



Клинические рекомендации

Кистозный фиброз (муковисцидоз): микробиологическая диагностика хронической респираторной инфекции

МКБ 10: E84

Возрастная категория: дети, взрослые

ID:

Год утверждения: 2018 (пересмотр каждые 3 года)

Профессиональные организации:

- Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины» (Ассоциация «ФЛМ»);
- Межрегиональная ассоциация общественных объединений «Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии» (МАКМАХ);
- Российское общество медицинских генетиков;
- Российское респираторное общество.

	Оглавление	Стр.
	Ключевые слова	7
	Список сокращений	8
	Термины и определения	11
1.	Краткая информация	13
1.1	Определение	13
1.2	Этиология и патогенез	13
1.3	Эпидемиология	13
1.3.1	Распространенность кистозного фиброза (муковисцидоза)	13
1.3.2	Микробиология и эпидемиология хронической респираторной инфекции	14
1.4	Кодирование по МКБ	17
2.	Микробиологическая диагностика	17
2.1	Задачи микробиологической диагностики	17
2.2	Эпидемиологическая характеристика приоритетных патогенов хронической респираторной инфекции	19
2.2.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.2.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
2.2.3	<i>Burkholderia cepacia complex</i>	20
2.2.4	<i>Achromobacter</i> spp.	21
2.2.5	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	21
2.2.6	Другие представители неферментирующих грамотрицательных бактерий	21
2.2.7	<i>Haemophilus influenzae</i>	22
2.2.8	Другие бактерии	22
2.2.9	Грибы	22
2.2.10	Нетуберкулезные микобактерии	24
3.	Сбор, хранение и доставка образцов биологического материала	24
3.1	Методы отбора проб	24
3.2	Транспортировка и хранение респираторных образцов	25
3.3	Микроскопическое исследование	27
3.3.1	Окраска по Граму	27
3.3.2	Микроскопическое исследование на грибы. Люминесцентная микроскопия	28
3.4	Питательные среды для выделения микроорганизмов из образцов респираторного тракта	29
3.5	Посев биоматериала	29
3.5.1	Гомогенизация мокроты	31

3.5.2	Количественный метод посева	31
3.5.3	Посев на грибы	32
3.6	Условия и время культивирования микроорганизмов	32
3.6.1	Культивирование <i>Staphylococcus aureus</i>	33
3.6.2	Культивирование <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
3.6.3	Культивирование <i>Burkholderia cepacia complex</i>	34
3.6.4	Рост неферментирующих грамотрицательных бактерий на селективных средах для выделения <i>Burkholderia cepacia complex</i>	35
3.6.5	Культивирование <i>Achromobacter</i> spp., <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	39
3.6.6	Культивирование <i>Haemophilus influenzae</i>	40
3.6.7	Культивирование грибов	41
4.	Идентификация микроорганизмов	42
4.1	Идентификация <i>Staphylococcus aureus</i>	42
4.2	Идентификация неферментирующих грамотрицательных бактерий	43
4.2.1	Ключевые моменты идентификации неферментирующих грамотрицательных бактерий	44
4.2.2	Идентификация <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	45
4.2.3	Идентификация <i>Burkholderia cepacia complex</i>	47
4.2.4	Идентификация <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	47
4.2.5	Идентификация <i>Achromobacter</i> spp.	48
4.2.6	Идентификация <i>Burkholderia gladioli</i> , <i>Ralstonia</i> spp., <i>Cupriavidus</i> spp. и <i>Pandoraea</i> spp.	49
4.3	Идентификация <i>Haemophilus influenzae</i>	51
4.4	Идентификация микроорганизмов с применением времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS)	51
4.5	Идентификация грибов	53
4.5.1	Идентификация грибов по морфологическим признакам	53
4.5.2	Идентификация грибов с применением времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS)	56
5.	Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам	57
5.1.	Определение чувствительности <i>Staphylococcus aureus</i>	58
5.1.1	Тесты для выявления метициллинрезистентного <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	59
5.1.2	Определение устойчивости <i>Staphylococcus aureus</i> к ванкомицину	61
5.1.3	Определение индуцибельной устойчивости <i>Staphylococcus aureus</i> к клиндамицину	61
5.2	Определение чувствительности <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62
5.2.1	Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) тобрамицина в отношении <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	64

5.3	Определение чувствительности <i>Burkholderia cepacia complex</i>	64
5.4	Определение чувствительности <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	66
5.5	Определение чувствительности <i>Achromobacter</i> spp.	67
5.6	Определение чувствительности <i>Burkholderia gladioli</i> , <i>Ralstonia</i> spp., <i>Cupriavidus</i> spp., <i>Pandoraea</i> spp. и <i>Inquilinus</i> spp.	67
5.7	Определение чувствительности <i>Haemophilus influenzae</i>	68
5.8	Определение чувствительности грибов рода <i>Aspergillus</i>	69
6.	Нетуберкулезные микобактерии	69
6.1	Представители рода микобактерий	72
6.2	Диагностический материал	72
6.3	Сбор мокроты	72
6.4	Методы микроскопии для выявления микобактерий в диагностическом материале	73
6.4.1	Микроскопия с окраской по Цилю-Нильсену	74
6.4.2	Методы люминесцентной микроскопии	74
6.5	Культуральные методы диагностики микобактериальных инфекций	74
6.5.1	Питательные среды	74
6.5.2	Идентификация микобактерий	77
6.5.3	Лекарственная чувствительность микобактерий и методы ее определения	78
6.5.4	Микробиологические методы определения ЛЧ	79
6.5.5	Этапы микробиологического и молекулярно-генетического обследования с целью диагностики и контроля химиотерапии заболеваний вызванных МБТК или НТМБ	82
6.5.6	Лабораторный отчет для МБТК или НТМБ	83
6.5.7	Меры биологической безопасности при работе с микобактериями	84
7.	Постаналитический этап микробиологического исследования	84
7.1	Рассмотрение результатов микробиологического исследования	85
7.2	Хранение и утилизация клинических проб	85
7.3	Отчеты о результатах	85
7.3.1	Общие положения	85
7.3.2	Содержание отчета	86
7.4	Выдача результатов микробиологического исследования	86
7.4.1	Общие положения	86
7.4.2	Сообщение о выделенных микроорганизмах	87
7.4.3	Сообщение о чувствительности выделенных микроорганизмов	88
7.5	Интерпретация результатов микробиологического исследования	88

8.	Антимикробная терапия	90
8.1	Антибактериальная терапия	90
8.1.1	Антибактериальная терапия при выделении <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	91
8.1.2	Антибактериальная терапия при выделении <i>Burkholderia cepacia complex</i>	92
8.1.3	Антибактериальная терапия при выделении <i>Achromobacter</i> spp.	92
8.2	Лечение аспергиллеза	93
8.2.1	Лечение аллергического бронхолегочного аспергиллеза	93
8.2.2	Лечение хронического аспергиллеза легких	94
8.2.3	Лечение инвазивного аспергиллеза	94
9.	Организация работы клинического микробиолога по микробиологической диагностике при муковисцидозе	94
10.	Критерии оценки качества оказания медицинской помощи по группам заболеваний или состояний	95
11.	Контроль качества лабораторных исследований	97
11.1	Внутрилабораторный контроль качества исследования	97
11.2	Внешняя оценка качества исследования	98
12.	Список литературы	99
	Приложение А. Состав рабочей группы	116
	Приложение А 2. Методология разработки клинических рекомендаций	119
	Приложение А 3. Связанные документы	124
	Приложение А 4. Требования к специалистам и вспомогательному персоналу	127
	Приложение А5. Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала	127
	Приложение А6. Ориентировочный перечень оборудования, реагентов и расходных материалов для микробиологической диагностики	128
	Приложение Б. Алгоритмы микробиологической диагностики	130
	Приложение Б1. Техника количественного посева мокроты	130
	Приложение Б2. Метод секторных посевов	132
	Приложение Б3. Некоторые культуральные и биохимические характеристики клинических штаммов <i>Pseudomonas fluorescens group</i> , <i>Pseudomonas stutzeri group</i> , <i>Pseudomonas alcaligenes group</i> .	133
	Приложение Б3. Алгоритм микробиологической диагностики <i>Pseudomonas</i> и других НГОБ.	134
	Приложение Б5. Характеристики клинических штаммов <i>B. cepacia complex</i> , <i>B. gladioli</i> и <i>Pandora</i> spp.	135
	Приложение Б6. Таблица Характеристики клинических штаммов <i>Ralstonia</i> spp. и <i>Cupriavidus</i> spp.	136
	Приложение Б7. Алгоритмы микробиологической диагностики <i>Burkholderia cepacia complex</i>	137
	Приложение Б8. Природная резистентность некоторых НГОБ	138

	Приложение В. Информация для пациентов	139
	Приложение В1. Правила сбора биоматериала на микробиологическое исследование	139
	Приложение В2. Правила сбора биоматериала для диагностики микобактериальной инфекции	140

Ключевые слова

Список сокращений

АБП	Антибактериальный препарат
АБЛА	Аллергический бронхо-легочный аспергиллез
АМП	Антимикробный препарат
БАЛ	Бронхоальвеолярный лаваж
БП	Агар Байрд-Паркера
ВДП	Верхние дыхательные пути
ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ДДМ	Диско-диффузионный метод
ДК	Дефибринированная кровь
ЖСА	Желточно-солевой агар
ИВЛ	Искусственная вентиляция легких
КА	Кровяной агар
КУМ	Кислотоустойчивые микроорганизмы
ЛУ	Лекарственная устойчивость
ЛЧ	Лекарственная чувствительность
МВ	Муковисцидоз
МГМ	Молекулярно-генетические методы
МЛС	Макролиды, линкозамиды, стрептограмин
МО	Медицинская организация
МПК	Минимальная подавляющая концентрация
МСА	Маннит-солевой агар
МБТК	Микобактерии туберкулезного комплекса
НГОВ	Неферментирующие грамотрицательные бактерии
НТМБ	Нетуберкулезные микобактерии
ПСБ2	Пенициллинсвязывающий белок 2
ПТП	Противотуберкулезные препараты
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
СОП	Стандартная операционная процедура
ХАЛ	Хронический аспергиллез легких
Ц-Н	Циль-Нильсен
ФК/ФД	Фармакокинетика/фармакодинамика
BCSA	<i>Burkholderia cepacia</i> Selective Agar, селективный агар

CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute, Институт клинических и лабораторных стандартов
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам
HCCA	Альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота
MAC	<i>Mycobacterium avium complex</i>
MALDI-TOF MS	Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация времяпролетная масс-спектрометрия
MBTP	Регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе
MENSURA	Mese Espanola de Normalizacion de la Suseptibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos – Испанский совет по стандартизации чувствительности и резистентности к антибиотикам.
MIC	Minimal inhibitory concentration, минимальная ингибирующая концентрация
NICE	National Institute for Health and Care Excellence - Национальный институт здравоохранения (Великобритания)
OFPBL Agar	Oxidation/Fermentation-Polymyxin-Bacitracin-Lactose Agar, окисление / ферментация - полимиксин-бацитрацин-лактозный агар
SCV	Small-colony variant, вариант мелких колоний
TCN	Тиофен-2 карбоксиловая кислота

Список сокращений микроорганизмов

<i>Acrophialophora fuispora</i>	<i>A. fuispora</i>
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	<i>A. xylosoxidans</i>
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>A. flavus</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i> ,	<i>A. fumigatus</i>
<i>Aspergillus niger</i>	<i>A. niger</i>
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	<i>B. cepacia complex</i>
<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>B. gladioli</i>
<i>Cupriavidus respiraculi</i>	<i>C. respiraculi</i>
<i>Exophiala dermatitidis</i>	<i>E. dermatitidis</i>
<i>Exophiala phaeomuriformisin</i>	<i>E. phaeomuriformisin</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
<i>Inquilinus limosus</i>	<i>I. limosus</i>
MRSA	Метициллин резистентный <i>S. aureus</i>
<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>
<i>Mycobacterium avium complex</i>	<i>M. avium complex</i>
<i>Pandoraea apista</i>	<i>P. apista</i>

<i>Pandoraea pnomenusa</i>	<i>P. pnomenusa</i>
<i>Pandoraea pulmonicola</i>	<i>P. pulmonicola</i>
<i>Pandoraea sputorum</i>	<i>P. sputorum</i>
<i>Penicillium emersonii</i>	<i>P. emersonii</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Ralstonia insidiosa</i>	<i>R. insidiosa</i>
<i>Ralstonia mannitolilytica</i>	<i>R. mannitolilytica</i>
<i>Ralstonia pickettii</i>	<i>R. pickettii</i>
<i>Rasamsonia argillacea</i>	<i>R. argillacea</i>
<i>Rodotorula mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>S. maltophilia</i>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
VISA	<i>S. aureus</i> с промежуточной резистентностью к ванкомицину

Термины и определения

В документе применяются термины в интерпретации, делающей их однозначными для восприятия медицинскими работниками. Для целей настоящего нормативного документа используются следующие термины и определения.

Клинические рекомендации (протокол ведения) по вопросам оказания медицинской помощи - нормативный документ системы стандартизации в здравоохранении, разработанный по отдельным заболеваниям или состояниям (группам заболеваний или состояний) и содержащий основанную на доказанном клиническом опыте информацию по вопросам профилактики, диагностики, лечения и реабилитации.

Пациент - физическое лицо, которому оказывается медицинская помощь или которое обратилось за оказанием медицинской помощи независимо от наличия у него заболевания и от его состояния.

Медицинская услуга - медицинское вмешательство или комплекс медицинских вмешательств, направленных на профилактику, диагностику и лечение заболеваний, медицинскую реабилитацию и имеющих самостоятельное законченное значение.

Качество медицинской помощи - совокупность характеристик, отражающих своевременность оказания медицинской помощи, правильность выбора методов профилактики, диагностики, лечения и реабилитации при оказании медицинской помощи, степень достижения запланированного результата.

Дыхательная система - совокупность органов, обеспечивающих функцию внешнего дыхания человека, осуществляющих газообмен между вдыхаемым атмосферным воздухом и кровью, циркулирующей по малому кругу кровообращения.

Инфекции дыхательных путей – острые инфекционные заболевания, возникающие вследствие попадания инфекционных агентов с помощью аэрогенного механизма заражения, то есть являющиеся контагиозными, поражающие отделы дыхательной системы как первично, так и вторично, сопровождающиеся воспалительными явлениями и характерными клиническими симптомами.

Инфекционный агент - живые микроорганизмы, вызывающие патологический процесс в организме хозяина с определенным инкубационным периодом и выраженностью клинических проявлений в зависимости от степени патогенности.

Лабораторная диагностика - совокупность методов, направленных на анализ исследуемого материала с помощью различного специализированного оборудования.

Микробиологическая диагностика - распознавание микробного агента на основе лабораторных методов исследования и научных данных о причине, условиях и механизме возникновения и распространения инфекционного заболевания.

Антимикробные препараты - лекарственные средства для избирательного подавления роста и размножения микроорганизмов.

1.Краткая информация

1.1 Определение

Кистозный фиброз (муковисцидоз) (МВ) - частое моногенное заболевание, обусловленное мутацией гена трансмембранного регулятора МВ (МВТР), который является каналом для активного перемещения ионов хлора, а также регулятором обратного всасывания ионов натрия и характеризующееся поражением экзокринных желез жизненно важных органов и систем и имеющее обычно тяжелое течение и прогноз [1].

1.2 Этиология и патогенез

В результате увеличения обратного всасывания натрия снижается и/или прекращается секреция жидкости, продуцируемый в бронхах секрет теряет жидкую часть и приобретает более густую консистенцию. Дефект секреции хлора влечет за собой повышение вязкости слизи. Степень эластичности слизи и скорость её перемещения зависят от концентрации ионов кальция и магния.

При МВ в патологический процесс в различной степени вовлекается весь организм, но в большей степени страдают органы дыхания, поджелудочная железа, печень, желчевыводящие пути, желудочно-кишечный тракт, потовые железы и половые органы.

Больные МВ представляют одну из самых тяжелых категорий пульмонологических пациентов. Поражение легких при МВ, в основе которого лежит хронический инфекционный процесс, по-прежнему остается основной причиной смертности больных.

Образующийся вязкий бронхиальный секрет приводит к развитию бронхиальной обструкции, на фоне которой развивается хроническая бронхиальная инфекция. Формируется порочный круг: бронхиальная обструкция – инфекция - гиперпродукция слизи - бронхиальная обструкция. Прогноз заболевания определяет интенсивная рациональная антибактериальная терапия, которая направлена на максимально возможное повышение или сохранение легочной функции, минимизацию числа обострений респираторных инфекций, улучшение качества и продолжительности жизни и перспективы для трансплантации легких [1,2,3].

1.3 Эпидемиология

1.3.1 Распространенность кистозного фиброза (муковисцидоза)

МВ наследуется по аутосомно-рецессивному типу. МВ наиболее распространен у лиц европеоидной расы, однако и у них его частота существенно варьируется в различных географических регионах и этнических группах.

На современном этапе описано приблизительно 2000 мутаций в гене МВТР, причем частота и спектр отличается значительными вариациями у различных этнических групп

и популяций. Установлено, что каждый 25-й представитель европеоидной расы является носителем гена МВ. Распространенность МВ в странах Северной Европы и Северной Америки составляет 1 на 2000—2500 новорожденных. Так, например, в Ирландии частота МВ составляет 1: 1800 новорожденных, в Финляндии – 1: 26000. МВ крайне редок среди коренного населения Азии и Африки (менее 1 на 100 000). По данным эпидемиологических исследований в России частота болезни в различных регионах колеблется от 1:8500 до 1:12900 новорождённых.

Если оба родителя гетерозиготные (являются носителями мутировавшего гена), то риск рождения больного МВ ребёнка составляет 25 %. Носители только одного дефектного гена (аллели) не болеют МВ. По данным исследований частота гетерозиготного носительства патологического гена равна 2—5 %.

Ежегодно в Москве рождается около 30 больных МВ, в России — 650, в США — 2000, во Франции, Англии, Германии — от 500 до 800, а в мире — более 45 000 больных детей [1,2].

Это заболевание является важной медико - социальной проблемой, что связано, с одной стороны, с большими моральными, физическими и материальными затратами семьи, органов здравоохранения и общества в целом на диагностику, лечение, реабилитацию и социальную адаптацию больных, с другой стороны, с впечатляющими успехами в изучении этой проблемы, что дает толчок к развитию как фундаментальных, так и прикладных наук медицинского направления.

1.3.2 Микробиология и эпидемиология хронической респираторной инфекции при муковисцидозе

Спектр бактериальных патогенов при МВ довольно специфичен [2]. В классическом варианте в раннем возрасте развивается инфекция, вызванная *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), затем с увеличением возраста присоединяется инфекция, обусловленная *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) и *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*). С конца 90-х годов эпидемиология легочных инфекций у больных МВ стала значительно более сложной. Наряду с распространенными возбудителями, такими как *S.aureus*, *H. influenzae* и *P.aeruginosa*, в последние годы всё большее клиническое значение приобретают неферментирующие глюкозу грамотрицательные бактерии (НГОВ) *Burkholderia cepacia complex* (*B.cepacia complex*), *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*), *Achromobacter xylosoxidans* (*A.xylosoxidans*), нетуберкулезные микобактерии (НТМБ) [4]. Помимо бактериальных агентов при исследовании респираторных биосубстратов нижних дыхательных путей больных МВ все чаще выделяют микромицеты.

Частота выделения микромицетов из респираторных субстратов больных МВ варьирует от 6 до 57% [5]. Средний возраст пациента на момент первого эпизода выделения микромицетов из респираторных субстратов составляет 12 лет, частота микотической колонизации увеличивается по мере взросления [6].

Описано более 20 родов дрожжевых и мицелиальных микромицетов, полученных из мокроты и бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) больных МВ [7]. Наиболее часто выделяют *Aspergillus* spp. - 60%. В последнее десятилетие возросла частота выделения и других микромицетов, таких как *Exophiala dermatitidis*, *Scedosporium* spp, *Rodotorula mucilaginosa*, *Fusarium* spp. *Rasamsonia argillacea*, *Penicillium emersonii* и *Acrophialophora fusicapna* были получены исключительно у больных МВ [8]. Наибольшее клиническое значение имеет выявление в респираторных субстратах больных МВ грибов рода *Aspergillus*. Выделение *Candida* spp. из мокроты и БАЛ свидетельствует о поверхностной колонизации дыхательных путей, не требующей медикаментозного лечения. Роль других видов микромицетов в патологии легких у больных МВ изучена недостаточно.

При несвоевременной диагностике поражения нижних дыхательных путей больных с МВ микромицетами и в отсутствие адекватного лечения в легких формируются проксимальные бронхоэктазы, отмечается быстрое прогрессирование бронхолегочного процесса, нарастание вентиляционных расстройств.

В настоящее время одной из главных причин ухудшения течения заболевания и летального исхода является инфекция, вызванная бактериями *B. ceracia complex*. Больные, инфицированные *B. ceracia complex*, являются источником инфекции и представляют опасность для других пациентов. В последние годы возросла клиническая значимость для жизни больных и других представителей грамотрицательных неферментирующих бактерий - *Achromobacter* spp., *S. maltophilia*.

