субстанции.

Во втором случае для того чтобы вычислить процентное содержание активного вещества, необходимо значение активности, выраженное в мг/г, разделить на 10. Если активность субстанции не указана на упаковке, ее условно принимают за 100%.

Например, необходимо приготовить серийные разведения ам-

пициллина в диапазоне от 16 до 0,016 мг/л. Объем базового раствора – примерно 50 мл.

$$m_{\text{теор.}} = \frac{C_{\text{макс. (мкг/мл)}} \times V_{\text{осн. (мл)}}}{500 \times A (\%)},$$

где $m_{\text{теор.}}$ – теоретическая масса навески с учетом активности субстанции, $V_{\text{осн.}}$ – объем базового раствора, A – активность субстанции, выраженная в процентах.

$$m_{\text{теор.}} = 16 \text{ (мг/л)} \times 50 \text{ (мл)} / 500 \times 100 = 0,016 \text{ (г)}.$$

Как правило, абсолютно точно взвесить необходимое количество антибиотика не удастся. Чтобы получить в таком случае базовый раствор необходимой концентрации, следует варьировать объем растворителя. Этот объем рассчитывают по формуле:

$$V_{\text{практ. (мл)}} = \frac{M_{\text{практ. (г)}} \times V_{\text{теор. (мл)}}}{m_{\text{теор. (г)}}},$$

где $V_{\text{практ.}}$ – практический объем растворителя, $V_{\text{теор.}}$ – теоретический объем растворителя, $m_{\text{практ.}}$ – практическая масса навески, $m_{\text{теор.}}$ – теоретическая масса навески.

$$V_{\text{практ.}} = 0,01654 \text{ (г)} \times 50 \text{ мл} / 0,016 \text{ (г)} \times 51,7 \text{ (мл)}.$$

Рекомендуемые растворители и разбавители субстанций антибиотиков приведены в табл. 10.

Приготовленный базовый раствор разливается в стерильных условиях небольшими объемами (для тестирования 1, 2, 3 ... N штаммов) и хранится при отрицательной температуре $\leq -20^\circ\text{C}$ в среднем в течение 6 нед.

Не следует хранить готовые базовые растворы в холодильниках с автоматической системой оттаивания, так как повторное размораживание и замораживание приводит к разрушению антибиотика. По этой же причине нельзя хранить размороженный базовый раствор.

Таблица 10. Растворители субстанций антибиотиков

Субстанция	Растворитель	Разбавитель
Ампициллин	Фосфатный буфер, pH=8,0, 0,1 М	Фосфатный буфер, pH=6,0, 0,1 М
Амоксициллин	Фосфатный буфер, pH=8,0, 0,1 М	Фосфатный буфер, pH=6,0, 0,1 М
Триметоприм	0,05 N молочная кислота или соляная кислота, 10% от необходимо объема (или 1,0 мл 0,1 М NaOH на каждые 10 мг субстанции)	Вода (стабилен при температуре 4°C, может нуждаться в нагревании)
Сульфаметоксазол	1/2 объема – горячая вода и минимальное количество 2,5 М NaOH для растворения (или 1,0 мл 0,1 М NaOH на каждые 10 мг субстанции)	Вода
Цефотаксим <i>или</i>	Вода	Вода
Цефтриаксон, <i>или</i>		
Цефтазидим		
Меропенем	Вода	Вода
Хлорамфеникол	Этанол или метанол	Вода
Азитромицин <i>или</i>	Этанол или метанол	Вода
Кларитромицин		
Тетрациклин	Вода	Вода

Л и т е р а т у р а

1. Haemophilus. In : Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Winn W.C., editors. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th ed. Lippincott: Philadelphia;1997. p. 363-94.
2. Pittman M. Variation and type specificity in the bacterial species *Haemophilus influenzae*. J Exp Med 1931; 53:471-92.
3. Kiehn T.E., Verhoef J. *Haemophilus* spp. In: Armstrong D., Cohen J., editors. Infectious diseases. Harcourt Publishers Ltd; 1999. p. 8-20.7-20.11.
4. Spinola S.M., Peacock J., Denny F.W., et al. Epidemiology of colonization with nontypable *Haemophilus influenzae* in children: A longitudinal study. J infect Dis 1986; 154:100-9.
5. Harabuchi Y., Faden H., Yamanaoka N., et al. Nasopharyngeal colonization with nontypable *Haemophilus influenzae* and recurrent otitis media. J Infect Dis 1994; 170: 862-6.
6. Murphy T.F. Haemophilus. In: Gorbach S.L., Bartlett J.G., Blacklow N.R., editors. Infectious Diseases. 2nd ed. W.B. Saunders Company; 1998. p. 1845-58.
7. Orenstein W., Wharton M., Bart K.J., Hinman A.R. Immunization. In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., editors. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Churchill Livingstone; 2000. p. 3213-4.
8. Campos J.M. *Haemophilus* spp. In: Murrey P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenoer F.C., Tenover R.M., editors. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. ASM Press; 1999. p. 604-13.
9. Felmingham D., Washington J. Trends in antimicrobial susceptibility of bacterial respiratory tract pathogens – findings of the Alexander project 1992-1996. J Chemother 1999; 11:5-21.
10. Jacoby G.A. Prevalence and resistance mechanisms of common bacterial respiratory pathogens. Clin Infect Dis 1994;18:951-7.
11. Fuchs P.C., Barry A.L. Interpretative criteria for susceptibilities of *Haemophilus influenzae* to ampicillin, amoxicillin and amoxicillin/clavulanate. J Clin Microbiol 1994; 32:2846-50.
12. Crokaert F., Aoun M., Duchateau V. Are macrolides active against *Haemophilus influenzae*? Are the in vitro tests reliable? Proceedings of the 35th ICAAC, San Francisco, 1995.
13. Acar J. Resistance patterns of *Haemophilus influenzae*. J Chemother 1999; 11:44-50.
14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; ninth informational supplement. NCCLS Document M100-S9 1999;19(1).
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 5th ed. NCCLS Document M7-A5 2000;20(2).
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; tenth informational supplement. NCCLS Document M100-S10(M7) 2000.
17. Leitch C., Boonlayangoor S. β -Lactamase test. In: Isenberg H.D. Clinical microbiology procedures handbook. ASM; 1992. p. 5.3.1.