Современная концепция поражения легких при МВ указывает, что определенную роль в повреждении легочной ткани играют иммунные процессы. Иммунологические нарушения значительно возрастают при длительной колонизации нижних дыхательных путей *P. aeruginosa*. В процессе своего размножения микроколонии этого микроорганизма продуцируют вирулентные факторы, которые повреждают эпителий нижних дыхательных путей, стимулируют выработку медиаторов воспаления, повышают проницаемость капилляров, вызывают лейкоцитарную инфильтрацию.

По данным Регистра 2015 г., в который включены данные 2916 больных (2877 живых и 39 умерших), возраст больных колеблется от 0,1 до 66,0 лет. Средний возраст в 2015 году составил $12,1 \pm 9,5$ лет, медиана возраста – 9,7 (13,2) лет. Доля взрослых пациентов (≥ 18 лет) – 24,6 %. Частота инфицирования дыхательных путей различной флорой

представлена в порядке убывания: *S. aureus* – 56,0 %, *P. aeruginosa* (хроническое инфицирование) – 32,1 %, *P.aeruginosa* (интермиттирующее инфицирование) - 15,1%, *B.cepacia complex* – 6,6 %, метициллин-резистентный *S.aureus* (MRSA) - 6,4%, *Achromobacter* spp. - 3,9%, *S. maltophilia* – 3,4 %, НТМБ - 0,9 %. При оценке микробиологического профиля респираторного тракта выявлено возрастание частоты высева грамотрицательной флоры с увеличением возраста больных. Наибольшая частота инфицирования *S.aureus* наблюдалась в возрастной группе 12-16 лет, где она составила 64,5%, *P.aeruginosa* в 24-28 лет с частотой 55,0%, максимальная частота инфицирования *B.cepacia complex* в 24-28 лет – 22,6 %, *S.maltophilia* в 16-20 лет – 5,6%, а частота обнаружения *Achromobacter* spp. достигала своего пика у пациентов старше 36 лет, где его частота составила 14,3 %. Данные о частоте инфицирования нижних дыхательных путей различной микрофлорой у пациентов с МВ в различных возрастных группах представлены на рис.1.

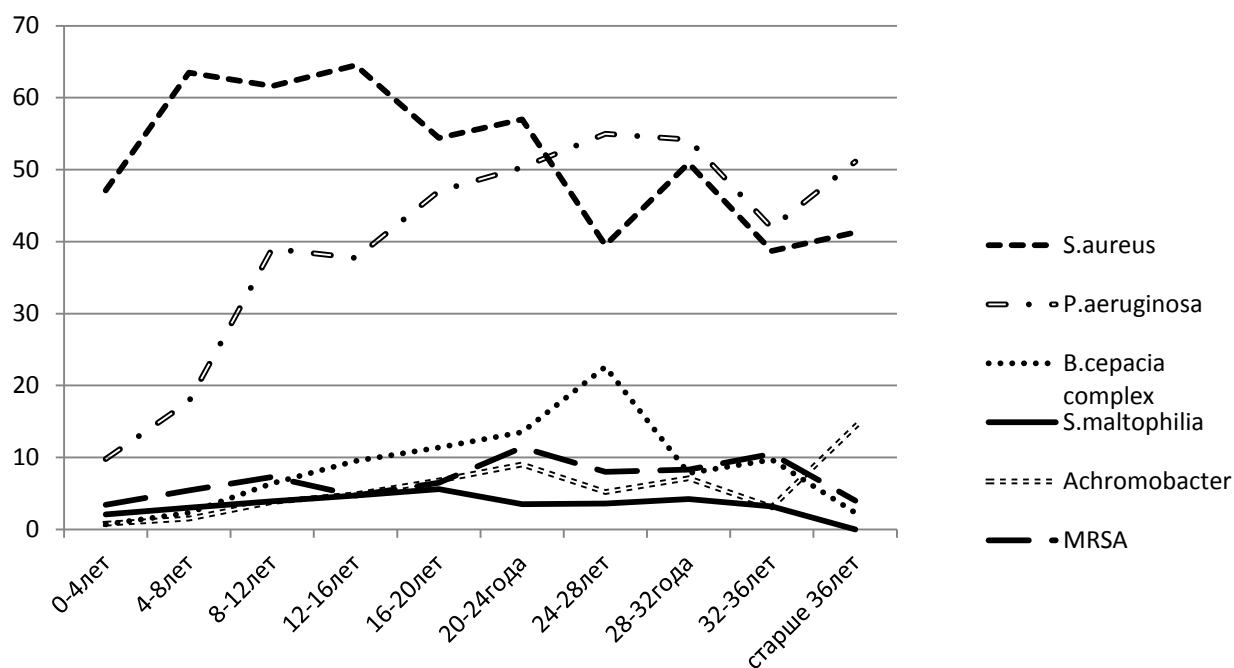


рис.1. Частота инфицирования нижних дыхательных путей различной микрофлорой у пациентов с МВ в различных возрастных группах.

Данные о частоте выделения микромицетов из респираторного тракта больных МВ в национальном Регистре в настоящее время не отражены, тем не менее, результаты проведенного НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина в 2014-2016 гг. пилотного исследования свидетельствуют, что колонизация дыхательных путей *Aspergillus* spp. возникает у 22% больных МВ, а различные варианты аспергиллеза – у 9,2% [9].

Микроорганизмы, инфицирующие нижние дыхательные пути больного МВ, определяют лечение, качество жизни, перспективы трансплантации и общую выживаемость.

Точная и своевременная идентификация возбудителей инфекции дыхательных путей имеет значение для обеспечения своевременного начала адекватного лечения антибактериальными препаратами (АПБ), надлежащего микробиологического мониторинга с целью организации инфекционного контроля и профилактики распространения патогенных микроорганизмов среди больных МВ [10].

1.4 Кодирование по МКБ 10

Кистозный фиброз (E84):

E84.0 - Кистозный фиброз с лёгочными проявлениями;

E84.1 - Кистозный фиброз с кишечными проявлениями;

E84.8 - Кистозный фиброз с другими проявлениями;

E84.9 - Кистозный фиброз неуточнённый.

2. Микробиологическая диагностика

2.1 Задачи микробиологической диагностики

Задачами микробиологической диагностики хронической респираторной инфекции при МВ являются:

- Выделение и идентификация бактерий и грибов которые, колонизируя нижние дыхательные пути больных МВ, ведут к ухудшению дыхательной функции, могут быть источником инфицирования других пациентов с МВ и приводить к осложнениям после трансплантаций;
- Обеспечение раннего выявления первичной колонизации *P.aeruginosa* , *B.ceracia complex* и микромицетами [11];
- Предоставление рекомендаций для антимикробной терапии (профиль антибиотикочувствительности, выявление механизмов резистентности и проведение экспертной оценки результатов исследования).

В таблице 1 представлены рекомендации по методам идентификации и определению чувствительности микроорганизмов, которые наиболее часто присутствуют в нижних дыхательных путях при хронических респираторных инфекциях больных с МВ.

Таблица 1

Ведущие патогены хронических респираторных инфекций при МВ и рекомендации по микробиологическому исследованию.

Микроорганизм	Метод идентификации	Определение чувствительности к антимикробным препаратам
<i>H. influenzae</i>	Фенотипический	Проводится определение чувствительности и выявление β-лактамаз
<i>S. aureus</i>	Фенотипический Иммунологический Молекулярно-генетический	Проводится определение чувствительности 2 раза в год. Скрининг на метициллинорезистентность с цефокситином - при каждом исследовании культуры или латекс-агглютинация для детекции ПСБ2 или определение <i>tesA</i> -гена.
<i>P. aeruginosa</i>	Фенотипический	Проводится определение чувствительности
<i>B. cepacia complex</i>	Фенотипический + Молекулярно-генетический (настоятельно рекомендуется)	Проводится определение чувствительности
<i>Achromobacter</i> spp.	Фенотипический + Молекулярно-генетический (настоятельно рекомендуется)	Проводится определение чувствительности
<i>S. maltophilia</i>	Фенотипический	Проводится определение чувствительности
<i>B. gladioli</i> <i>Ralstonia</i> spp. <i>Pandora</i> spp. <i>Inquillinus limosus</i>	Молекулярно-генетический	Определение чувствительности проводится по запросу
<i>S. pneumoniae</i>	Фенотипический	Проводится определение чувствительности, определение чувствительности к пенициллину диском с оксациллином, для β-лактамов определение МПК
<i>Enterobacterales</i>	Фенотипический	Проводится определение чувствительности и выявление основных значимых механизмов резистентности при наличии показания
<i>Aspergillus</i> spp. и другие микромицеты	Общепринятый	Чувствительность к антимикотикам проводится в специализированных лабораториях
Быстрорастущие микобактерии	Общепринятый Молекулярный	Исследования проводятся в специализированных лабораториях

2.2.Эпидемиологическая характеристика ведущих патогенов при МВ

В таблице 2 представлены данные о патогенности и контагиозности основных микроорганизмов, выделенных из респираторного тракта у больных МВ.

Таблица 2

Патогенность и контагиозность основных микроорганизмов, выделенных из респираторного тракта у больных МВ

Микроорганизм	Частота выделения	Этиологическая значимость	Способность к хронизации инфекции	Способность к передаче	Риск осложнений после трансплантации
<i>H. influenzae</i>	35%	Вариабельная	Вариабельная	Да, редко	-
<i>S. aureus</i>	70%	Да	Да	Да (MRSA)	+
<i>P. aeruginosa</i>	50%	Да	Да	Да, редко	+
<i>B. cepacia complex</i>	<1-5%	Да	Да	Да, часто	+++
<i>B. gladioli</i>	<1%	Вариабельная	Вариабельная	Нет	++
<i>S. maltophilia</i>	3-7%	Вариабельная	Вариабельная	Да, редко	+
<i>A. xylosoxidans</i>	3%	Вариабельная	Вариабельная	Да, редко	+
<i>Pandorea</i> spp.	<1%	Вариабельная	Вариабельная	Да, редко	Иногда регистрируется
Нетуберкулезные микобактерии	<8%	Вариабельная	Да	Да, редко	++
<i>M. abscessus</i>	<3%		Да		+++
<i>A. fumigatus</i>	29%*	Вариабельная	Да	Нет	+++
<i>A. terreus</i>	0,5%*	Вариабельная	Да	Нет	Не регистрируется
<i>Scedosporium/Lomentospora complex species</i>	4%*	Вариабельная	Да	Нет	+
<i>Wangiella (Exophiala) dermatitidis</i>	1%*	Вариабельная	Да	Нет	+

*S. Ziesing, S. Suerbaum, L. Sedlace *Fungal epidemiology and diversity in cystic fibrosis patients over a 5-year period in a national reference center Medical Mycology*, 2016, 54, 781–786

2.2.1 Staphylococcus aureus -

один из первых бактериальных возбудителей, колонизирующий дыхательные пути пациентов с МВ. Штаммы *S. aureus* колонизируют дыхательные пути у 37% детей в возрасте от 1 до 19 лет. При этом верхние дыхательные пути являются резервуаром для инфицирования нижних дыхательных путей. Колонизация дыхательных путей может

происходить контактным путем, в том числе от людей, не страдающих МВ, особенно в рамках тесных контактов в случае носительства штаммов членами семьи пациента. Также возможно распространение в условиях стационара, как от носителей штаммов (в т.ч. MRSA), так и через медицинское оборудование.

Возбудитель устойчив во внешней среде. При кипячении сохраняется в течении 5 минут, в высохшей мокроте – недели, месяцы, в 3% растворе фенола – 30 минут, в 50% спирте – 10 минут.

2.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Естественный ареал обитания *P. aeruginosa* – почва и вода. Имеет ограниченную потребность в питательных веществах. Способна сохранять жизнеспособность в дезинфицирующих растворах. Чувствительна к высушиванию, действию хлорсодержащих дезинфектантов, высокой температуре. Сохраняет жизнеспособность на поверхности линолеума – 2 суток, в пыли – 2-3 суток, в тканях и биологических жидкостях до 150 суток, в дистиллированной воде более 2,5 месяцев с сохранением способности к размножению, на руках медперсонала после осмотра пациента с *P. aeruginosa* до 1 часа. Возможна передача от пациента к пациенту при совместной госпитализации и/или длительных контактах. Возможно распространение в условиях стационара с вовлечением медицинского персонала (носительство на задней стенке глотке, слизистой верхних дыхательных путей (ВДП), оборудования (в т.ч. фонендоскоп)). Кроме того, потенциально опасны в плане инфицирования места повышенной влажности, плавательные бассейны, пластиковые игрушки для ванной, раковины, унитазы, предметы обихода, дверные ручки, сырые овощи, выращенные на зараженной почве, земля в цветочных горшках, а также любой объект, загрязненный *P. aeruginosa*.

2.2.3 *Burkholderia cepacia complex*

Бактерии группы *Burkholderia cepacia complex* обитают повсеместно, широко распространены в почве и часто выступают в качестве фитопатогенов. Могут расти в антисептических и дезинфицирующих растворах, дистиллированной воде. Сохраняются в воздухе в форме аэрозоля. Могут находиться в жидких резервуарах и влажной окружающей среде. В небольшом количестве могут присутствовать во многих нестерильных продуктах питания в медицинской организации (МО). Сохраняются на поверхности свыше 24 часов.

Клинические проявления могут варьировать от бессимптомного носительства до быстрой фатальной септицемии. Именно поэтому необходимо регулярное микробиологическое обследование больных МВ, так как отсутствие симптомов заболевания не является гарантией отсутствия заражения.

Инфекция чаще наблюдается у лиц старше 15 лет, но может встречаться и у детей более раннего возраста. Передача может осуществляться как в условиях МО (основной путь) при контактах с инфицированными пациентами, так и вне его (в общественных местах, природных резервуарах инфекции). Штаммы *Burkholderia cepacia complex* не представляют угрозы для членов семьи и - окружения больного, за исключением пациентов с иммунодефицитными состояниями.

Доказан симбиоз *Burkholderia cepacia complex* со свободно живущими амебами, причем последние могут служить источником инфекции для больных МВ. Источники инфекции могут быть обнаружены в воде, почве, сырых и влажных местах. Инфицирование чаще происходит контактным путем через физиологические жидкости или непрямыми путями: через раковины, унитазы, предметы обихода, полотенца, дверные ручки. Особенно опасны влажные поверхности санузлов и медицинское оборудование – маски, трубки, многократные аппараты и их детали. При эпидемических вспышках в больницах – емкости с жидкостями.

2.2.4 *Achromobacter* spp.

Бактерии рода *Achromobacter* spp. являются оппортунистическими патогенами. Многие виды выделяются из окружающей среды, воды. Заражение может осуществляться как от пациента к пациенту при длительных контактах и совместной госпитализации в условиях стационара, так и через природные резервуары инфекции [12].

2.2.5 *Stenotrophomonas maltophilia*

Бактерии *S.maltophilia* широко распространены в окружающей среде. Выделены из водных объектов, почвы, сырого молока. Могут приводить к развитию инфекций у иммуносупрессированных лиц в условиях стационара. У пациентов с МВ возможно заражение как в условиях ЛПУ, от пациента к пациенту при контактах и совместной госпитализации, через медицинское оборудование, так и из естественных мест обитания окружающей среды[12].

2.2.6 Другие представители неферментирующих грамотрицательных бактерий

***Ralstonia* spp., *Pandoraea* spp. и *Cupriavidus* spp.**

Являются близкородственными видами, имеют генетическое сходство с бактериями рода *Burkholderia* spp. Редко выделяются у пациентов с МВ, однако описаны случаи выделения при хронической инфекции. Нет достаточного количества исследований, указывающих на возможность передачи штаммов от пациента к пациенту. Обитают во внешней среде, выделены из водных объектов и почвы[13].

***Pandoraea* spp.** - обитатели окружающей среды, водных объектов и почвы. Распространение у пациентов с МВ оценить достаточно сложно. Патогенетический

потенциал при МВ не до конца изучен. Описаны случаи хронического инфицирования дыхательных путей, а также случай бактериемии у ребенка с МВ. Описана передача штаммов от пациента к пациенту [14].

Inquillinus limosus – обитатель окружающей среды, выделен из водных объектов, донных отложений. Описаны случаи выделения у пациентов с МВ. Нет данных, свидетельствующих о возможности передачи штаммов от пациента к пациенту. Патогенетический потенциал при МВ мало изучен, однако описаны случаи длительного носительства [15,16,17,18,19,20].

2.2.7 *Haemophilus influenzae*

Штаммы, выделяются со слизистых верхних дыхательных путей и могут быть причиной инфекций верхних дыхательных путей и ЛОР-органов. Является одним из первых патогенов у пациентов с МВ. Около 20% детей с МВ в возрасте до 1 года колонизированы штаммами *H. influenzae*, распространенность у детей от 2 до 5 лет составляет 32% и с возрастом снижается до 10% у взрослых.

2.2.8 Другие бактерии

Если при внебольничных пневмониях у пациентов без МВ наиболее частыми этиологическими патогенами являются *H. influenza* и *S. pneumoniae*, то при МВ пневмококки играют менее важную роль.

Встречаемость *S. pneumoniae* у пациентов с МВ низкая - до 5,5%. Самая высокая высеваемость *S. pneumoniae* - у детей до 10 лет. У данной категории пациентов он может играть важную роль при МВ. Инфицирование или колонизация *S. pneumoniae*, как правило, проходящие и связаны с острой респираторной инфекцией [21]. Определение чувствительности *S. pneumoniae* и интерпритацию клинического значения рекомендуется проводить только в случае массивного роста ($> 10^6 - 10^7$ КОЕ/мл).

Аналогичный подход рекомендуется применять и к представителям порядка *Enterobacterales*, которые редко являются этиологическим фактором обострения бронхо-легочного процесса при МВ, в частности, у взрослых пациентов. Обнаруживаются представители порядка *Enterobacterales* чаще у детей от 0 до 5 лет. Они выделяются приблизительно у 1 - 4% пациентов с МВ и чаще связаны с обострением течения респираторной инфекции [11,13].

2.2.9 Грибы

Aspergillus spp. присутствуют повсеместно, обладают высокой метаболической активностью и адаптационной способностью, обильно спороносят в различных условиях, очень устойчивы к воздействиям внешней среды. Эти грибы хорошо растут в почве, в компосте, органических отбросах, активно колонизируют пищевые продукты (специи,

кофе, чай, фрукты, мука). Наличие широкого спектра ферментов обеспечивает этим микромицетам возможность использовать в качестве пищи различные субстраты: ткани, древесину, обои, масляную и вододисперсионную краски, штукатурку, побелку, цемент. Многие *Aspergillus* spp. способны к росту в обеднённых питательными веществами средах, они развиваются на стенах, потолке, оконных рамах, трубах отопления и т.д. Споры грибов часто обнаруживают в пыли, на растениях, строительных материалах, в кондиционерах или обогревателях, в системах вентиляции и водоснабжения, а также медицинских аппаратах (искусственной вентиляции легких (ИВЛ), небулайзерах).

Aspergillus spp. являются одними из наиболее частых контаминантов жилых помещений [6]. В результате исследования в Северной Америке выявлено, что от 27 до 36% домов имеют плесневое поражение. В Европе наличие грибов обнаружено в 15-46% домов. При плесневом поражении жилых помещений концентрация спор *Aspergillus* spp. в воздухе увеличивается многократно.

Согласно проведенным в Санкт-Петербурге исследованиям, частота выявления *Aspergillus* spp. в воздухе жилых помещений с визуальными признаками плесневого поражения составила 93%, помещений без визуальных признаков плесневого поражения - 72%. При этом наиболее часто выделяли *A. niger* (41%) [7].

Грибы рода *Aspergillus* могут колонизировать дыхательные пути больных МВ или вызывать различные заболевания, в зависимости от состояния иммунной системы пациента.

Согласно международным рекомендациям, о колонизации дыхательных путей у больных МВ свидетельствует выявление грибов рода *Aspergillus* в $\geq 50\%$ образцов мокроты или в течение ≥ 6 месяцев в год, отсутствие инструментальных признаков ухудшения легочной функции, а также отсутствие клинических признаков обострения МВ [8]. В настоящее время нет убедительных данных о негативном влиянии колонизации *Aspergillus* spp. дыхательных путей на функцию дыхания больных МВ. Вопрос о необходимости проведения антифунгальной терапии, ее длительности, выборе препарата при колонизации *Aspergillus* spp. дыхательных путей больных МВ не решен [9].

Наиболее частый вариант аспергиллеза у больных МВ - аллергический бронхолегочный аспергиллез (АБЛА). Частота АБЛА у подростков и взрослых больных МВ – 10-15%, у детей младшего возраста встречается реже [22]. Основные возбудители АБЛА – *A. fumigatus* и *A. niger* [23]. Без лечения АБЛА приводит к необратимой дыхательной недостаточности.

Наличие бронхоэктазов, булл и полостей в легких больных МВ способствует развитию хронического аспергиллеза легких (ХАЛ). ХАЛ развивается у 2-5% больных МВ.

Основные возбудители ХАЛ – *A. fumigatus*, *A. flavus* и *A. niger*. Без лечения ХАЛ приводит к ухудшению качества жизни больных МВ и увеличению летальности.

У больных МВ инвазивный аспергиллез легких возникает редко (0,5-1%), как правило, при выраженной иммуносупрессии (длительное применение системных стероидов, трансплантация легких). Без лечения инвазивный аспергиллез всегда заканчивается летальным исходом. Основные возбудители инвазивного аспергиллеза – *A. fumigatus*, *A. flavus* и *A. niger*.

Scedosporium spp. Этиологически значимы *Scedosporium apiospermum* (совершенная форма, *Pseudallescheria boydii*) – медленно растущий плесневый микромицет. Распространен повсеместно, сапрофитирует в почве, на корнеплодах, в органических отходах. Благодаря своей способности к росту при низкой концентрации кислорода и высоком осмотическом давлении в окружающей среде присутствует в стоячих, сточных водах. Частота выделения грибов *Scedosporium* spp. из респираторного тракта – 3,4%-17,4%, наблюдается у пациентов старше 14 лет и увеличивается с возрастом [24,25]. Влияние колонизации *Scedosporium* spp. на функцию легких не доказано [26]. Тем не менее, описаны единичные случаи пневмонии, вызванной *Scedosporium* spp. у больных мковисцидозом и несколько случаев диссеминированной инфекции, обусловленной *Scedosporium* spp. у больных МВ после трансплантации легких [27, 28, 29, 30].

Exophiala spp. Этиологически значимы *E. dermatitidis* и *E. phaeomuriformis*. Термофильный (идеальные условия роста 40°C-42°C) пигментированный дрожжеподобный микромицет. Распространен повсеместно, в почве, на растениях, в органических отходах, предпочитает теплые влажные условия, широко распространен во влажных саунах, ваннах, посудомоечных машинах. Частота выделения грибов рода *Exophiala* из респираторного тракта 5,8- 6,2% - 19% [31,32,33].

Роль *Exophiala* spp. в патологии легких у больных МВ требует дальнейшего изучения.

2.2.10 Нетуберкулезные микобактерии

Большинство видов являются свободно живущими в окружающей среде, воде и почве. Могут выделяться из мест повышенной влажности, в т.ч. домашних аквариумов. Возможна передача штамма от пациента к пациенту, особенно в рамках тесных контактов. Наибольшее клиническое значение имеют штаммы *Mycobacterium abscessus* (*M. abscessus*) и *Mycobacterium avium complex* (*M. avium complex*) [11].

3. Сбор, хранение и транспортировка образцов биоматериала

3.1 Методы отбора образцов

Сбор и транспортировку образцов (проб) биоматериала проводят согласно Методическим указаниям МУ 4.2.2039-05 «Техника сбора и транспортирования биоматериалов в

микробиологические лаборатории». Для пациентов с МВ используются такие же транспортные среды и муколитики, которые используются для пациентов без МВ.

Для микробиологического исследования рекомендуются следующие респираторные образцы:

В	• Свободно отделяемая мокрота является оптимальным биоматериалом для микробиологического исследования респираторных инфекций при МВ. Уровень достоверности доказательства 2 - [34].
----------	---

Комментарий: Для вызывания продуктивного кашля рекомендуют применять дыхательную физиотерапию. Если нет свободно откашливаемой мокроты, допускается сбор индуцированной мокроты и носоглоточного аспирата после физиотерапии.

С	• Если получение свободно отделяемой мокроты затруднено или пациент не может откашливать мокроту (дети до 7-10 лет), то рекомендуется исследовать мазок со слизистой глубоких отделов задней стенки глотки. Уровень достоверности доказательства 2 - [35].
----------	--

Комментарий: техника взятия - помещают тампон на заднюю стенку глотки, вызывают кашель и после не менее трех кашлевых толчков удаляют тампон, на который были собраны выделения при кашле.

Примечание. Не использовать этот способ получения респираторных образцов у детей, которые могут откашливать мокроту!

В	• Образцы, полученные при бронхоскопии - бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) считается «золотым» стандартом для исследования респираторных образцов при МВ.
----------	--

Комментарий: Для пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких, для микробиологического исследования рекомендуется взятие эндотрахеального аспирата. Несмотря на то, что БАЛ является эталонным методом для сбора респираторных образцов, данный метод выполняется редко из-за его инвазивности [36].

Правила сбора биоматериалов для культурального исследования приведены в Приложении В.

3.2 Транспортировка и хранение респираторных образцов.

С	• Полученные образцы из нижних дыхательных путей рекомендуется как можно раньше отправлять в микробиологическую лабораторию. Если посев биоматериала откладывается более чем на 2-3 часа, образцы следует хранить при температуре 4–8 °С (но не более 24ч от момента взятия). Уровень достоверности доказательства 3 [37].
----------	---

С	Результаты культивирования респираторных образцов, доставленных после истечения допустимого времени хранения и при нарушении условий транспортировки, рекомендуется интерпретировать с осторожностью. Уровень достоверности доказательства 4 [38].
----------	--

Комментарии: *Национальные и зарубежные руководства рекомендуют транспортировать и проводить подготовку к посеву респираторных образцов как можно быстрее после сбора и не дают конкретных рекомендаций для образцов от пациентов с МВ. При задержке посева более, чем на 2-3 часа, хранение образцов в условиях холодильника предпочтительнее хранению при комнатной температуре.*

В таблице 3 приведены рекомендуемые транспортные системы для сбора биоматериала, условия и время транспортирования респираторных образцов.

Таблица 3

Транспортировка и хранение респираторных образцов при МВ

Биоматериал	Транспортные системы для сбора образца/минимальный объем пробы	Транспортировка (условия, t° С, время)	Хранение (t° С, время)
Свободно отделяемая мокрота	Стерильный контейнер/ >1мл	Обычная атмосфера, комнатная температура (18-25°С), ≤ 2 ч	4–8 °С ≤ 24 ч
Мазки из глубоких отделов задней стенки глотки	Тампон с транспортной средой	Обычная атмосфера, комнатная температура (18-25°С), ≤ 24 ч	Комнатная температура, ≤ 24 ч

В условиях централизации микробиологических исследований респираторные образцы часто отправляют на значительные расстояния в различных условиях окружающей среды. Если исследование не может быть выполнено на месте получения образца, они должны транспортироваться при температуре 4-8°С в течение не более 24 часов.

В дополнение к общепринятой маркировке проб биоматериала необходимо указать, что биоматериал собран от больного с МВ, для обеспечения применения соответствующих питательных сред и времени инкубации чашек с первичными посевами биоматериала.

- Образцы, взятые при бронхоскопии, рекомендуется исследовать независимо от их качества. Если исследуется образец неудовлетворительного качества, рекомендуется сообщить об этом в лабораторном отчете;**
- Если получен мазок в пробирке с транспортной средой с маркировкой «мокрота», необходимо уточнить тип направляемого клинического**

материала: мокрота или мазок из глубоких отделов задней стенки глотки.

Частота, с которой рекомендуется исследовать респираторные образцы у больных МВ, определяется возрастом больного и тяжестью его заболевания. Микрофлора, являющаяся этиологически значимой для МВ, стабильна у пациентов с хронической колонизацией *S. aureus* и *P. aeruginosa* на протяжении длительного промежутка времени (месяцев и лет).

Решение о необходимой частоте микробиологического исследования возложено на клиницистов и микробиологическую службу для выработки наиболее оптимальной кратности в каждом конкретном случае.

Как минимум, ежегодное микробиологическое исследование должно быть нормой для пациентов без проявлений респираторной инфекции.

С	• Рекомендуется следующая частота микробиологического обследования: 1 раз в 3 месяца от амбулаторных пациентов без клинических проявлений респираторной инфекции; • более частое микробиологическое исследование рекомендуется проводить по клиническим показаниям после согласования с клиницистами. Уровень достоверности доказательства 4 [12].
----------	---

3.3 Микроскопическое исследование

3.3.1 Окраска по Граму

Учитывая наличие хронической бактериальной колонизации дыхательных путей больных МВ, микроскопическое исследование образцов мокроты на наличие бактерий проводить нецелесообразно.

В	• Существует недостаточно доказательств достоверности рутинного использования микроскопии мазков респираторных образцов, окрашенных по Граму, в качестве маркера качества мокроты и предполагаемого выделения тех или иных микроорганизмов. Учитывая наличие хронической бактериальной колонизации дыхательных путей больных МВ, микроскопическое исследование образцов мокроты на наличие бактерий проводить не рекомендуется. Уровень достоверности доказательства 2+ [39].
----------	---

Комментарий: При необходимости, микроскопическое исследование мазка мокроты с окраской по Граму может быть выполнено по обычным микробиологическим критериям (подсчет лейкоцитов, эпителиальных клеток). Если в мазке >10 эпителиальных клеток и до 25 лейкоцитов, то образец необходимо в любом случае посеять на питательные среды, сообщить лицу, направившему биоматериал, о плохом качестве доставленной

мокроты с указанием необходимости повторного сбора мокроты, особенно в случае отрицательного результата посева [40].

С	• Не рекомендуется отбраковывать образцы мокроты и мазки с задней стенки глотки, основываясь на оценке мазка, окрашенного по Граму, из-за их малой информативности у пациентов с МВ. Уровень достоверности доказательства 4 [41].
----------	--

Комментарий:

Этиологически значимые микроорганизмы высеваются у пациентов с МВ в 90% случаев, несмотря на то, что по результатам микроскопии приблизительно 40% образцов могут быть признаны неудовлетворительными [42].

3.3.2 Микроскопическое исследование на грибы. Люминесцентная микроскопия.

Учитывая биологические особенности плесневых грибов (летучесть спор), во избежание загрязнения воздуха лаборатории рекомендуется использовать для работы с культурами плесневых грибов отдельные боксы биологической безопасности 2-го класса.

Методы исследования биоматериалов на наличие микромицетов.

1. Виды исследуемых биоматериалов.

Для выявления микромицетов используют следующие биоматериалы: мокрота, промывные воды бронхов, БАЛ, эндотрахеальный аспират, биоптаты, операционный материал.

2. Прямое микроскопическое исследование биоматериала.

Прямая микроскопия биоматериала – первый и очень важный этап микологической диагностики. Используется метод «влажный мазок». С помощью бактериологической петли отбирают фрагмент образца биоматериала и помещают на предметное стекло. При этом обращают внимание на возможное наличие в пробе мокроты или осадка промывных вод бронхов сгустков или иных включений, в том числе с примесью крови. Для микроскопирования используют именно эти участки пробы материала. Затем добавляют к капле материала на предметном стекле каплю просветляющего раствора: 10% раствор КОН в 10% водном растворе глицерина (K.J.Kwon-Chung, J.Bennett. Medical Mycology, 1992) и накрывают покровным стеклом. Далее просматривают препарат в световом микроскопе, используя объектив 10х, затем 40х. Отмечают возможное наличие мицелия гриба. Грибы рода *Aspergillus* в биоматериале обычно образуют септированные гифы, ветвящиеся дихотомически под острым углом.

Из каждой пробы биоматериала готовят не менее 2-х препаратов.

Наилучшие результаты выявления грибов в биоматериале дает метод люминесцентной (флуоресцентной) микроскопии. В приготовленный в соответствии с изложенным

препарат биоматериала добавляют каплю раствора калькофлюора белого, накрывают покровным стеклом и микроскопируют во флуоресцентном микроскопе, имеющем набор светофильтров для выявления грибов. Гифы грибов, клеточные стенки которых содержат хитин, ярко светятся в поле зрения микроскопа [34,35,36].

3.4 Питательные среды для выделения микроорганизмов из образцов респираторного тракта

Основным микробиологическим методом диагностики хронической респираторной инфекций является культуральный метод с посевом респираторных образцов на неселективные, селективные и хромогенные питательные среды.

Перечень питательных сред для выделения основных этиологически значимых патогенов респираторных инфекций при МВ представлен в таблице 4.

Посев на неселективный агар рекомендуется для общей оценки всей выросшей бактериальной микробиоты – кровяной агар с добавлением 5% дефибринированной крови животных (основа колумбийский агар или триптиказо-соевый агар). Применение универсальных хромогенных сред позволяет выявлять и дифференцировать ряд энтеробактерий, *S.aureus*, а также бактерии родов *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* в первичном посеве. Для выделения грибов используют агар Сабуро с антибиотиками.

Перечень питательных сред для выделения основных этиологически значимых патогенов
Перечень питательных сред может быть изменен на аналоги отечественного или зарубежного производства при условии сохранения ростовых, дифференцирующих, селективных свойств новой питательной среды, включенной в схему посева в зависимости от ее назначения.

3.5 Посев биоматериала

Техника посева биологического материала на питательные среды предусматривает использование специальных ручных микробиологических приемов или посевных автоматизированных станций, разрешенных к использованию на территории РФ, позволяющих:

- получить рост присутствующей в образце микрофлоры для общей оценки бактериальной флоры;
- выявить ориентировочно количественный состав присутствующих в образце микроорганизмов.

Рекомендуемые питательные среды для основных этиологически значимых микроорганизмов респираторных инфекций при МВ

Этиологический агент	Питательные среды
Все бактерии для общей оценки бактериальной флоры	5% кровяной агар (КА)
Бактерии	
<i>Staphylococcus aureus</i>	- Желточно-солевой агар (ЖСА) или Манитол-солевой агар (МСА) / Хромогенный агар для стафилококков; - Колумбийский агар с ДК (для <i>S. aureus</i> SCV* фенотипа)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Шоколадный агар
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Кровяной агар с налидиксовой кислотой для угнетения роста грамотрицательной микрофлоры (CNA)
<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Achromobacter</i> spp. Другие НГОб**	- Агар Мак - Конки или агар Эндо - Хромогенная среда
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	Селективная среда: <i>B. cepacia</i> агар или BCSA или OFPBL Agar или <i>Burkholderia cepacia</i> medium
<i>Mycobacterium</i> spp	
<i>Mycobacterium abscessus</i> <i>Mycobacterium avium complex</i>	Культивирование в специализированных лабораториях противотуберкулезной службы на средах Левенштейна-Йенсена, Миддлбука, Финн-2. Следует учитывать, что быстрорастущие НТМБ могут расти на 5% КА, шоколадном агаре или кровяном агаре с налидиксовой кислотой [42]. Также они могут расти на средах для селективного выделения <i>B. cepacia complex</i> при продлении инкубации до 14 суток[43,44,45].
Грибы	
<i>Aspergillus</i> spp. и другие микромицеты	Агар Сабуро с добавлением антибиотиков (хлорамфеникол+гентамицин или бензилпенициллин+стрептомицин) ***

* SCV атипичные формы *S.aureus* с фенотипом мелких колоний (small-colony variant);

** *Ralstonia* spp., *Alcaligenes* spp., *Ohrobactrum anthrophi*, *Chryseobacterium* spp., *Acinetobacter*, *P.putida*, *P.mendocina*, *P.fluorescens*, *Flavobacterium* spp.;

*** *Aspergillus* spp. и другие микромицеты часто растут на всех питательных средах для первичного посева.

3.5.1 Гомогенизация

Вязкость и слизисто-гнойный характер мокроты создает трудности при выделении микроорганизмов в особенности, когда требуется их количественная характеристика.

Методология разжижения или уменьшения вязкости мокроты включает механическое воздействие с помощью стерильных стеклянных бус или стерильного кварцевого песка, а также химическое муколитическое воздействие. Наиболее удобным и безопасным для медперсонала является использование муколитика ацетилцистеина. В этом случае в контейнер вносят равные объемы мокроты и 0,5% раствора ацетилцистеина и тщательно перемешивают в течение 1-2 мин.

В	• Использование муколитических препаратов позволяет сделать густую и вязкую мокроту более жидкой, что облегчает посев на питательные среды и улучшает поиск микроорганизмов, присутствующих в образце. Уровень достоверности доказательства 2+ [46].
С	• Нет достаточных доказательств того, что посев гомогенизированной мокроты имеет преимущества перед посевом необработанной мокроты у пациентов с МВ. Уровень достоверности доказательства 2+ [47].

3.5.2 Количественный метод посева

Применение количественного метода посева отделяемого дыхательных путей больных МВ может существенно облегчить выделение различных видов микроорганизмов, а также их различных морфотипов в пределах одного вида. Методика количественного посева представлена в Приложении Б1.

- **Мокрота.**

Из предварительно гомогенизированной мокроты приготавливают взвесь мокроты в 0,9% физиологическом растворе (1:9). Затем готовят серийные разведения до 10^{-5} и из них производят посев на питательные среды. Посев гомогената мокроты может также быть проведен методом секторных посевов (Приложение Б 2).

- **Тампон с транспортной средой.**

Мазки из глубоких отделов задней стенки глотки, взятые тампонами, тщательно суспензируют в 1 мл питательного бульона или в 0,9% физиологического раствора. Данное разведение условно принимают за разведение 1:9. Затем аналогично готовят серийные разведения [48].

Комментарий. Количественное определение массивности обсеменения при посеве мазков с задней стенки глотки будет ориентировочным.

I. Из разведения 10^{-2} по 20 мкл засевают на следующие питательные среды:

- На 5% КА;
- желточно-солевой агар (ЖСА) или манитол-солевой агар (МСА) или хромогенный агар для стафилококков;
- колумбийский агар с ДК для *S. aureus* SCV фенотипа;
- среда Эндо или Мак-Конки/хромогенная среда;
- *B. ceracia* агар или BCSA, или OFPBL Agar или BCSA или *B. ceracia* селективный;
- агар Сабуро.

II. Из разведения 10^{-5} по 20 мкл засевают:

- Для выделения *S. pneumoniae* - на 5% КА с налидиксовой кислотой;
- Для изоляции *H. influenzae* – на шоколадный агар.

3.5.3 Посев на грибы

Для выделения грибов из биоматериалов используют агаризованную среду Сабуро, желательно, в модификации Эммонса (содержит 2% глюкозы, pH 7,0). На каждую пробу биоматериала используют 2 чашки Петри со средой Сабуро. На одну чашку вносят 0,1-0,5 мл нативной мокроты или наносят материал тампоном из транспортной среды в виде площадки и растирают шпателем по всей поверхности агара, на вторую чашку вносят материал в три точки [49]. Посев «в три точки» позволяет исключить возможную контаминацию чашек плесневыми грибами, учитывается рост только в точках посева.

3.6 Условия и время культивирования микроорганизмов

- Чашки с КА и ША инкубируют в атмосфере с 5-10% CO₂
- Остальные посевы инкубируют в обычной атмосфере;
- Температура инкубации 35-37⁰С.
- Посевы просматриваются после 24 часов инкубации. Затем, даже при наличии роста микроорганизмов через 24 часа и проведении исследований выросших колоний микроорганизмов, посевы инкубируют ещё в течение 24-48 часов для выявления микроорганизмов, которые не выросли или были не видны после первых 24 часов инкубации. Чашки с посевами просматривают ежедневно;
- Инкубацию необходимо проводить, по крайней мере, до 5 дней, чтобы смогли вырасти медленно растущие морфотипы НГОБ при их наличии в образце.

Комментарий: Поскольку быстрорастущие НТМБ могут расти на средах для селективного выделения *B. cereus* complex, для их возможного обнаружения рекомендуется дополнительно инкубировать посеы до 14 дней при ежедневном просмотре

- Чашки с агаром Сабуро инкубируются в течение 10 дней при температурах 28°C (посев в три точки) и 35 °C (посев шпателем) при ежедневном просмотре.

3.6.1 Культивирование *Staphylococcus aureus*

В	• Для повышения вероятности выделения <i>S. aureus</i> у пациентов с МВ рекомендуется использовать одну из селективных сред – МСА/ЖСА или хромогенный агар для <i>S. aureus</i>. Уровень достоверности доказательства 2- [50].
С	• Чашки с питательными средами для <i>S. aureus</i> рекомендуется инкубировать при 35-37°C в обычной атмосфере не менее 48 часов. Уровень достоверности доказательства 2- [51].
С	• О наличии <i>S. aureus</i> рекомендуется сообщать независимо от количества микроорганизма, выделенного в респираторном образце.

У больных МВ встречаются атипичные формы *S. aureus*, которые трудно выделять и идентифицировать общепринятыми методами из-за их замедленного роста, нетипичных для стафилококков свойств, отсутствием роста при пересевах на плотные питательные среды. Такие атипичные формы называют штаммами с фенотипом мелких колоний (small-colony variant-SCV). Бактерии растут медленно, в результате чего через 48ч роста формируются очень маленькие без пигмента и гемолиза колонии, имеющие фенотип «яичницы-глазуньи».

S. aureus SCV могут не расти на селективных и хромогенных средах для стафилококков при инкубации в обычной атмосфере [52].

С	• Для культивирования SCV форм <i>S. aureus</i> рекомендуется производить посев материала 5% КА и инкубировать чашки в атмосфере с повышенным содержанием CO₂ не менее 48-72 часов. Уровень достоверности доказательства 2- [53].
----------	---

3.6.2 Культивирование *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa хорошо растет как на неселективных, так и на селективных питательных средах при инкубации в обычной атмосфере при 35 ° С от 24 до 48 часов.

Не опубликовано достаточно данных о преимуществе использования селективных питательных сред для выделения *P. aeruginosa* из нижних дыхательных путей пациентов с МВ. Сравнение селективных и неселективных питательных сред показало, что *P. aeruginosa* одинаково хорошо растет на шоколадном, 5% кровяном агаре, а также на агаре МакКонки, агаре Эндо и цетримидном агаре. Все посевы инкубировали при 35 ° С в течение 48 часов.

С	• Существует недостаточно доказательств того, что использование селективных сред повышает высеваемость <i>P. aeruginosa</i>. Тем не менее, использование селективных сред (агар МакКонки, агар Эндо, цетримидный агар) может помочь в идентификации, в частности, появление пигмента, рост мукоидного фенотипа. Уровень достоверности доказательства 2- [54].
С	• Посевы рекомендуется инкубировать при 35-35°C в обычной атмосфере в течение 48 часов. При отсутствии роста инкубацию продлевают до 3-5 суток при ежедневном просмотре. Уровень достоверности доказательства 3 [54].

Комментарий: возможно появление видимого роста различных морфотипов *P. aeruginosa* на обычных и селективных средах на 3-5 день инкубации.

С	• О наличии в респираторном образце <i>P. aeruginosa</i> следует сообщать независимо от выделенного количества.
---	---

3.6.3 Культивирование *Burkholderia cepacia complex*

В монокультуре бактерии этой группы хорошо растут на стандартных питательных средах, таких как 5% кровяной агар, шоколадный агар, среде Эндо и МакКонки.

Поскольку чаще всего микроорганизмы из нижних дыхательных путей выделяются в виде ассоциаций микроорганизмов, при посеве респираторных образцов медленно растущие *B. cepacia complex* могут быть не обнаружены на перечисленных питательных средах из-за чрезмерно быстрого роста других быстрорастущих микроорганизмов. Поэтому применение селективной среды имеет большое значение для успешного выделения *B. cepacia complex* и настоятельно рекомендуется. [55, 56].

Коммерческие среды для селективного выделения *B. cepacia complex* содержат полимиксин для подавления роста грамотрицательных палочек, чувствительных к нему. Также в зависимости от производителя эти среды могут содержать в своем составе

кристаллический фиолетовый, соли желчных кислот, ванкомицин, бацитрацин для ингибирования роста грамположительных кокков.

Примерами этих сред являются селективный агар BCSA, агар *Burkholderia cepacia* (BCA) (ранее известный как агар *Pseudomonas cepacia* или PCA), OFPBL Agar-Оксидазно/ферментативный- полимиксин-бацитрацин-лактозный агар.

На селективных агарах среда вокруг колонии *B. cepacia complex* изменяет цвет.

Характер роста на селективной среде следует оценивать, следуя инструкции производителя. Например, BCSA – цвет колоний розово-красный, цвет среды изменяется с красного на желтый; OFPBL – желтые колонии, среда вокруг колонии изменяет цвет с зеленого на желтый.

Для изоляции *B. cepacia complex* может потребоваться не менее 3 дней инкубации при температуре от 30 до 37°C в обычной атмосфере перед тем, как колонии станут видимыми на поверхности питательной среды.

В	• Для повышения вероятности обнаружения <i>B. cepacia complex</i> настоятельно рекомендуется использование селективной среды Уровень достоверности доказательства 2- [56].
С	• Селективные среды для <i>B. cepacia complex</i> инкубируют при 35-37°C в обычной атмосфере в течение 5 дней для максимального увеличения чувствительности среды. Чашки с селективной средой должны просматриваться ежедневно. Уровень достоверности доказательства 2- [57].
С	• О выделении <i>B. cepacia complex</i> необходимо сообщать всегда, независимо от количества, обнаруженного в образце.

3.6.4 Рост неферментирующих грамотрицательных палочек на селективных средах для выделения бактерий *B.cepacia complex*

Благодаря улучшению антибактериальной терапии в последние годы, продолжительность жизни пациентов с МВ и их дыхательные пути представляют собой идеальную среду для колонизации разнообразными НГОВ. Катализатором обнаружения новых микроорганизмов стало применение селективной питательной среды для *B.cepacia complex*, которое позволило выделять новые микроорганизмы из этой многочисленной группы бактерий [58, 59,60].

Наибольший интерес вызывают микроорганизмы, которые растут на селективных средах для *B.cepacia complex* и которые часто невозможно дифференцировать с *B.cepacia complex* фенотипическими методами в силу схожести их морфологических свойств и

биохимической активности. Такими микроорганизмами являются *Burkholderia gladioli*, *Ralstonia* spp., *Inquilineus limosus*, *Pandoreae* spp.

Патогенная роль этих микроорганизмов не так хорошо изучена, как роль бактерий комплекса *B.ceracia*.

В таблице 5 приведен список микроорганизмов, которые могут расти на селективных средах для *B.ceracia complex* [61].

Таблица 5

Рост неферментирующих глюкозу грамотрицательных бактерий на селективных средах для *B.ceracia complex*

Микроорганизм	BC agar ¹	OFPBL ¹	BCSA ¹
<i>Burkholderia gladioli</i>	+	+	+
<i>Ralstonia pickettii</i>	+	+	+
<i>Ralstonia mannitolityca</i>	+	НД	+
<i>Ralstonia gilardi</i>	+	НД	+
<i>Ralstonia respiraculi</i>	НД	НД	—
<i>Ralstonia insidiosa</i>	НД	НД	+
<i>Inquilineus limosus</i>	+	НД	+
<i>Pandoreae pnomenus</i>	+	НД	+
<i>Pandoreae apista</i>	+	НД	+
<i>Pandoreae sputorum</i>	+	НД	НД
<i>Pandoreae pulmonicola</i>	+	НД	НД

1- питательные среды для селективного выделения различных производителей

НД- нет данных

+ большинство штаммов растут на этой среде

- большинство штаммов не могут расти на этой среде

Burkholderia gladioli была первым микроорганизмом из числа «новых» микробов, выделенных из нижних дыхательных путей больных МВ [62]. *B. gladioli* продуцирует желтый пигмент и утилизирует лактозу, что является ключевым признаком для дифференциации от *B.ceracia complex*. Высокая степень фенотипического сходства *B. gladioli* и *B.ceracia complex* препятствует видовой идентификации этих бактерий.

Коммерческие тест-системы для рутинной идентификации эффективно идентифицируют комплекс *B. ceracia*, но из-за фенотипического сходства в базу данных для идентификации не включена *B. gladioli*.

В лабораториях при идентификации *B. gladioli* может ошибочно определяться как *B.cepacia complex*. Изоляты комплекса *B. cepacia* также могут ошибочно быть идентифицированы, как *B. gladioli* [63].

В небольшой вспышке с участием четырех пациентов с МВ, изоляты были идентифицированы как *B. gladioli* фенотипическими методами, а при молекулярном анализе они были идентифицированы как штамм *B. cenocepacia* [64,65]. Из-за проблем с точной идентификацией *B. gladioli*, ее возможная роль в заболевании легких при МВ в настоящее время неясна [66,67].

В базы данных тест-систем для фенотипической идентификации также не включены сведения о *Ralstonia* spp., *Pandoraea* spp. и *Inquilinus limosus*.

***Ralstonia* spp..** Несколько различных видов *Ralstonia* spp. были выделены из респираторных образцов пациентов с МВ [68]. Как и *B. gladioli* при идентификации *Ralstonia* spp. с использованием фенотипических схем идентификации эти организмы могут быть ошибочно идентифицированы как *B.cepacia complex*. Бактерии *B.cepacia complex* могут ошибочно, идентифицированы как *Ralstonia* spp. [63, 69].

В настоящее время нет данных, указывающих на патогенность *Ralstonia* spp. [70].

***Pandoraea* spp.** также является патогеном, колонизирующем нижние дыхательные пути больных МВ [71,72]. Эти микроорганизмы могут быть трудно отличимыми как от *B.cepacia complex*, так и от *Ralstonia* spp. Есть данные, что *Pandoraea* spp. могут быть более опасны, чем *Ralstonia* spp. или *B. gladioli*. *Pandoraea apista* явилась причиной бактериемии у пациента с МВ и вызвала небольшую вспышку у шести пациентов с МВ [73, 74]. Но поскольку все пациенты были с хронической колонизацией специфическими патогенами для больных МВ, в первую очередь *P. aeruginosa*, трудно было определить роль *Pandoraea apista* в клинике хронической респираторной инфекции у данных больных.

Inquilinus limosus На 5 сутки культивирования на селективных средах для *B.cepacia complex* возможен рост *Inquilinus limosus* без роста на МакКонки агаре [75]. Этот представитель НГОВ также высевается из нижних дыхательных путей небольшого количества больных МВ. Данных для оценки клинического значения этого микроорганизма в заболевании легких у больных МВ недостаточно.

Также на селективных средах могут расти:

***Chryseobacterium* spp.** дают рост в виде желтых колоний от мелкого до среднего размеров, в среднем через 48-72 часа.

Kingella denitrificans дает рост через 24-48 часов в виде мелкой беспигментной пыли, при пересеве теряет ростовые свойства.

***Delftia acidovorans*, *Schewanella* spp.** растут в виде светлых колоний размером 1-2 мм на 2-3 сутки культивирования.

На данных средах также возможен рост *P. aeruginosa* и других псевдомонад, устойчивых к полимиксину. При этом возможно формирование различных морфотипов, в том числе мукоидных, продукция пигмента разной степени выраженности, а также рост беспигментных штаммов.

***Achromobacter* spp.**, устойчивые к полимиксину, способны давать рост на средах для *B.ceracia complex*. При этом культуральные свойства схожи с таковыми у *B.ceracia complex*, однако, в целом, колонии более крупные, слизистые, рост появляется через 24-48 часов.

Все более широкое применение молекулярных методов для идентификации микроорганизмов, выделяемых из нижних дыхательных путей, позволит точно идентифицировать эти микроорганизмы, что будет способствовать улучшению понимания их эпидемиологии и патогенности [76].

Некоторые НТМБ могут давать рост на селективных средах для культивирования *B.ceracia complex*. Рост появляется на 5-14 сутки. Колонии белого цвета, плоские, с приподнятым центром, со временем становятся кремово-желтого цвета, сухие, легко снимаются со среды .

D	• Рекомендуется проводить микроскопию всех видов выросших колоний для дифференциации грамотрицательных палочек от выросших на селективных для <i>B.ceracia complex</i> средах грамположительных палочек (<i>Lactobacillus</i> spp., НТМБ, сапрофитных представителей семейства <i>Actinomycetalis</i> видов). Уровень достоверности доказательства 4 [42,43.44].
---	---

D	• В случае выделения на селективных средах для культивирования <i>B.ceracia complex</i> грамположительных палочек необходимо провести микроскопическое исследование для выявления их кислотоустойчивости или идентификацию с использованием молекулярных методов (MALDI-ToF), в случае подтверждения кислотоустойчивости передать их в региональные лаборатории противотуберкулезной службы для реидентификации и определения принадлежности к НТМБ. Уровень достоверности доказательства 4 [42,43.44].
---	--

3.6.5 Культивирование *Achromobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*

С	• Для культивирования <i>Achromobacter</i> spp., <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> рекомендуются такие же питательные среды, какие используют для выделения <i>P. aeruginosa</i>. Уровень достоверности доказательства 2- [77].
----------	---

Комментарии: НГОб, как правило, нетребовательны к условиям культивирования, хорошо растут на стандартных питательных средах, таких как 5% кровяной агар, шоколадный агар, среде Эндо и МакКонки.

Устойчивые к полимиксину *Achromobacter* spp. могут расти на селективной среде для выделения *B.ceracia complex*.

S. maltophilia- прямые или слегка изогнутые неспорообразующие подвижные грам-отрицательные палочки. Строгие аэробы, оптимальная температура для роста колеблется от 30 до 37°C.

Обычно хорошо растет на питательных неселективных и селективных питательных средах. На 5% кровяном агаре растет в виде небольших слегка слизистых колоний. Колонии, как правило, гладкие, блестящие с ровными краями, белого, серого или бледно-желтого цвета. На среде Эндо и МакКонки - от светло-розовых до темно-розовых в зависимости от времени инкубации. У больных МВ могут встречаться мукоидные штаммы *S. maltophilia*. Также могут встречаться и варианты мелких колоний с замедленным ростом, которые считаются адаптированной формой выживания и которые часто трудно обнаружить в клинических образцах.

Представители рода ***Achromobacter*** являются грамотрицательными, неспорообразующими мелкими палочками. Хорошо растут на простых питательных средах в диапазоне температур от 30° до 37°C в обычной атмосфере. Инкубировать чашки необходимо не менее 48-72 ч для того, чтобы медленно растущие штаммы стали видимыми на плотных питательных средах [15,16,17,18,19,20].

С	• Посевы инкубируют в обычной атмосфере при 35-37°C в течение 48-72 часов. При отсутствии роста инкубацию продлевают до 3-5 суток при ежедневном просмотре. Уровень достоверности доказательства 3 [54].
----------	--

D	• Рекомендуется проводить микроскопию всех видов выросших колоний для дифференциации грамотрицательных палочек от грамположительных палочек и кокков. Уровень достоверности доказательства - 4.
----------	--

Комментарии: поскольку инкубация чашек с посевами проводится длительное время, на среде Эндо и МакКонки могут вырасти различные микроорганизмы из ротовой

полости, верхних дыхательных путей, которые не являются этиологическими значимыми при обострениях бронхолегочного процесса при МВ.

3.6.6 Культивирование *Haemophilus influenzae*

H.influenzae относится к микроорганизмам с повышенными питательными потребностями: с одной стороны, обязательным условием роста для *H.influenzae* является наличие в среде X и V факторов, с другой- инкубация посевов в условиях с повышенным содержанием CO₂ (5-10%).

Для улучшения выделения *H.influenzae* из клинического материала рекомендуется использовать шоколадный агар, который приготавливается с добавлением крови к обогащенной агаровой основе, имеющей температуру около 80°C, для того чтобы разрушить эритроциты и высвободить X фактор (высвобождается только фактор X - гемин), а фактор V находится в среде в добавках). Коммерческие готовые чашки с шоколадным агаром обычно содержат смесь гемина (X фактор) и "коктейль" ростовых факторов. [78, 79].

Для селективного выделения *H.influenzae* из респираторных образцов могут быть использованы готовые питательные среды, содержащие бацитрацин (300 мкг/мл). Высокая концентрация этого антибиотика подавляет рост большинства грамположительных бактерий, являющихся представителями нормальной микрофлоры верхних дыхательных путей и ротовой полости (стафилококков, микрококков и стрептококков). Помимо готовых коммерческих сред, содержащих антибиотик, в клинических лабораториях возможно приготовление и использование шоколадного агара с бацитрацином в концентрации 300 мкг/мл [78, 79]. Вместо содержащих антибиотик сред могут быть использованы коммерческие диски с бацитрацином (10 ЕД). Природно устойчивые к бацитрацину гемофилы будут расти вокруг диска.

В	• Для селективного выделения <i>H.influenzae</i> из респираторных образцов рекомендуется использование шоколадного агара, содержащего бацитрацин в концентрации 300 мкг/мл. Возможно использование дисков с бацитрацином 10 ЕД. Уровень достоверности доказательства 2- [80].
С	• Рекомендуется инкубировать шоколадный агар при температуре 35–37°C в атмосфере с повышенным содержанием CO₂ (5–10%) в течение 48 часов с просмотром посевов через 24 часа. Уровень достоверности доказательства 3 [81].

Комментарий: 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 полиморфные, непрозрачные, неиррадиирующие колонии, часто с неровными краями; – неинкапсулированные штаммы образуют мелкие, непрозрачные, неиррадиирующие колонии с неровными краями.

Для чистой культуры гемофильной палочки характерно наличие специфического "мышинного" запаха [81].

3.6.7 Культивирование грибов

Основной средой для получения чистой культуры грибов является агар Сабуро.

Для исследования респираторных образцов от больных МВ необходимо использовать среду Сабуро с антибиотиком для подавления роста бактерий, присутствующих в образце. Исследование респираторных образцов от больных МВ с использованием одновременно агара Сабуро с хлорамфениколом и агара Сабуро без антибиотика показало высокую чувствительность данной питательной среды для изоляции грибов 89,2% против 85,7%, соответственно [82].

В	• Для выделения грибов из респираторных образцов больных МВ рекомендуется использовать агар Сабуро. Использование агара Сабуро с хлорамфениколом снижает уровень контаминации бактериями ротовой полости. Уровень достоверности доказательства 2+ [82].
В	• Чашки со средой Сабуро рекомендуется инкубировать в обычной атмосфере при температуре 35–37°C в течение 24-48 часов. Чашки просматривают после 24 и 48 часов инкубации. Уровень достоверности доказательства 2+ [82].
С	• Для повышения высеваемости грибов из респираторных образцов от пациентов с МВ рекомендуется инкубация чашек с посевами до 10 суток при ежедневном просмотре. Уровень достоверности доказательства 2+ [82].

Комментарий. При оценке результатов при ежедневном просмотре регистрируют следующие параметры:

- появление роста - срок появления, начиная со дня посева;
- интенсивность роста - количество колоний;
- загрязнение посева посторонней микрофлорой;
- отсутствие роста.

Соблюдение этих правил позволяет, во-первых, своевременно выявить макроскопический видимый рост грибов или загрязняющей микрофлоры, а во-вторых, на основании

регистрации сроков появления роста и его особенностей осуществлять первичную идентификацию грибов.

4. Идентификация микроорганизмов

4.1 Идентификация *Staphylococcus aureus*

В доступных источниках не найдено сообщений о каких либо специфических тестах для идентификации типичных штаммов *S. aureus* от пациентов с МВ за исключением штаммов с фенотипом мелких колоний (small-colony variant-SCV) [61]. SCV стафилококки имеют атипичные, метаболически не характерные типичным стафилококкам свойства. Они могут быть лецитиназоотрицательными, обладать слабой коагулазной активностью, характеризоваться отсутствием способности ферментировать манитол и возможностью возврата в типичную родительскую форму. Они часто ассоциируются с персистентной инфекцией, высеваются у больных, длительно получающих триметоприм/сульфаметаксозол (ко-тримоксазол), обладают резистентностью к антибиотикам и чаще выделяются из нижних дыхательных путей больных МВ старших возрастных групп в ассоциации с *P. aeruginosa* [52].

В	• Для идентификации <i>S. aureus</i> рекомендуется использовать небольшое количество признаков - наличие пигмента, наличие лецитовителлазы, плазмокоагулазы, ДНКазы, хлопьеобразования, ферментацию или окисление маннита. Перечисленные признаки в подавляющем большинстве случаев позволяют достоверно проводить идентификацию <i>S. aureus</i>. Уровень достоверности доказательства 2+ [61].
В	• Применение хромогенных сред для выделения <i>S. aureus</i> позволяет проводить его идентификацию одновременно с выделением и не требует предварительного получения чистой культуры. Уровень достоверности доказательства 2+ [61].
В	• Для идентификации колоний <i>S.aureus</i>, выросших на первичной чашке, рекомендуется проводить тест латекс-агглютинации наборами диагностических препаратов, разрешенных к применению на территории РФ. Уровень достоверности доказательства 2+ [61].

Комментарий: Латексный реагент представляет собой суспензию латексных частиц, покрытых фибриногеном (связь с коагулазой) и IgG (связь с протеином А). Если в суспензии испытуемой бактериальной культуры присутствуют коагулаз/протеин А-положительные стафилококки, происходит реакция агглютинации латекса- образование комочков, склеивание, которое наблюдается невооруженным глазом.

4.2.Идентификация неферментирующих глюкозу грамотрицательных бактерий (НГОВ)

Правильная идентификация НГОВ, выделенных от пациентов с МВ чрезвычайно важна с клинических позиций – своевременная и адекватная терапия, эпидемиологически – предотвращение перекрестного инфицирования пациентов, и даже психологически – обнаружение некоторых видов микробов (особенно *B. cepacia complex*) является критическим для прогноза функции дыхательной системы.

В табл. 6 представлен перечень НГОВ, выделяемых из респираторных образцов больных МВ, фенотипическая идентификация которых может вызывать трудности.

Таблица 6

Перечень неферментирующих грамотрицательных бактерий, выделяемых от пациентов с МВ, идентификация которых может вызывать трудности

<i>Achromobacter spp.</i>	<i>Pandoraea pulmonicola</i>
<i>Burkholderia cepacia complex</i>	<i>Pandoraea sputorum</i>
<i>Burkholderia gladioli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> атипичные штаммы
<i>Cupriavidus respiraculi</i>	<i>Ralstonia insidiosa</i>
<i>Inquilinus limosus</i>	<i>Ralstonia mannitolilytica</i>
<i>Pandoraea apista</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>
<i>Pandoraea pnomenusa</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

Штаммы НГОВ, выделенные от пациентов МВ, часто характеризуются атипичными свойствами - формируют карликовые и мукоидные колонии, теряют подвижность, пигмент, способность к ферментации углеводов, свойственных виду (роду), проявляют замедленный рост, ауксотрофность.

Все это влияет на достоверность фенотипической идентификации. Изоляты НГОВ от пациентов с МВ – представители родов *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Cupriavidus*, *Pandoraea*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, *Achromobacter* - это аэробные неспорообразующие прямые или слегка изогнутые грамотрицательные палочки от 1 до 5 мкм в длину и 0,5 – 1 мкм в ширину. Большинство их них подвижны, обладают положительной оксидазной и каталазной активностью. Представители рода *Stenotrophomonas* немного мельче – 0,7 – 1,8 в длину и 0,4 – 0,7 в ширину, каталазопозитивны, оксидазовариабельны. Представители родов *Acinetobacter* - аэробные неспорообразующие коккобациллы грамотрицательные палочки от 1,5 до 2,5 мкм в длину и 0,9 – 1,6 мкм в диаметре, неподвижны, обладают положительной каталазной активностью, оксидазаотрицательны.

4.2.1. Ключевые моменты идентификации НГОБ от пациентов с муковисцидозом

В	• Для первичной идентификации НГОБ рекомендуется изучение морфологических и тинкториальных свойств (окраска мазка по Граму), анализ культуральных свойств на плотных питательных средах, проведение теста окисления/ферментации глюкозы (О/Ф-теста) на среде Хью-Лейфсона, выявление подвижности, оксидазной активности. Уровень достоверности доказательства 2+ [83].
С	• Все представители НГОБ, выделенные из респираторных образцов от пациентов с МВ рекомендуется идентифицировать до вида.

С	• Для фенотипической идентификации до вида рекомендуется применять коммерческие идентификационные тест-системы. Уровень достоверности доказательства 2- [84].
----------	--

С	• Для идентификации медленно растущих НГОБ рекомендуется отдавать предпочтение тест-системам, у которых имеется возможность продления инкубации дополнительно на 24 часа в случае получения недостаточного для идентификации роста в первые 24 часа инкубации. Уровень достоверности доказательства 2- [85].
----------	---

Комментарий: Многие представители НГОБ, выделенные от больных МВ, проявляют замедленный рост (*B. ceracia complex*, *Achromobacter spp.*) и использование автоматизированных бактериологических анализаторов не всегда оправдано, поскольку программы идентификации в них рассчитаны на идентификацию микроорганизмов с нормальной скоростью роста.

Исследования показали, что применение для идентификации НГОБ таких анализаторов, как VITEK 2 (bioMérieux), BDPhoenix (Becton Dickenson) Walkaway (Siemens) не всегда приводит к успешной идентификации представителей этой группы бактерий [86, 87].

Тест-системы для визуального считывания результатов с возможностью пролонгированной инкубации для медленно растущих штаммов НГОБ являются предпочтительными (API 20NE (bioMérieux, Франция), BBL™ Crystal™ (BD, США), НЕФЕРМтест24 (Erba Lachema s.r.o. Чехия), TREK Diagnostic Systems (США), Микроген GN-ID В («Микроген Bioproducts», Великобритания) [85].

Некоторые культуральные и биохимические характеристики клинических штаммов

Pseudomonas fluorescens group, *Pseudomonas stutzeri group*, *Pseudomonas alcaligenes group*.

приведены в Приложении Б 3.

4.2.2 Идентификация *P. aeruginosa*

Большинство штаммов *P. aeruginosa* легко узнаваемы при первичном просмотре посевов на основании характерных признаков: морфологии колоний - плоских, имеющих зазубренные края, наличие металлического блеска, пигмента, характерного запаха. Кроме широко распространенного пигмента сине-зеленого цвета пиоцианина, известны штаммы *P. aeruginosa*, продуцирующие желто-зеленый флюоресцирующий пигмент – пиовердин, красный пигмент – пиорубин, черный пигмент – пиомеланин, а также штаммы, не продуцирующие пигментов.

Штаммы *P. aeruginosa* на плотных питательных средах после аэробной инкубации в течение 24 часов при 37 ° С могут расти, по меньшей мере, в виде шести колониальных морфотипов [84]. Наиболее распространенным морфотипом является рост в виде крупных, плоских и овальных, гладких с глянцевой поверхностью, а также встречаются колонии неправильной формы со складчатой поверхностью в виде «цветков маргариток». Некоторые штаммы при росте на плотных питательных средах дают феномен «радужного роста» - спонтанный лизис культуры без воздействия каких-либо дополнительных факторов [88]. Все штаммы являются оксидазопозитивными. Почти все штаммы обладают подвижностью. Способность к росту при 42°C отличает *P. aeruginosa* от других представителей бактерий *Fluorescens group*. Помимо типичных плоских вариантов колоний *P. aeruginosa* существуют другие морфотипы: мукоидные и карликовые.

Клинические штаммы *P. aeruginosa* различных морфологических типов от больных МВ могут быть неподвижными, терять пигмент и проявлять замедленную оксидазную реакцию и поэтому для подтверждения идентификации могут потребовать постановки дополнительных тестов или использования коммерческих тест-систем.

С	• В отчете о результате исследования рекомендуется указывать наличие всех выделенных морфотипов <i>P. aeruginosa</i>. Уровень достоверности доказательства 2- [85].
В	• Наличие мукоидных форм <i>P. aeruginosa</i> в респираторном образце настоятельно рекомендуется указывать в отчете о результатах исследования. Уровень достоверности доказательства 2- [89].

Комментарий: Выделение морфологически различных штаммов *P. aeruginosa* из одного респираторного образца может указывать не только на колонизацию нижних дыхательных путей разными штаммами, но и на морфологические вариации одного и того же штамма *P. aeruginosa*.

Переход *P. aeruginosa* от плоских колоний к мукоидным у больных МВ обычно ассоциируется с хронизацией процесса, ускорением снижения легочной функции и неблагоприятным прогнозом из-за способности слизистого экзополисахарида нарушать нормальные фагоцитарные функции, а также содействовать образованию биопленок [89].

В	Штаммы <i>P. aeruginosa</i> с типичными свойствами (зеленый пигмент, положительный оксидазный тест, рост при 42⁰С) могут быть идентифицированы только этими тестами, применение тест-систем для фенотипической идентификации не рекомендуется. Уровень достоверности доказательства 2- [90].
В	Атипичные штаммы <i>P. aeruginosa</i> (непигментированные, с замедленной оксидазной реакцией, неподвижные, устойчивые к колистину) рекомендуется идентифицировать с использованием идентификационных тест-систем. Уровень достоверности доказательства 2- [91].

Алгоритм идентификации видов *Pseudomonas* и других НГОБ представлен в Приложении Б 4.

4.2.3 Идентификация *B. ceracia complex*

Представители *B. ceracia complex* не имеют характерных морфологических особенностей на стандартных питательных средах. Обычно не имеют пигмента, но встречаются штаммы с пигментами от бурого до коричневого. Оксидазная реакция слабоположительная или отрицательная. На средах Эндо, МакКонки образуют колонии от темно-розового до красного из-за окисления лактозы после длительной инкубации (от 4 до 7 дней). Колонии могут быть гладкими и шероховатыми, слегка приподнятыми над поверхностью среды, встречаются слизистые штаммы. На селективных агарах штаммы *B. ceracia complex* формируют колонии от 1 до 3-4 мм.

Виды *B. ceracia complex* и родственные виды характеризуются высокой степенью сходства генных последовательностей 16S рРНК (98-100%) и *recA* (94-95%) и умеренными уровнями ДНК-ДНК-гибридизации (30-50%). Это ведет к их почти полному фенотипическому сходству - в библиотеки биохимических профилей автоматизированных систем идентификации микроорганизмов, как правило, включена только группа *B. ceracia complex* без разделения на отдельные виды. Таксономическая база NCBI по состоянию на декабрь 2017 г. содержит более 20 поименованных видов *B. ceracia complex* и более 60 генетически родственных микробов, не имеющих пока видового названия. К *B. ceracia complex* относят: *B. alpine*, *B. anthina*, *B. ambifaria*, *B. arboris*, *B. cenoceracia*, *B. ceracia*, *B. contaminans*, *B. diffusa*, *B. dolosa*, *B. lata*, *B. latens*, *B. metallica*, *B. multivorans*, *B. paludis*,

B.pseudomultivorans, *B.puraquae*, *B.pyrrocinia*, *B.seminalis*, *B.stabilis*, *B.stagnalis*, *B.territorii*, *B.ubonensis*, *B.vietnamiensis*.

На тест-системах для фенотипической идентификации невозможно достоверно определить различные виды *B. ceracia complex*.

В базах данных микробиологических анализаторов для идентификации культур заложена возможность идентифицировать только группу *B. ceracia complex* без разделения на геномные виды.

Из-за медленного роста *B. ceracia complex* существует ограничение применения идентификационных тест-систем для автоматизированного считывания из-за невозможности продолжать инкубацию более 24 часов при недостаточном росте исследуемых штаммов.

С учетом значения выделения представителей *B. ceracia complex* от пациентов с МВ - изменения в клинической тактике, иной подход к антибактериальной терапии, высокая эпидемиологическая настороженность для предотвращения перекрестного инфицирования, необходимость работы с клиническими психологами – все эти аспекты требуют подтверждения видовой фенотипической идентификации молекулярными или молекулярно-генетическими методами.

Алгоритм идентификации микроорганизмов *B. ceracia complex* представлен в Приложении Б 5.

В	• Рекомендуется для всех <i>B. ceracia complex</i>, идентифицированных фенотипическими методами на тест-системах, провести подтверждающую идентификацию методами молекулярной идентификации (MALDI-TOF MS). Уровень достоверности доказательства 2+ [89].
---	---

4.2.4 Идентификация *S. maltophilia*

S. maltophilia является единственным клинически значимым видом рода *Stenotrophomonas*.

S. maltophilia — грамотрицательные палочки длиной 0,5-1,5 мкм. Подвижны за счет полярных жгутиков.

S. maltophilia облигатный аэроб. Являются каталазо-положительными. Относится к относительно метаболически неактивным микроорганизмам. Не способны к ферментации глюкозы и других углеводов. Ферментируют мальтозу.

Некоторые штаммы могут проявлять бета- гемолитическую активность на 5% кровяном агаре.

Большинство штаммов *S. maltophilia* оксидазоотрицательные. Около 15-20% штаммов *S. maltophilia* имеют замедленную положительную оксидазную активность. Неверное определение оксидазы у *S. maltophilia* может привести к серьезным клиническим последствиям. Так, оксидазоположительные штаммы *S. maltophilia* могут быть ошибочно идентифицированы как *B. ceracia* [92].

S. maltophilia хорошо идентифицируется с помощью большинства коммерческих тест-систем для фенотипической идентификации, как для визуального, так и для автоматизированного считывания [63].

С	• Идентификацию <i>S. maltophilia</i> рекомендуется проводить фенотипическими методами с использованием коммерческих тест-систем. Уровень достоверности доказательства 3 [93].
---	--

Комментарий: Природная устойчивость *S. maltophilia* к карбапенемам является одним из признаков, полезных при идентификации данного микроорганизма.

4.2.5 Идентификация *Achromobacter* spp.

Род *Achromobacter* принадлежит к семейству *Alcaligenaceae* и состоит из 20 видов: *A. aegrifaciens*, *A. agilis*, *A. animicus*, *A. anxifer*, *A. deleyi*, *A. denitrificans*, *A. dolens*, *A. insolitus*, *A. insuavis*, *A. kerstersii*, *A. marplatensis*, *A. mucicolens*, *A. pestifer*, *A. piechaudi*, *A. pulmonies*, *A. ruhlandii*, *A. sedimimum*, *A. spanius*, *A. spiritinus*, *A. xylosoxidans* (типичный представитель). Кроме того, этот род содержит шесть еще непоименованных видов (обозначенных геномваром 1, 3, 8, 9, 12 и 13) [94].

Большинство видов *Achromobacter* подвижны, за исключением *A. pulmonies*, который проявляет слабую подвижность или может быть неподвижным. Все виды являются строгими аэробами. Являются оксидазо- и каталазоположительными, не проявляют ферментативной способности - не разлагают мочевины, не обладают лизиндекарбоксилазной, орнитиндекарбоксилазной и ДНКазной активностью, не гидролизуют аргинин и не обладают желатиназной активностью. Также все виды *Achromobacter* очень слабо утилизируют углеводы.

Всё это может затруднять фенотипическую идентификацию на уровне рода по биохимическим тестам на коммерческих тест-системах [95]. А значительное внутривидовое разнообразие *Achromobacter* делает его дифференциацию по биохимическим тестам внутри рода практически невозможной [96].

Использование MALDI-ToF MS позволяет разделить наиболее часто встречающиеся у больных МВ *A. xylosoxidans*, *A. ruhlandii*, *A. spanius*, *A. piechaudii*, *A. insolitus*, *A. denitrificans* и других представителей *Achromobacter*.

С	• Идентификацию микроорганизмов рода <i>Achromobacter</i> рекомендуется проводить фенотипическими методами на коммерческих тест-системах. Внутривидовую идентификацию рекомендуется проводить молекулярными методами (MALDI-TOF MS). Уровень достоверности доказательства 2+ [89].
---	---

4.2.6 Идентификация *B. gladioli*, *Ralstonia* spp., *Cupriavidus* spp., *Pandora* spp. и *Inquiline* spp.

Близкородственными видами *B. cepacia* complex являются *B. gladioli*, *Pandora* spp., *Ralstonia* spp., *Cupriavidus* spp. и *Inquiline* spp.

Степень фенотипического сходства этих бактерий так велика, что правильная видовая верификация на основании только культурально-морфологических особенностей штамма невозможна.

Штаммы *Ralstonia* spp., *Cupriavidus* spp., *Pandora* spp. и *Inquiline* spp. также не имеют выраженных морфологических особенностей на неселективных средах. Медленно растущие. Обычно до появления видимых колоний необходимо инкубировать чашки с посевами в течение 48-72 часов. Сходство биохимических характеристик представителей этих родов, *B. gladioli*, *B. cepacia* complex, их замедленный рост затрудняют видовую дифференциацию штаммов. Велика вариабельность биохимических реакций внутри рода. В отличие от *B. cepacia* complex, большинство штаммов *B. gladioli* являются оксидазоотрицательными. Штаммы *B. gladioli*, в отличие от *B. cepacia* complex, не окисляют лактозу. *Pandora* spp., не окисляет мальтозу, лактозу, ксилозу, сахарозу и адонит, большинство из них не обладают β-галактозидазной активностью. Большинство *Ralstonia* spp., *Cupriavidus* spp. каталазопозитивные, однако есть каталазонегативные штаммы. При выраженной оксидазной активности среди штаммов *R. pickettii*, *R. mannitolilytica* и *C. gillargii* могут встречаться штаммы с низкой активностью. *Pandora* spp. имеют вариабельную оксидазную активность. *B. gladioli*, штаммы *Ralstonia* spp., *Pandora* spp. могут расти на селективном агаре для *B. cepacia* complex. Виды *Cupriavidus* spp. обычно не растут, но отмечены случаи роста некоторых штаммов. Особенности биохимической активности *B. cepacia* complex и близкородственных видов приведены в Приложении Б5 и Приложении Б6.

Применение коммерческих тест-систем для определения биохимических характеристик *B. cepacia* complex, *B. gladioli* и близкородственных видов *Ralstonia* spp., *Cupriavidus* spp. и *Pandora* spp. ограничено. Клинические штаммы этих видов обнаруживают значительную фенотипическую изменчивость, из-за их необычно больших геномов,

Связанная с этими особенностями генетическая пластичность и разнообразие приводят к переменным биохимическим фенотипическим профилям. Сходные фенотипические характеристики не позволяют проводить видовую дифференциацию штаммов с использованием стандартного набора тестов биохимических панелей бактериологических анализаторов. Медленный рост культур приводит к замедленной реализации биохимических реакций. Автоматизированные системы идентификации с предустановленным и некорректируемым периодом инкубации 20-24 часа часто не позволяют выполнить исследование из-за недостаточного роста идентифицируемых штаммов [97,98,87]. А многие близкородственные к *B. ceracia complex* микроорганизмы не представлены в базах данных микробиологических анализаторов. В настоящее время нет зарегистрированных в РФ коммерческих систем для молекулярно-генетического типирования *B. ceracia complex* и близкородственных видов. На современном этапе наиболее практически применимым молекулярным методом видовой верификации *B. ceracia complex* и близкородственных видов является MALDI-TOF MS - технология, основанная на сравнении между масс-спектром изолята и масс-спектрами в доступных базах данных. Идентификационная способность MALDI-TOF MS зависит от видов и полноты используемой базы данных. На сегодняшний день в базах данных основных производителей масс-спектрометров присутствуют основные представители НГОБ, имеющих потенциальное клиническое значение у пациентов с МВ [99]. Тем не менее, фенотипические методы в настоящее время используются в большинстве практических лабораторий, не оснащенных масс-спектрометрами.

По данным литературы только 5% представителей НГОБ не может быть правильно идентифицировано фенотипическими методами [100]. Это подчеркивает важность правильного проведения «традиционных» лабораторных исследований при идентификации микроорганизмов, колонизирующих нижние дыхательные пути больных с МВ. Алгоритм идентификации бактерий *B. ceracia complex* представлен в Приложении 7. Поскольку представители родов *Ralstonia* spp., *Pandoraea* spp, а также *B. gladioli* обладают незначительной степенью эпидемической опасности для больных МВ по сравнению с другими представителями *B. ceracia complex*, чрезвычайно важной является достоверная идентификация данных микроорганизмов.

В	• Для идентификации представителей внутри группы <i>B. ceracia complex</i>, <i>Ralstonia</i> spp., <i>Pandoraea</i> spp и <i>B. gladioli</i> не рекомендуется использовать коммерческие тест-системы. Уровень достоверности доказательства 2+ [89].
----------	---

В	• Идентификацию представителей внутри группы <i>B. cepacia complex</i>, <i>Ralstonia</i> spp., <i>Pandora</i> spp., и <i>B. gladioli</i>. рекомендуется проводить молекулярными методами (MALDI-TOF MS). Уровень достоверности доказательства 2+ [89].
----------	---

4.3 Идентификация *H. influenzae*

Идентификацию *H. influenzae* рекомендуется проводить в соответствии с Методическими рекомендациями для микробиологов «Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae*», 2000г. [81].

H. influenzae обладают цитохромоксидазной и каталазной активностью и нуждаются в X и V факторах, что является одним из основных признаков, отличающих их от других представителей рода гемофил.

Потребность *H. influenzae* в указанных факторах определяется с помощью полосок или дисков с X и V факторами.

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

Также для идентификации *H. influenzae* могут применяться коммерческие идентификационные тест-системы

4.4 Идентификация микроорганизмов с применением времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS)

Существует три основных способа идентификации культур микроорганизмов при использовании MALDI-ToF MS: метод прямого нанесения, расширенный метод прямого нанесения, метод экстракции муравьиной кислотой.

- **Метод прямого нанесения** подходит для рутинной идентификации основной массы культур, выросших на искусственных питательных средах. Не требует дополнительных процедур. Выполняется непосредственным нанесением одиночной колонии (или ее части) тонким слоем на точку мишени, начиная от середины точки. После нанесения биоматериал покрывается свежеприготовленным раствором матрицы (HCCA). Покрытие матрицей необходимо провести в течение часа после нанесения материала.
- **Расширенный метод прямого нанесения** используется в случае идентификации спорообразующих микроорганизмов, инкапсулированных микроорганизмов, микроорганизмов из мукоидных и слизистых колоний, микроорганизмов с толстой

клеточной стенкой. После нанесения биоматериала тонким слоем непосредственно на точку мишени, начиная от середины точки, материал покрывается 1 мкл 70% муравьиной кислоты. После высыхания материал покрывается раствором матрицы (НССА).

- **Метод экстракции муравьиной кислотой** используется для получения данных, позволяющих идентифицировать культуры с максимальной точностью. Его рекомендовано использовать в случае проведения исследований при анализе однородности популяции микроорганизмов, проведении различных видов анализа. Метод реализуется последовательностью действий:

1. В 300 мкл деионизированной воды вносится биоматериал в количестве от 1 до 5 колоний.
2. После вортексирования добавляется 900 мкл этанола и проводится повторное вортексирование.
3. После центрифугирования в течение 2 минут на максимальной скорости (примерно 13 000 об/мин) удаляется супернатант пипеткой. В случае необходимости процедуру центрифугирования можно повторить для удаления остатков этанола.
4. Осадок высушивается при комнатной температуре в течение 2-3 минут.
5. К высушенному осадку добавляется 70% муравьиная кислота пропорционально количеству осадка (от 1 до 80 мкл). Материал пепитируется для перемешивания.
6. В пробирку добавляется ацетонитрил в количестве равном объему муравьиной кислоты. Материал аккуратно перемешивается.
7. После центрифугирования в течение 2 минут на максимальной скорости (примерно 13 000 об/мин) отбирается 1 мкл супернатанта и наносится на точку мишени.
8. После полного высыхания материала на точке, он покрывается 1 мкл раствора матрицы (НССА).

При проведении исследования следует учитывать, что условия культивирования микроорганизмов имеют слабое влияние на результат идентификации. Возможна идентификация микроорганизмов, выросших на различных питательных средах. Для проведения идентификации необходимо использовать свежевыделенную культуру (инкубация в течение 12-24 часов) или, в случае медленно растущих микроорганизмов, допустимо использование культуры после инкубации до нескольких суток. В связи с быстрой деградацией культуры при хранении в условиях пониженной температуры рекомендовано хранение чашек с посевами при комнатной температуре при необходимости в течение нескольких дней.

4.5 Идентификация грибов

Видовую идентификацию выделенных культур грибов проводят по морфологическим признакам, а также методами MALDI-TOF-масс-спектрометрии.

4.5.1 Идентификация грибов по морфологическим признакам.

При изучении макроморфологии культур рекомендуется:

- оценить скорость роста и созревания на питательной среде;
- определить структуру колонии (пушистая, шерстистая, войлочная, бархатистая, клочковатая, мучнистая и т.д.);
- оценить поверхность колонии (плоская, складчатая, бугристая, зональная);
- определить цвет колонии;
- определить наличие экссудата на поверхности колонии.

Для изучения микроморфологии грибной культуры необходимо приготовить препарат методом «раздавленная капля»:

- на предметное стекло наносят каплю жидкости для приготовления препаратов (спирт + глицерина + дистиллированная вода в равных частях), для обильно спорулирующих культур, предположительно относящихся к родам *Aspergillus*, *Penicillium*, предпочтительно в качестве монтирующей жидкости использовать 40% молочную кислоту, обеспечивающую хорошую смачиваемость спор (конидий) грибов;
- в каплю помещают кусочек колонии гриба (диаметром 2-3 мм), вырезанный микологической лопаткой или скальпелем в виде треугольного сектора на границе спороносящей (пигментированной) и стерильной (белой) части колонии;
- двумя препаровальными иглами расправляют вырезанный кусочек колонии во избежание образования воздушных пузырьков;
- накрывают покровным стеклом.

Микроскопия культуры – быстрый и во многих случаях эффективный способ идентификации дрожжеподобных и плесневых грибов. При микроскопии принципиально важно дифференцировать дрожжевые и мицелиальные возбудители, а среди последних – *Aspergillus* spp. Грибы рода *Candida*, выявляемые при исследовании мокроты, следует расценивать как признак поверхностной колонизации слизистых оболочек дыхательных путей.

Характеристика культуры *Aspergillus fumigatus*

На агаре Сабуро колонии растут быстро (в течение 1-5 дней), серо-сине-зеленые, иногда с коричневатым оттенком, мучнистые, бархатистые или шерстисто-клочковатые. Обратная сторона колоний бесцветная или желтая.

При микроскопии культуры выявляются конидиальные головки, одноярусные, колончатые. Конидиеносцы гладкие, в верхней части зеленоватые. Верхушечное вздутие (везикул) суббулавовидное, диаметром 20-30 мкм. Фиалиды (конидиогенные клетки) плотно прижаты друг к другу и направлены вверх, покрывают от 1/3 до 2/3 поверхности везикула. Конидии сферические, диаметром 2,5-3,0 мкм, в цепочках. Гриб термофильный, хорошо растет при 37 °С, некоторые штаммы способны к росту при 52 °С.

Характеристика культуры *A. flavus*

Колонии желто-зеленые. При микроскопии выявляются конидиальные головки двух типов: мелкие, одноярусные и крупные радиальные двух ярусные. Конидиеносцы шероховатые, бесцветные. Конидии желто-зеленые, шиповатые, сферические, диаметром 3,5 мкм. Гриб термофильный, хорошо растет при 37 °С.

Характеристика культуры *A. niger*

Колонии черные. При микроскопии выявляются конидиальные головки, крупные, двух ярусные, радиальные. Конидиеносцы гладкие, бесцветные или коричневые. Везикулы сферические, диаметром 50-100 мкм. Конидии шероховатые, коричневые, сферические, диаметром 3,5-5,0 мкм. Хорошо растет при 37 °С.

Характеристика культуры *A. terreus*

Колонии растут медленнее (в течение 5-10 дней), розовато-желто-коричневые. При микроскопии выявляются конидиальные головки двух ярусные, колончатые. Конидиеносцы гладкостенные, бесцветные. Везикулы субсферические, диаметром 10-20 мкм. Метулы по длине равны фиалидам. Конидии сферические, диаметром 1,5-2,5 мкм, бесцветные.

Характеристика культуры *Scedosporium apiospermum*

Видимый рост колоний при выращивании при 35-37 °С появляется на 5-7 сутки после посева. При 28 °С гриб развивается быстрее. Колонии пушистые, серые. При микроскопии выявляются крупные (размеры 6-12 x 3,5-4,0 мкм) овальные одноклеточные конидии с усеченным основанием, от бесцветных до коричневых, расположенные по одиночке или в ложных слизистых головках у верхушки длинной узкой аннелиды (конидиогенная клетка).

Характеристика культуры *Fusarium spp.*

Колонии быстро растущие, окрашены в различные цвета в зависимости от вида и штамма. Часто колонии пушистые, но могут быть гладкие, слизистые. Могут формироваться конидии трех типов: макроконидии, микроконидии, бластоконидии. Отличительный признак грибов этого рода – серповидно изогнутые многоклеточные макроконидии.

Характеристика культуры *Exophiala dermatitidis*

Гриб относится к так называемым «черным дрожжам». Колонии на агаре Сабуро с ограниченным ростом, коричневые, гладкие, часто выделяют в агар коричневый пигмент. При микроскопии культуры выявляются почкующиеся дрожжевые клетки. По периферической части колоний формируются гифы, несущие конидиогенные клетки: аннелиды и фиалиды, в которых развиваются эллипсоидные аннелоконидии размером 2,5-4,0 x 2-3 мкм и мелкие фиалоконидии.

Хорошо растет при 37 °С и 40 °С.

D	• При затруднениях в идентификации выделенных культур микромицетов рекомендуется направлять их в специализированную микологическую лабораторию. Уровень достоверности доказательства 3.
---	---

Комментарий: Выделенные культуры микромицетов должны передаваться в микологические лаборатории для дальнейшей идентификации и определения чувствительности к антимикотическим препаратам согласно СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортировки микроорганизмов I-IV групп патогенности».

Экспертные-лаборатории:

	НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина (подразделение СЗГМУ им. Мечникова) Фактический и почтовый адрес: 194291, г. Санкт-Петербург, ул. Сантьяго-де-Куба, д.1/28 Директор д.б.н. Васильева Наталья Всеволодовна Приемная директора Документовед- Трусова Екатерина Владимировна Тел. (812) 303-51-40 Факс: (812) 510-62-77 E-mail: mycobiota@szgmu.ru
	НИЛ микологического мониторинга и биологии грибов Зав. лабораторией к.б.н. Богомолова Татьяна Сергеевна Тел. (812) 510-62-69 E-mail: tatiyana.bogomolova@szgmu.ru

4.5.2. Идентификация плесневых грибов с применением времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS)

Для идентификации плесневых грибов с применением MALDI-ToF MS необходимо получение биомассы гриба без спор, что достигается культивированием чистой культуры грибов в ротаторе, помещенном в термостат. После получения достаточного количества биомассы пробирка извлекается из ротатора и отстаивается в вертикальном положении в течение 10 минут. 1,5 мл жидкости с осадком со дна пробирки переносится в эппендорф.

После центрифугирования в течение 2 минут на максимальной скорости (примерно 13 000 об/мин) не затрагивая осадок, удаляется супернатант и к осадку добавляется 1 мл деионизированной воды. Полученная суспензия вортексируется в течение 1 минуты с последующим центрифугированием в течение 2 минут на максимальной скорости (примерно 13 000 об/мин). После центрифугирования удаляется супернатант. При необходимости можно провести повторно этапы отмывки осадка водой. После отмывки к осадку добавляется 300 мкл воды и 900 мкл этанола. Полученную суспензию вортексировать несколько секунд и центрифугировать в течение 2 минут на максимальных оборотах. После удаления супернатанта и высушивания осадка при температуре 37°C в течение 5-10 минут добавляется 70% муравьиная кислота пропорционально полученному осадку от 10 до 100 мкл. К полученной суспензии добавляется равное по объему муравьиной кислоты количество ацетнитрила. После перемешивания и центрифугирования на максимальной скорости (примерно 13 000 об/мин) 1 мкл супернатанта наносится на точку мишени. После высыхания при комнатной температуре материал на точке покрывается 1 мкл раствора матрицы НССА.

Альтернативным методом возможна идентификация плесневых грибов при условии получения колоний на плотных питательных средах до начала спороношения с использованием расширенный метод прямого нанесения.

5. Определение чувствительности к антибактериальным препаратам

Определение чувствительности микроорганизмов, выделенных от пациентов с МВ к антибактериальным препаратам, и интерпретацию результатов рекомендуется проводить в соответствии с актуальной версией рекомендаций по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. (Клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», 2015г). [101].

Современные стандартизированные методы определения чувствительности к антибиотикам подразделяются на методы серийных разведений (в агаре и бульоне, метод микроразведений в бульоне)) и диффузионные (диско-диффузионный метод и градиентный метод). Метод серийных разведений и градиентный метод позволяют получить количественную характеристику чувствительности микроорганизмов – минимальную подавляющую концентрацию (МПК) антибиотика в отношении возбудителя. Диско-диффузионный метод (ДДМ) является полуколичественным и его применение позволяет разделить все штаммы на три категории - чувствительные, умеренно-резистентные и резистентные.

Бактерии, которые вызывают хронические инфекции при МВ, могут расти в виде смеси колониальных морфотипов одного и того же микроорганизма. Чувствительность различных морфотипов в пределах одного образца может значительно варьировать [102]. Также некоторые фенотипы патогенов при МВ наряду с представителями, обладающими нормальной скоростью роста, могут быть медленно растущими.

Все эти факторы предопределяют особенности определения чувствительности микроорганизмов, выделенных при респираторных инфекциях у пациентов с МВ:

- существуют критерии интерпретации результатов определения чувствительности для *S. aureus*, порядка *Enterobacteriales*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* (пограничные значения МПК (мг/л) и диаметры зон подавления роста (мм) АМП);
- не определены критерии интерпретации результатов определения чувствительности для других важных микроорганизмов при МВ, таких как *Achromobacter* spp.;
- также не представлены критерии интерпретации для многих представителей НГОВ- *Ralstonia pickettii*, *Pandora* spp. или *Inquilinus limosus*;
- для *S. maltophilia* пограничные значения EUCAST установлены только для триметоприма - сульфаметоксазола;
- в настоящее время EUCAST не рекомендует проводить рутинное определение чувствительности для представителей *B. cepacia* complex.

Несмотря на то, что есть некоторые данные о распределении МПК «дикого типа штаммов» [102], опубликовано мало данных о корреляции чувствительности к антибиотикам *in vitro* с клинической эффективностью лечения. На практике лечение таких инфекций, в том числе опасных для жизни "сераси́а- синдрома", как правило, проводится эмпирически, на основе комбинации 3-4 антибиотиков, с различными путями введения. [103].

Следует также учитывать, что подавляющее большинство критериев для определения категорий активности АМП по отношению к микробу («чувствительный» - «умеренно-резистентный» - «резистентный») основано на сывороточной концентрации АМП. В связи с широким применением ингаляционных форм антибиотиков эти критерии теряют свою значимость, поскольку в случае ингаляции локальные концентрации действующих веществ многократно превышают те, которые можно достичь при парентеральном способе введения. Использование только стандартных критериев, таким образом, может привести к ошибкам интерпретации результатов исследования чувствительности микроорганизмов для ингаляционных форм антибиотиков [12,104].

В	• Определение чувствительности микроорганизмов, выделенных от пациентов с МВ к антибактериальным препаратам и интерпретацию результатов рекомендуется проводить в соответствии с актуальной версией рекомендаций по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (Клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», 2018г. [101].
----------	--

5.1 Определение чувствительности *S. aureus*

При оценке чувствительности *S. aureus*, в первую очередь необходимо тестировать препараты, имеющие основное клиническое значение: β-лактамы, макролиды, фторхинолоны, аминогликозиды и гликопептиды.

В таблице 7 представлен рекомендуемый для тестирования перечень групп антибактериальных препаратов с представителем по группам антибиотиков, а также указаны рекомендуемые методы определения чувствительности *S. aureus* [105].

Таблица 7

Антибактериальные препараты для определения чувствительности *S. aureus*

Группа АБП	Представитель группы	Метод определения	
Аминогликозиды	Гентамицин	МПК ¹	ДДМ ²
Анзамицины	Рифампицин	МПК	ДДМ
Анти-MRSA цефемы	Цефтаролин	МПК	ДДМ
Антистафилококковые β-лактамы	Цефокситин (скрининг)	-	ДДМ
Фторхинолоны	Ципрофлоксацин Моксифлоксацин	МПК МПК	ДДМ ДДМ
Ингибиторы синтеза фолиевой кислоты	Триметоприм/сульфаметоксазол	МПК	ДДМ
Гликопептиды	Ванкомицин	МПК	-
Глицилциклины	Тигециклин	МПК	ДДМ
Линкозамиды	Клиндамицин	МПК	ДДМ
Макролиды	Эритромицин	МПК	ДДМ
Оксазолидиноны	Линезолид	МПК	ДДМ
Фениколы	Хлорамфеникол	МПК	ДДМ
Тетрациклины	Тетрациклин	МПК	ДДМ

МПК¹- одни из методов определения минимальной подавляющей концентрации

ДДМ²- диско-диффузионный метод

Как было сказано выше, при хронической колонизации нижних дыхательных путей *S. aureus* у пациентов с МВ данный микроорганизм высевается на протяжении длительного промежутка времени (месяцев и лет). Поэтому определение чувствительности ко всему

перечню рекомендуемых антимикробных препаратов при каждом высеве *S. aureus* проводить не целесообразно.

А	• Определение чувствительности типичных штаммов <i>S. aureus</i> к антимикробным препаратам может быть выполнено диско-диффузионным методом, методом градиентной диффузии, с использованием тест-систем, основанных на методе определения пограничных концентраций или методами серийных разведений (определение МПК). Уровень достоверности доказательства 1++ [101].
С	• Определение чувствительности <i>S. aureus</i> ко всему перечню перечисленных для тестирования антимикробных препаратов рекомендуется проводить не чаще 2 раз в год. При всех последующих микробиологических исследованиях при выделении <i>S. aureus</i> рекомендуется проведение скрининга резистентности к β-лактамам у выделенного штамма с помощью цефокситина. Уровень достоверности доказательства 3 [13].

5.1.1 Тесты для выявления MRSA

- **Цефокситин-скрининг**

Определение чувствительности к цефокситину ДДМ позволяет надежно выявить резистентность, связанную с присутствием генов *mecA* или *mecC* у *S. aureus* и тем самым отнести выделенный штамм к MRSA [106].

Для выявления MRSA используются также:

- **метод посева биоматериала на хромогенные агары, содержащие антимикробные агенты с хромогенным индикатором для выявления MRSA.** Хромогенный индикатор выявляет характерным цветом колонии MRSA, который отличает его от других видов *Staphylococcus*, а селективный компонент ингибирует рост бактерий, чувствительных к цефокситину. Применение хромогенных агаров для выявления MRSA особенно важно для пациентов с МВ в связи с возможностью одновременной колонизации дыхательных путей таких пациентов штаммом MRSA и штаммом *S. aureus*, чувствительным к метициллину [107,108].
- **латекс-агглютинации для выявления ПСБ2а**

Метод латекс-агглютинации является наиболее быстрым методом выявления MRSA, однако чувствительность его существенно ниже по сравнению с методом скрининга с цефокситином, который одновременно является точным, доступным и недорогим методом определения MRSA [109,110].

- **определение *tesA*-гена**

Для выявления MRSA можно также использовать молекулярно-генетический метод на основе ПЦР. В отличие от традиционных микробиологических методов, метод ПЦР позволяет проводить идентификацию генетических детерминант резистентности микроорганизмов в течение 4 часов. Он отличается высокой точностью и меньшими требованиями к забору материала, не требует наличия питательных сред, дисков с антибиотиками и дополнительных реактивов.

- Для выявления **MRSA** рекомендуется применения одного из методов:

В	• Определение чувствительности к цефокситину диско-диффузионным методом; • Посев респираторных образцов на хромогенные среды для MRSA; • Метод латекс-агглютинации для выявления пенициллинсвязывающего белка ПСБ2а штаммов <i>S. aureus</i>; • Молекулярно-генетический метод (ПЦР) обнаружения гена <i>tesA</i> как в биоматериале, так и выросших штаммов <i>S. aureus</i>. Уровень достоверности доказательства 1+ [81].
---	--

Комментарии: *Определение чувствительности аукотрофных штаммов *S. aureus* или *S. aureus* (SCV) вариант мелких колоний может быть более сложным и требует применения метода латекс-агглютинации для выявления ПСБ2а или молекулярно-генетического метода (ПЦР) обнаружения гена *tesA*.*

5.1.2 Определение устойчивости *S. aureus* к ванкомицину

Препаратами выбора при респираторной инфекции у пациентов, вызванных MRSA, являются гликопептиды (ванкомицин и тейкопланин) и оксазолидиноны (линезолид). В настоящее время широко обсуждаются вопросы клинической эффективности ванкомицина в отношении штаммов со сниженной чувствительностью к ванкомицину (VISA) и о штаммах, резистентных к ванкомицину [111, 112].

В	• У всех выделенных штаммов MRSA рекомендуется определять МПК ванкомицина. • Для выявления штаммов со сниженной чувствительностью к ванкомицину рекомендуется проводить определение МПК ванкомицина методом последовательных разведений или методом градиентной диффузии. [101].
---	---

5.1.3 Определение индуцибельной устойчивости *S. aureus* к клиндамицину

Макролиды, линкозамиды и стрептограминны объединены в одну группу (МЛС), это связано с общностью их механизмов действия и резистентности к ним микроорганизмов. Устойчивость к препаратам группы МЛС может быть связана с модификацией мишени действия, их активным выведением и быстрой инактивацией.

Наиболее распространенным и клинически важным механизмом резистентности стафилококков к препаратам данной группы является метилирование рРНК (если точнее – аденина в 23S-рибосомальной РНК). Известны два основных типа экспрессии устойчивости, связанной с метилированием: конститутивный и индуцибельный. При конститутивном типе синтез фермента метилазы (соответственно модификация мишени) происходит постоянно и не зависит от внешних условий, и бактерии проявляют перекрестную устойчивость ко всем макролидам, линкозамидам и стрептограминам. При индуцибельном – фермент синтезируется только в ответ на появление в окружающей среде антибиотиков. Штаммы с индуцибельным характером экспрессии метилаз, устойчивые к 14- и 15-членным макролидам, *in vitro* могут тестироваться как чувствительные ко всем макролидам, линкозамидам и стрептограминам, но клинически возможен неуспех при лечении линкозамидами и 16 -членным макролидам [113]. Выявление индуцибельной резистентности к клиндамицину выполняется с помощью ДДМ путем размещения дисков с эритромицином и клиндамицином рядом на расстоянии 12-20 мм между краями дисков. Уплотнение зоны подавления роста вокруг диска с клиндамицином (выглядит как буква D и поэтому называется D-зона) свидетельствует об индуцибельной резистентности.

Некоторые диспенсеры для нанесения дисков на поверхность агар на чашки Петри могут размещать диски на расстоянии до 26мм друг от друга, даже если диски помещены в соседние позиции. Поэтому, прежде чем такой метод нанесения дисков будет принят в лаборатории в качестве стандартного, размещение дисков на расстоянии 12-20мм, а не 26мм друг от друга, может сделать тест более чувствительным, а интерпретацию более понятной [114]. В таком случае один из дисков должен быть размещен на чашке с агаром вручную, а не дисковым диспенсером.

В	У штаммов <i>S.aureus</i> рекомендуется выявлять индуцибельную резистентность к клиндамицину диско-диффузионным методом путем размещения дисков с эритромицином и клиндамицином рядом на расстоянии 12-20 мм между краями дисков [101].
----------	---

5.2 Определение чувствительности *P. aeruginosa*

Особенностью *P. aeruginosa* является свойственная природная резистентность ко многим группам АБП и активное распространение штаммов с приобретенной резистентностью (Приложение Б8).

В таблице 8 представлен рекомендуемый для тестирования перечень групп антибактериальных препаратов с представителем по группам антибиотиков, а также указаны рекомендуемые методы определения чувствительности *P. aeruginosa* [105].

Таблица 8

Антибактериальные препараты для определения чувствительности *P. aeruginosa*

Группа АБП	Представитель группы	Метод определения	
Аминогликозиды	Гентамицин Тобрамицин Амикацин Нетилмицин	МПК	ДДМ
Карбапенемы	Имипенем Меропенем Дорипенем	МПК	ДДМ
Цефалоспорины	Цефтазидим Цефепим	МПК	ДДМ
Фторхинолоны	Ципрофлоксацин Левифлоксацин	МПК	ДДМ
Антисинегнойные пенициллины+ ингибиторы β -лактамаз	Тикарциллин/клавуланат Пиперациллин/тазобактам	МПК	ДДМ
Монобактамы	Азтреонам	МПК	ДДМ
Полимиксины	Колистин (полимиксин Е) Полимиксин В	МПК*	-

МПК*- следует использовать только метод определения МПК (только метод микроразведений в бульоне

В	• МПК колистина следует определять только методом микроразведений в бульоне [101].
----------	---

Выделение от пациентов с МВ разных морфотипов *P. aeruginosa*, включая мукоидные фенотипы и варианты мелких колоний, диктует выбор метода определения чувствительности к АМП.

Для типичных штаммов *P. aeruginosa* тестирование может быть выполнено как ДДМ, так и с использованием тест-систем, созданных на основе последовательных разведений как в варианте пограничных концентраций, так и серийных разведений с определением МПК, а также определение МПК методом градиента [115,116,117].

При выборе метода определения чувствительности для мукоидных штаммов *P. aeruginosa* необходимо иметь в виду, что при использовании тест-систем для визуального либо автоматического считывания результатов, мукоидные штаммы могут быть ошибочно отнесены в категорию чувствительных из-за замедленного недостаточного роста в течение времени, рекомендованного для времени инкубации тест-систем.

С другой стороны, определение мукоидных штаммов *P. aeruginosa*, как устойчивых к АМП, может быть результатом присутствия большого количества слизи (альгината экзополисахарида). Наличие альгината приводит к помутнению лунок с АБП в тест-системах без адекватного бактериального роста. И результаты в таких лунках тест-систем могут быть определены как ложно устойчивые [118].

Эти ограничения привели к тому, что для мукоидных штаммов *P. aeruginosa* рекомендуемыми методами определения чувствительности являются ДДМ и градиентный метод определения МПК [119,120].

Для медленно растущих мельчайших морфотипов *P. aeruginosa* также не рекомендуются применение тест-систем для автоматического считывания результатов.

Они часто проявляют замедленный и недостаточный рост через 24 часа инкубации, когда все анализаторы завершают процесс инкубации тест-систем. Поэтому считывание часто становится невозможным, либо осуществляется недостоверно [119,120].

В	• Определение чувствительности <i>P. aeruginosa</i> рекомендуется проводить отдельно для каждого морфотипа с указанием профиля чувствительности по каждому морфотипу. Уровень достоверности доказательства 2 - [121].
В	• Для типичных штаммов <i>P. aeruginosa</i> определение чувствительности рекомендуется выполнять любым стандартизованным методом. Уровень достоверности доказательства 2+ [101,122].
С	• Для мукоидных штаммов <i>P. aeruginosa</i> рекомендуется определять чувствительность диско-диффузионный и градиентным методом. Уровень достоверности доказательства 2+ [122].

5.2.1 Определение МПК тобрамицина в отношении *P. aeruginosa*

Развитие резистентности к антисинегнойным АМП привело к поиску новых терапевтических подходов и альтернативных способов доставки антибиотика. Одним из таких подходов является применение ингаляционных форм АМП. Общепринятое определение чувствительности *P. aeruginosa* к тобрамицину не предсказывает эффективности ингаляционной терапии. Концентрация тобрамицина в дыхательных

путях при ингаляциях достигает таких значений (от 100 до 200 мкг/мл), которые значительно превышают значения достижимых концентраций в сыворотке крови [123,124].

Доказано, что если отношение максимальной концентрации тобрамицина, достигаемой при ингаляции, к минимальной подавляющей концентрации аминогликозидов для *P. aeruginosa* колеблется от 8 до 12, то это соотношение является предиктором эффективности ингаляционного применения препарата ($T_{\max}/MIC = 8-12$). При создании очень высоких концентраций возможно воздействие на формально устойчивые к препарату штаммы *P. aeruginosa*.

В	• Для ингаляционных форм тобрамицина наряду с определением степени чувствительности <i>P. aeruginosa</i> (чувствительные, умеренно-резистентные и резистентные) рекомендуется определять значение МПК. Уровень достоверности доказательства 2+ [125].
----------	--

Комментарий: Испанским советом по стандартизации чувствительности и резистентности к антибиотикам MENSURA в 2005 году пересмотрены и установлены более высокие точки отсечения для ингаляционных форм введения тобрамицина при определении чувствительности *P. aeruginosa* точки для чувствительных штаммов <64 мг/л, для устойчивых штаммов >128 мг/л, по сравнению со значением ≤4 мг/л для чувствительных штаммов и >4 мг/л для устойчивых штаммов при парентеральном введении [125].

5.3 Определение чувствительности *B. ceracia complex*

Бактерии комплекса *B. ceracia* относятся к числу бактерий, обладающих природной устойчивостью ко многим классам антибиотиков.

Штаммы *B. ceracia complex* природно резистентны к полимиксинам (колистину/полимиксину Е, полимиксину В) и аминогликозидам, имипенему и ко всем цефалоспорином за исключением цефтазидима. Также *B. ceracia complex* обладают природной резистентностью к тетрациклинам и ципрофлоксацину.

Клинические штаммы *B. ceracia complex* могут быть чувствительными только к очень небольшому числу АМП, включая тиметоприм-сульфаметоксазол, цефтазидим, хлорамфеникол, миноциклин, меропенем и некоторые фторхинолоны [126, 127,128].

Выбор методологии определения чувствительности к АМП у *B. ceracia complex* является затруднительным, так как только метод микроразведений в бульоне Мюллера-Хинтон обеспечивает получение воспроизводимых результатов.

Метод градиентной диффузии и ДДМ не дают воспроизводимых результатов.

А	• По идеологии EUCAST не представляется возможным рекомендовать определение чувствительности бактерий <i>B. ceracia complex</i> для выбора антимикробных препаратов для терапии инфекций, вызванных представителями этой группы микроорганизмов. Уровень достоверности доказательства 1+ [101].
----------	---

Несмотря на то, что в настоящее время теоретически наиболее обоснованным представляется комплекс подходов к оценке чувствительности и интерпретации результатов предлагаемый EUCAST, в стандартах Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) приведены критерии интерпретации результатов определения чувствительности *B. ceracia complex*: пограничные значения МПК (мг/л) и диаметров зон подавления роста (мм) АМП. Изоляты *B. ceracia complex*, которые изначально могли быть чувствительными к перечисленным АМП, могут стать устойчивыми после нескольких курсов антибактериальной терапии и определение чувствительности может быть оправдано в данных случаях [118].

В таблице 9 представлен рекомендуемый CLSI (2017 г.) для тестирования перечень групп антибактериальных препаратов с представителем по группам АМП, а также указаны рекомендуемые методы определения чувствительности бактерий группы *B. ceracia complex* с пограничными значениями диаметра зон подавления роста при ДДМ и пограничными значениями МПК.

Таблица 9

Антибактериальные препараты для определения чувствительности *B. ceracia complex*

Группа АМП	Представитель группы	Пограничные значения диаметра зон подавления роста (мм)			Пограничные значения МПК (мг/л)		
		S	I	R	S	I	R
Антисинегнойные пенициллины+ ингибиторы β-лактамаз	Тикарциллин/клавуланат	-	-	-	≤16/2	32/2 64/2	≥128/2
Цефалоспорины	Цефтазидим	≥21	18-20	≤17	≤8	16	≥32
Карбапенемы	Меропенем	≥20	16-19	≤15	≤4	16	≥32
Фторхинолоны	Левифлоксацин	-	-	-	≤2	8	≥16
Ингибиторы синтеза фолиевой кислоты	Триметоприм/сульфаметоксазол	≥16	11-15	≤10	≤2/38	-	≥4/76
Фениколы	Хлорамфеникол	-	-	-	≤8	16	≥32

С	• В случае необходимости определения чувствительности <i>B.ceracia complex</i> рекомендуется использовать методы и критерии, определенные актуальными стандартами CLSI. Уровень достоверности доказательства 2- 118]
----------	--

5.4. Определение чувствительности *S. maltophilia*

Серьезной проблемой при лечении инфекций, вызванных *S. maltophilia*, является природная резистентность этого микроорганизма к антибиотикам, особенно к аминогликозидам и карбапенемам. *S. maltophilia*, как правило, устойчивы к карбапенемам в связи с наличием природной карбапенемазы [129]. Также *S. maltophilia* устойчивы к большинству β -лактамовых антибиотиков. Цефтазидим может проявлять активность в отношении штаммов *S. maltophilia*, но развитие резистентности с течением времени является общим явлением у пациентов с МВ. Некоторые изоляты *S. maltophilia* могут быть чувствительными к пиперациллин/тазобактаму и тикарциллин/клавуланату, но, как правило, их доля не превышает 25%. Из фторхинолонов *in vitro* левофлоксацин более активен, чем цiproфлоксацин. Триметоприм-сульфаметоксазол является наиболее активным АМП в отношении *S. maltophilia* [130, 131].

В настоящее время пограничные значения EUCAST установлены только для триметоприма/сульфаметоксазола, так как он является препаратом с наиболее подтвержденной клинической активностью.

В	• При определении чувствительности штаммов <i>S. maltophilia</i> следует руководствоваться актуальной версией Клинических рекомендаций по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Уровень достоверности доказательства 2++ [101].
----------	---

5.5. Определение чувствительности *Achromobacter* spp.

Achromobacter spp. являются микроорганизмами со множественной резистентностью к АМП [132].

В настоящее время не определены стандарты определения чувствительности штаммов *Achromobacter* spp. Исследование чувствительности *Achromobacter* spp. от пациентов с МВ показали, что штаммы *Achromobacter* spp. устойчивы к аминогликозидам, фторхинолонам. От 40 до 60% исследуемых штаммов *Achromobacter* spp. проявляли

чувствительность к имипенему, меропенему, цефтазидиму, тикарциллин/клавуланату, пиперациллину, пиперациллин/тазобактаму [133].

С	• При необходимости определения чувствительности <i>A.xylosoxidans</i> следует руководствоваться ФК/ФД (невидоспецифическими) пограничными значениями для МПК в соответствии с рекомендациями EUCAST либо согласно актуальной версии Клинических рекомендаций. Уровень достоверности доказательства 3 [101].
----------	---

Комментарии: ФК/ФД пограничные значения применяются только при отсутствии видоспецифических пограничных значений или других рекомендаций в видоспецифических таблицах.

Рекомендуется проводить определение МПК градиентным методом, так как применение тест-систем для автоматического считывания не всегда подходит для определения МПК из-за недостаточного роста медленно растущих штаммов *Achromobacter* spp в течение 24 часов инкубации.

5.6. Определение чувствительности *B. gladioli*, *Ralstonia* spp., *Cupriavidus* spp., *Pandoraea* spp. и *Inquilinus* spp.

- *Burkholderia gladioli* более чувствительные к антимикробным препаратам, чем *B. ceracia*, в частности, к аминогликозидам;
- *Ralstonia* spp. Нет достоверных данных по устойчивости к противомикробным препаратам штаммов *Ralstonia* spp., выделенных от пациентов с МВ. *R. pickettii*, как правило, *in vitro* устойчивы (до 50%) к колистину, цефтазидиму, тикарциллин/клавуланату, меропенему, амикацину, тобрамицину и гентамицину. Как правило, чувствительны (70%) к цефтриаксону, цефепиму, имипенему, пиперациллину, пиперациллин/тазобактаму, фторхинолонам и триметоприм-сульфаметоксазолу. Штаммы *Ralstonia* spp. могут быть устойчивыми к меропенему и чувствительными к имипенему, так как обратное, как правило, является характеристикой штаммов *B.ceracia* complex [134];
- *Pandoraea* spp. Штаммы *Pandoraea* spp. обладают множественной лекарственной устойчивостью к β-лактамам антибиотикам, азтреонаму и аминогликозидам, но имеют различную чувствительность к фторхинолонам [135,136]. Изоляты могут быть чувствительны к доксициклину, имипенему.

- ***Inquilinus* spp.** Штаммы *Inquilinus* spp. выделяются из дыхательных путей небольшого количества пациентов с МВ. Обладает *in vitro* устойчивостью к тиметоприм-сульфаметоксазолу, аминогликозилам, цефалоспорином, колистину. Цефтазидим, имипенем и ципрофлоксацин *in vitro* проявляют активность [137].

С	• Чувствительность <i>Burkholderia gladioli</i>, <i>Ralstonia</i> spp., <i>Pandora</i> spp., <i>Cupriavidus</i> spp. и <i>Inquilinus</i> spp. при необходимости рекомендуется определять МПК в каждом конкретном случае. Уровень достоверности доказательства 3 [134].
----------	--

Комментарий: Чувствительность должна определяться с использованием метода последовательных разведений. Для определения МПК этих микроорганизмов можно использовать градиентный метод, однако достоверных данных об эффективности применения этого метода в настоящее время не получено.

В	• При определении чувствительности следует руководствоваться ФК/ФД (невидоспецифическими) пограничными значениями для МПК в соответствии с рекомендациями EUCAST либо с актуальной версией Клинических рекомендаций. Уровень достоверности доказательства 3 [101].
----------	---

5.7. Определение чувствительности *H. influenzae*

β -лактамы (амоксциллин, амоксициллин/клавуланат, цефтриаксон, цефотаксим, цефтибутен), макролиды, левофлоксацин и моксифлоксацин являются наиболее активными препаратами в отношении *H. influenzae*.

Продукция β -лактамаз является основным механизмом устойчивости к аминопенициллинам и некоторым цефалоспорином у штаммов *H. influenzae*.

В	• Несмотря на относительно низкий уровень распространения β-лактамаз у штаммов <i>H. influenzae</i> рекомендуется проводить их определение. Уровень достоверности доказательства 2- [138].
----------	---

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 аминокислотную связь в β -лактамном кольце нитроцефина, в результате чего происходит видимое невооруженным глазом изменение цвета. [81].

5.8 Определение чувствительности грибов рода *Aspergillus*

Чувствительность микромицетов в антимикотическим препаратам определяют согласно актуальной версии Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» Версия 2018.

С	• При повторных выделениях культуральным методом грибов вида <i>Aspergillus</i> на фоне длительной противогрибковой терапии, наличия клинических признаков АБЛА, соответствующих результатов лабораторных исследований рекомендуется направлять штаммы <i>Aspergillus</i> spp. в микологическую лабораторию для определения чувствительности к антимикотикам. Уровень достоверности доказательства 2- 139,140].
----------	--

Комментарий: координаты микологических референс-лабораторий представлены в разделе 4.5 Идентификация грибов.

6.Нетуберкулезные микобактерии

6.1 Представители рода микобактерий

Микобактерии - относятся к роду актиномицетов семейства *Mycobacteriaceae*. В настоящее время насчитывается более 156 таксономических названий микобактерий, часть из которых патогенны для млекопитающих, в том числе для человека.

Вызываемые микобактериями заболевания, широко известны на протяжении многих столетий, это лепра и туберкулез. В 1954 году, после того, как Timpe A., Runyon E.H. [141] в своем обзоре сообщили о заболеваниях человека, вызванных нетуберкулезными микобактериями (НТМБ), интерес к микобактериозу, как инфекционному поражению органов человека, в том числе и легких, необычайно возрос и за последние годы выделился как актуальная мировая проблема.

В последующие годы значительно совершенствовались методы выявления НТМБ и видовой идентификации, появились современные молекулярные технологии, позволяющие идентифицировать микроорганизм до вида. Таким образом, выявление, идентификация и определение лекарственной чувствительности НТМБ сократилось с 6-10 месяцев до 4-6 недель.

Во всем мире по распространенности и возможности вызывать поражения у человека, лидируют микобактерии туберкулеза, и забывать об этом опасном возбудителе не следует. За 2015 год туберкулез в мире поразил 10,8 миллиона человек.

Эпидемиология других микобактериальных инфекций, вызываемых НТМБ, в

основном зависит от географического положения, климатических показателей и общей эпидемиологической ситуации в регионе.

В последние годы число случаев заболевания микобактериозом в различных регионах мира значительно увеличилось [142,143,144,145,146,147].

Региональные отличия в распространении НТМБ характеризуются следующими особенностями: в Европейских странах 34% составляют НТМБ, относящиеся к *M. avium complex* (*M. avium*-*M. intracellulare*) (МАС), на втором месте - *M. gordonae* (17%) и на третьем - выявляются с одинаковой частотой *M. xenopi* и *M. fortuitum* (7-9%). В ряде Азиатских стран МАС не являются доминирующими: в Китае они встречаются только в 13% случаев. *M. gordonae* в Азии встречается только в 4% случаев микобактериоза. Также крайне редки в Азии характерные для Европы *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. lentiflavum*. В то же время в Европейских странах практически не встречаются *M. scrofulaceum* и *M. flavescens*, широко представленные в странах Азии [148].

В Российской Федерации распространенность НТМБ изучена недостаточно. Охарактеризованы популяции, выделенные от больных из фтизиатрических учреждений города Москвы, среди которых преобладают НТМБ *M. avium complex* (32%), *M. kansasii* (32%), *M. xenopi* (14%) и *M. fortuitum* (14%) [149,150].

Проводился мониторинг НТМБ, циркулирующих в Ленинградской области, показавший доминирование в регионе *M. avium complex* (75%), на 2-м месте по распространенности была *M. kansasii*, которая встречалась лишь в 5% случаев [151].

В отдельных регионах Европейской части РФ по итогам исследования 1204-х диагностических образцов, выделенных от 727 больных, выявлено 17 видов НТМБ. Среди исследованных штаммов в основном преобладали медленнорастущие НТМБ (77,58%). Значительно реже встречались быстрорастущие микобактерии *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*.

Встречаемость в порядке убывания для разных видов была следующей: *M. avium* (28,89%), *M. gordonae* (13,62%), *M. intracellulare* (9,35%), *M. lentiflavum* и *M. fortuitum* (9,08%), *M. abscessus* (6,74%), *M. kansasii* (6,60%), *M. xenopi* (3,99%), кроме того, 12,6% приходилось на редко встречающиеся виды и бактерии рода *Mycobacterium*, для которых вид стандартными диагностическими тестами определить не удалось [152].

Необходимо учитывать, что больные МВ сталкиваются уже с известным бактериальным фоном, поэтому следует учитывать данные об общей распространенности клинически значимых видов нетуберкулезных микобактерий.

У больных МВ число случаев поражения легких бактериями рода *Mycobacterium* в последние годы также увеличивается [153].

В международной печати встречаются единичные сообщения о выявлении у данной категории больных поражений легких, вызванных *M. tuberculosis*, как устойчивых, так и чувствительных к известным противотуберкулезным препаратам [154,162]. За период с 2013 года в клинике ФГБНУ «ЦНИИТ» *M. tuberculosis* с чувствительностью к противотуберкулезным препаратам была выявлена у одного пациента с МВ.

Тем не менее, на первом месте у данной категории больных поражения легких в основном вызывают нетуберкулезные микобактерии (НТМБ).

В 90-х годах после динамических наблюдений в центрах МВ начали сообщать о пациентах, у которых предполагалось наличие НТМБ, число выявленных случаев колебалось от 2 до 28% [156]. По оценкам ученых, распространенность НТМБ среди больных МВ выросла с 1,3%, по результатам самого первого исследования, проведенного в 1981 году, до 13% , по данным многоцентрового исследования в США, опубликованного в 2002 году [157] и до 32,7%, по данным исследования взрослых пациентов в возрасте 40 лет и старше с МВ в штате Колорадо, США [150].

Исследования, проведенные в Израиле у пациентов с МВ, осложненном НТМБ, показало, что число случаев было очень высоким в центре, на юге страны и в прибрежных городах, где погода характеризовалась высокими температурами и влажностью. Однако в Иерусалиме, который расположен в сухой горной местности, число случаев МВ, осложненного микобактериозом, было гораздо ниже [159]. Было отмечено, что разнообразие видов НТМБ, выделяемых от пациентов с МВ, вероятно, меняется в зависимости от географического положения места. В Соединенных Штатах *M. avium* complex (MAC), *M. kansasii* наиболее часто вызывают поражения легких у этих больных [157]. Однако в Европе, главным видом микобактерий, выявляющихся у больных МВ, является *M. abscessus* [156].

Хотя ранее в мире НТМБ не считались главным инфекционным агентом, способным вызывать заболевания у человека, описание микобактериоза, вызванного *M. abscessus*, у больных МВ позволяют изменить отношение к значимости этой инфекции для больных [158,160,161].

Особенно важно, что внутрибольничное распространение инфекции НТМБ у больных МВ ранее считали маловероятным [157]. Однако расследование перекрестной контаминации, проведенное в Израиле методом молекулярного типирования штаммов *M. abscessus* подвида *massiliense*, выявило передачу штамма с множественной лекарственной устойчивостью от одних пациентов к другим [161]. Это произошло, несмотря на применение обычных при МВ мероприятий по предотвращению перекрестной инфекции.

Таким образом, необходима постоянная настороженность специалистов, а своевременная идентификация возбудителей инфекции будет способствовать обеспечению своевременного начала адекватного лечения, надлежащего мониторинга и профилактики распространения НТМБ среди больных МВ.

6.2 Диагностический материал.

Для исследований на наличие НТМБ не рекомендуется:

- использование трансбронхиальной биопсии (ТББ) как рутинной медицинской практики для обнаружения НТМБ у пациентов с МВ, если есть основания подозревать у них микобактериоз;
- взятие орофарингеальных мазков на посев культур для диагностики и скрининга микобактериоза у пациентов с МВ [163].

В	Для проверки подозрений, что пациент с МВ заражен микобактериями, в качестве диагностического материала используют мокроту или индуцированную мокроту, смывы бронхов или образцы БАЛ, для приготовления препаратов для микроскопии и микробиологических посевов для получения культур.
----------	---

У пациентов, выделяющих мокроту в достаточном количестве, для исследования собирают ее утреннюю порцию. Качественным материалом можно считать мокроту, имеющую слизистый или слизисто-гнойный характер, а также содержащую плотные белесоватые включения. Желтоватый, серый или бурый цвет мокроты позволяет предположить диагностическую ценность материала.

Достаточный объем исследуемой порции мокроты составляет 3 - 5 мл, однако допустимо исследование и меньших по объему порций. Некоторые больные выделяют микобактерии нерегулярно, поэтому в целях повышения информативности практикуется повторное (до 3 раз) исследование мокроты. Такая тактика позволяет повысить число положительных находок.

При сборе мокроты необходимо иметь в виду, что в момент ее откашливания создается высокий риск воздушно-капельного распространения инфекции. В связи с этим желательно, чтобы сбор мокроты производился в специально выделенном для этих целей отдельном, хорошо вентилируемом помещении, оснащенном бактерицидной лампой и средствами дезинфекции, или на открытом воздухе.

6.3 Сбор мокроты

Сбор мокроты должен производиться в присутствии и при непосредственном участии медицинского работника. Лицам, ответственным за сбор мокроты, необходимо

руководствоваться следующими правилами:

- лицам, ответственным за сбор мокроты, следует объяснить пациенту причины исследования и необходимость откашливать не слюну или носоглоточную слизь, а содержимое глубоких отделов дыхательных путей, что достигается в результате продуктивного кашля, возникающего после нескольких глубоких вдохов;
- необходимо предупредить пациента, что он должен предварительно почистить зубы и прополоскать полость рта кипяченой водой, что позволяет механически удалить основную часть вегетирующей в ротовой полости микрофлоры и остатки пищи, загрязняющие мокроту и затрудняющие ее обработку;
- участвующий в сборе мокроты медицинский работник использует средства индивидуальной защиты, выбирает свое положение таким образом, чтобы направление движения воздуха было от него к пациенту;
- стоя позади пациента, следует рекомендовать ему держать флакон как можно ближе к губам и сразу же сплевывать в него мокроту по мере ее откашливания. Выделение мокроты усиливается после одного или нескольких глубоких вдохов;
- по завершении сбора мокроты медицинский работник должен закрыть флакон крышкой, промаркировать и поместить в контейнер для транспортировки в лабораторию.

Важно! Направление на исследование не должно соприкасаться с контейнером, содержащим мокроту. Полностью заполненное направление помещают в отдельный пакет и транспортируют отдельно от контейнера с мокротой.

6.4 Методы микроскопии для выявления микобактерий в диагностическом материале

Диагностическая чувствительность метода микроскопии для выявления микобактерий обычно составляет не более 50% от всех больных, однако для наиболее инфекционно-опасных больных, у которых бактериовыделение подтверждено культуральным методом, диагностическая чувствительность метода микроскопии может достигать 90%.

Методы микроскопии не позволяют дифференцировать МБТК от НТМБ и дают возможность выявлять кислотоустойчивые микроорганизмы (КУМ) только при наличии, по крайней мере, 5000-10000 бактериальных клеток в 1 мл мокроты.

В настоящее время методы микроскопии, обладающие относительно невысокой чувствительностью, сохраняют, тем не менее, свою актуальность, так как позволяют быстро выявлять наиболее эпидемически значимых больных туберкулезом и микобактериозом и оценивать массивность бактериовыделения.

Методы микроскопии в обязательном порядке включаются во все схемы обследования пациентов в связи с необходимостью определения статуса

бактериовыделения согласно классификатору заболеваний и дальнейшему диспансерному наблюдению пациента или при необходимости его целевой госпитализации в специализированное отделение [162].

В	Методы микроскопии настоятельно рекомендуется включать в алгоритм микробиологической диагностики микобактериальных инфекций.
----------	---

6.4.1 Микроскопия с окраской по Цилю-Нильсену

Световая микроскопия препаратов с окраской по Цилю-Нильсену (Ц-Н), приготовленных из образцов мокроты или других диагностических материалов, доступна для микробиологических лабораторий. Кроме того, специализированные лаборатории при получении роста культуры микроорганизмов на плотной и/или жидкой питательных средах используют метод окраски по Ц-Н для идентификации выросших микроорганизмов при отсутствии возможности использования современных молекулярных методов.

6.4.2 Методы люминесцентной микроскопии

В бактериологических лабораториях медицинских организаций фтизиатрического профиля РФ в качестве основного метода микроскопического исследования рекомендуется применять методы люминесцентной микроскопии, где в качестве источника излучения может использоваться ртутная лампа или светодиодный излучатель (LED микроскопия).

6.5 Культуральные методы диагностики микобактериальных инфекций

6.5.1 Питательные среды

А	Выделение культуры микробактерий МБТК и/или НТМБ осуществляется исключительно в специализированных лабораториях фтизиатрической службы.
----------	--

А	Посевы на жидкую питательную среду Миддлбрук 7Н9 (в автоматической системе учета роста BACTEC MGIT 960\320) предпочтительны для тестов на наличие микобактерий для диагностического материала от больных с МВ. Посевы на плотные питательные среды: Левенштейна-Йенсена, Финн-П используются как резервные диагностические среды.
----------	--

Техника посева биологического материала на питательные среды предусматривает использование специальных ручных микробиологических методик.

- посев на питательную среду позволяет получить максимальный рост присутствующей в образце культуры микобактерий;
- посевы для выявления роста микобактерий осуществляются исключительно после предпосевной обработки диагностического материала (деконтаминации и разжижения). Это объясняется тем, что рост микобактерий происходит очень медленно (в течение 3-10 недель), генерация микобактериальной клетки составляет от 18 до 24 часов, а большинство проб диагностического материала загрязнены быстрорастущими микроорганизмами. Их бурный рост на богатых питательных средах мешает развитию микобактерий и затрудняет их выделение (осуществляется исключительно в специализированных лабораториях фтизиатрической службы);
- посевы осуществляют как минимум на две плотные питательные среды – Левинштейна-Йенсена и Финн-П;
- в случае проведения исследований в автоматическом анализаторе BACTEC MGIT 960\320 посев осуществляют в пробирку с жидкой питательной средой Миддлбрук 7H9 (которую помещают в анализатор) и на пробирку с плотной питательной средой Левинштейна-Йенсена;
- посевы инкубируют при температуре 37°С;
- посевы на плотных питательных средах просматривают еженедельно в течение 10-и недель;
- анализатор BACTEC MGIT 960\320 осуществляет скрининг роста один раз в час в течение 42-х дней.

В

Достоверная клиническая интерпретация результатов микробиологического обследования на наличие микобактерий (МБТК и\или НТМБ) достигается при обязательном соблюдении следующего правила: микроскопическое, культуральное и молекулярно-генетическое исследования должны производиться параллельно только из одной и той же пробы диагностического материала.

Комментарии:

- При предпосевной обработке для сохранения достаточной части микобактериальной популяции (МБТК и\или НТМБ) наиболее предпочтительным является деконтаминация и разжижение материала NALC-NaOH (N-ацетил-L-цистеин-гидроксид натрия).
- Культуральные методы диагностики являются основными методами выделения микобактерий МБТК и\или НТМБ. Диагностическая чувствительность культурального метода достигает 70-80% среди больных с микобактериальным поражением легких.

Культуральный метод позволяет выделить культуру возбудителя, необходимую для определения его видовой принадлежности и определения спектра лекарственной чувствительности.

- Медленный рост МБТК требует значительного времени ожидания результатов исследования. В среднем, при посеве диагностического материала от больных для получения результатов на плотных средах требуется 21-36 дней (до получения отрицательного результата - 12 недель), на жидких средах - 12-22 дня (42-46 дней до получения отрицательного результата). Методы культивирования на жидкой и/или плотной питательных средах могут осуществляться исключительно в специализированных лабораториях фтизиатрической службы.

- Важно, что при оценке результатов культурального исследования появление роста кислотоустойчивых микроорганизмов в течение 7-10 дней на плотных средах может свидетельствовать либо о выделении быстрорастущих НТМБ, либо о массивном обсеменении материала микобактериями. Появление роста кислотоустойчивых микроорганизмов после 3-4 недель культивирования свидетельствует о выделении МБТК, а также других медленно растущих микобактерий, которые могут относиться к патогенным нетуберкулезным микобактериям.

В	Метод культивирования на плотной питательной среде остаётся востребованным и рекомендуется к использованию в лабораторной практике в комплексе с другими методами исследования
----------	---

Комментарии:

- Культивирование на жидкой среде повышает выявление микобактерий МБТК и/или НТМБ примерно на 10% по сравнению с плотными средами. В настоящее время широко используются системы с автоматической детекцией роста микобактерий, которые позволяют значительно ускорить получение результата.
- Преимущества автоматизированной системы культивирования BACTEC MGIT 960/320 перед культуральными исследованиями на плотных питательных средах обеспечиваются высокой эффективностью стандартизованных и сертифицированных по ISO9001 производств реагентов и сред, а также поддержанием стандартных протоколов исследований.

В	Посев на жидкие питательные среды настоятельно рекомендуется при проведении диагностических исследований, для обследования больных с МВ.
----------	---

- Для подтверждения наличия либо отсутствия контаминации посевов посторонней флорой при культивировании на жидкой/плотной питательной среде проводят посев

культур на чаши Петри с кровяным агаром. Наличие роста культуры через 24-72 часа инкубации при +37°C свидетельствует о контаминации материала посторонней микрофлорой.

6.5.2 Идентификация микобактерий

В	Видовая идентификация выделенной культуры микобактерий возможна с помощью комплекса современных молекулярных методов и позволяет сразу же дифференцировать МБТК от НТМБ и неспецифической микрофлоры.
----------	--

Комментарии:

- *Идентификация микобактерий по культуральным свойствам - при посеве на плотные питательные среды на основании скорости роста бактерий, морфологии и окраски колоний можно сделать предварительное заключение о принадлежности культуры либо к комплексу МБТК, либо к НТМБ.*
- *Идентификация микобактерий с помощью биохимических тестов - дифференциация МБТК и НТМБ основана на их культуральных свойствах и способности роста на дифференциально-диагностических средах. Наиболее часто применяют: тест на наличие роста на среде, содержащей 1000 мкг/мл натрия салициловокислого; рост на среде с 2 мкг/мл гидразида тиофен-2 карбоксиловой кислоты (ТСН); рост на среде с 500 мкг/мл паранитробензойной кислоты; рост на среде с 5% хлорида натрия.*
- *Идентификация микобактерий молекулярными методами - молекулярные методы дифференциации МБТК от НТМБ основаны на выявлении видоспецифических структур в геноме или белковом спектре возбудителя.*

Ряд методов направлен только на то, чтобы дифференцировать МБТК от НТМБ.

Тест-системы, основанные на амплификации видоспецифических фрагментов ДНК, предназначены для точной видовой идентификации возбудителя, как в диагностическом материале, так и в культурах микобактерий.

К методам, дифференцирующим МБТК от НТМБ, относится:

- полимеразная цепная реакция (ПЦР), выявляющая вставочную последовательность ДНК IS6110, присутствующую только у МБТК;
- иммунохроматографический тест, выявляющий антиген микобактерий туберкулеза МРТ64;

Видовая идентификация:

- В рутинной практике для видовой идентификации культур микобактерий используют гибридизационный метод на ДНК-стрипах, позволяющий определять видовую принадлежность 31 наиболее клинически значимых видов НТМБ.

- Методики позволяют идентифицировать следующие виды НТМБ: *M. avium* ssp., *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. xenopi* и *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastri*, *M. asiaticum* и *M. shimoidei*. Этими методами можно исследовать культуры с плотной и жидкой питательных сред, и получить результат в течение нескольких часов.
- Идентификация МБ до вида может проводиться также с помощью секвенирования, MALDI-ToF масс-спектрометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), тонкослойной хроматографии, результаты которых основаны на выявлении уникальных для каждого вида микобактерий структур.

В	Методики точной видовой идентификации НТМБ могут быть рекомендованы для хорошо оснащенных бактериологических лабораторий фтизиатрической службы с подготовленным персоналом.
----------	---

Необходимость идентификации продиктована как увеличением частоты большого числа сочетанных заболеваний, в том числе микобактериоз-МВ.

С	Методы идентификации, основанные на молекулярно-биологических тестах (ПЦР и иммунохроматографический), имеют преимущество в специфичности и скорости анализа по сравнению с культуральными и биохимическими методами.
----------	--

В	Следует помнить, что, подтверждение принадлежности выделенной культуры микобактерий к МБТК и/или НТМБ на основании специальных лабораторных тестов, является обязательным.
----------	---

6.5.3 Лекарственная чувствительность микобактерий и методы ее определения.

В	Повышение эффективности лечения может быть достигнуто вследствие назначения индивидуальной схемы терапии, основанной на определении лекарственной чувствительности возбудителя.
----------	--

Для определения лекарственной чувствительности МТБК

Молекулярно-генетические методы определения ЛУ

Генотипические методы определения ЛУ МБТК основаны на выявлении

специфических мутаций, связанных с резистентностью к определенным ПТП.

Основным достоинством МГМ является быстрое и достоверное выявление у больных возбудителя с МЛУ МБТК, так как они позволяют выявить ЛУ МБТК к рифампицину и изониазиду, а также к важнейшим препаратам второго ряда, позволяя использовать разделение потоков больных и включать в режим лечения наиболее эффективные препараты.

Использование МГМ для определения ЛУ является первоначальным этапом обследования больных и не исключает необходимость применения традиционных культуральных методов определения ЛЧ возбудителя, т.к. молекулярно-генетические тест-системы определения ЛУ в настоящее время разработаны не для всех ПТП. Диагностическая чувствительность их в некоторых случаях (для определения ЛУ к этамбутолу, аминогликозидам и циклическим пептидам) недостаточная для назначения корректного режима лечения.

Молекулярно-генетические тест-системы на определение ЛУ представлены тремя основными технологиями:

- 1) мультиплексная ПЦР в режиме реального времени;
- 2) «картриджная» технология (по сути является мультиплексной ПЦР в режиме реального времени, но выделение ДНК и амплификация идут автоматически в специальном картридже).
- 3) гибридизационные технологии, основанные на гибридизации продуктов ПЦР со специфическими олигонуклеотидами, иммобилизованными на матрице, которая может представлять собой биологический микрочип, или ДНК-стрип;

D	ПЦР в режиме реального времени является наиболее перспективным методом, т.к. в течение одного дня позволяет детектировать устойчивость МБТ к рифампицину, изониазиду и фторхинолонам из диагностического материала
----------	---

6.5.4 Микробиологические методы определения ЛЧ

Согласно международным рекомендациям ВОЗ для определения лекарственной чувствительности МБТК в качестве основных используют фенотипические методы, т.е. культивирование МБТК в присутствии противотуберкулезных препаратов: на среде Левенштейна-Йенсена или на жидкой питательной среде в автоматической системе ВАСТЕС. В таблице 10 представлены методы определения лекарственной чувствительности и критические концентрации противотуберкулезных препаратов.

Таблица 10.

Методы определения лекарственной чувствительности и критические концентрации противотуберкулезных препаратов

Группа препаратов	Противотуберкулезный препарат	Среда для определения ЛЧ	Критические концентрации (мкг/мл) для определения ЛЧ в зависимости от используемого метода и питательной среды		
			Среда Левенштейна–Йенсена (метод абсолютных концентраций)	Среда Левенштейна–Йенсена (метод пропорций)	Система ВАС ТЕС MGIT 960/320
Группа 1 (пероральные противотуберкулезные препараты первой линии)	изониазид	плотная, жидкая	1	0,2	0,1
	рифампицин	плотная, жидкая	40	40,0	1,0
	этамбутол	плотная, жидкая	2	2,0	5,0
	пиразинамид	жидкая	--	--	100,0
Группа 2 (инъекционные противотуберкулезные препараты)	стрептомицин	плотная, жидкая	10	4,0	1,0
	канамицин	плотная, жидкая	30	30,0	2,5 ¹³⁻¹⁴
	амикацин	плотная, жидкая	--	30,0 ⁴	1,0
	капреомицин	плотная, жидкая	30	40,0	2,5
Группа 3 (фторхинолоны)	офлоксацин	плотная, жидкая	2	4,0 ⁴	2,0
	левофлоксацин	плотная, жидкая	--	--	1,5 ¹³⁻¹⁴
	моксифлоксацин	плотная, жидкая	--	--	0,5/2,0 ¹³⁻¹⁴
Группа 4 (пероральные бактериостатические противотуберкулезные препараты второго ряда)	этионамид	плотная, жидкая	30	40,0	5,0
	протионамид	плотная, жидкая	30	40,0	2,5
	циклосерин	плотная	30	30,0 ⁴	--
	<i>P</i> -аминосалициловая кислота	плотная, жидкая	1	1,0	4,0 ¹³⁻¹⁴

Группа 5 (противотуберкулезные препараты с неясной эффективностью, не рекомендованные ВОЗ для рутинного использования при лечении больных с МЛУ-ТБ)	клоfazимин	жидкая	--	--	--
	амоксациллин/ клавуланат	отсутствует	--	--	--
	кларитромицин	отсутствует	--	--	--
	линезолид	жидкая	--	--	1,0

Для определения лекарственной чувствительности НТМБ

Для медленнорастущих и быстрорастущих НТМБ ЛЧ определяется к разному спектру препаратов. В таблице 11 представлен список антибактериальных препаратов для тестов лекарственной чувствительности нетуберкулезных микобактерий.

Таблица 11.

Список антибактериальных препаратов для тестов лекарственной чувствительности нетуберкулезных микобактерий

Для медленнорастущих микобактерий		Для быстрорастущих микобактерий	
Препарат	Диапазон разведений мкг/мл	Препарат	Диапазон разведений мкг/мл
Amikacin	1-64	Amikacin	1-64
Amoxicillin/Clavulanic Acid	2/1-64/32	Ciprofloxacin	0,12-16
Cefepime	1-32	Clarithromycin	0,06-64
Cefoxitin	4-128	Doxycycline	0,12-16
Ceftriaxone	4-64	Ethambutol	0,5-16
Ciprofloxacin	0,12-4	Ethionamide	0,3-20
Clarithromycin	0,06-16	Isoniazid	0,25-8
Doxycycline	0,12-16	Linezolid	1-64
Imipenem	2-64	Moxifloxacin	0,12-8
Linezolid	1-32	Rifabutin	0,25-8
Minocycline	1-8	Rifampin	0,12-8
Moxifloxacin	0,25-8	Streptomycin	0,5-64
Tigecycline	0,015-4	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	0,12/2,38-8/152
Tobramycin	1-16	Amikacin	1-64
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	0,25/4,75-8/152	Ciprofloxacin	0,12-16
		Clarithromycin	0,06-64

Определение лекарственной чувствительности штаммов медленнорастущих и быстрорастущих НТМБ проводят с использованием панели двукратных разведений

антибактериальных препаратов. Для определения ЛЧ НТМБ рекомендуется использовать метод на основе определения минимальных ингибирующих концентраций препаратов. Метод основан на культивировании выделенной культуры НТМБ в 96-луночной планшете в жидкой питательной среде, содержащей разные концентрации антибиотиков широкого спектра действия, а также противотуберкулезных препаратов.

В	Критические концентрации ПТП для определения ЛЧ НТМБ не разработаны и не утверждены ВОЗ. Для выбора препаратов для лечения микобактериоза проводят определение минимальных подавляющих концентраций на жидких питательных средах в планшетном формате и соотносят их с фармакокинетикой препарата.
---	---

6.5.5 Этапы микробиологического и молекулярно-генетического обследования с целью диагностики и контроля химиотерапии заболеваний вызванных МБТК или НТМБ:

1. Выявление возбудителя туберкулеза в диагностическом материале, собранном до начала химиотерапии:

Используют все доступные методы, обеспечивающие возможно быстрое получение результатов с наибольшей достоверностью:

- люминесцентная/LED-микроскопия,
- молекулярно-генетические методы,
- культуральные исследования с посевом на жидкие и плотные питательные среды.

По результатам экспресс - исследований определяют статус больного, форму помощи и направляют его в соответствующее отделение.

2. Скрининг ЛЧ МБТК — максимально быстрое выявление генетических маркеров устойчивости к препаратам, определяющим стартовые режимы лечения (рифампицин, изониазид, фторхинолоны и др. ПТП) для назначения адекватного режима лечения и перевода пациента в соответствующее отделение.

3. Полная характеристика выделенной культуры для подтверждения результатов скрининговых исследований и обоснования назначения индивидуализированной схемы лечения согласно ЛЧ МБТК или НТМБ.

На данном этапе используют один или несколько из общепринятых культуральных методов определения ЛЧ МБТК (в зависимости от спектра и характера устойчивости), а также проводят дифференциацию и более полную идентификацию выделенных культур иммунохроматографическими, молекулярно-генетическими, биохимическими и другими методами.

4. Исследования, проводимые с целью обоснования и контроля химиотерапии.

6.5.6 Лабораторный отчет для МБТК или НТМБ

Для лабораторного отчета по выявлению или отсутствию в диагностическом материале применимы следующие виды ответов:

Результат микроскопии - Однозначный, количественный

Варианты ответов:

- Отрицательный;
- КУМ – кислотоустойчивые микроорганизмы (+1;+2;+3).

Результат культурального посева на плотные питательные среды

- С обязательным количественным выражением: единичные колонии; 1+; 2+; 3+;
- Выявлен **рост неспецифической флоры**;
- Положительный:
 - Выявлен рост *M.tuberculosis* complex
 - Выявлен рост нетуберкулезных микобактерий
 - Отрицательный

Результат культурального посева на жидкие питательные среды

- Выявлен **рост неспецифической флоры**
- Положительный -
 - Выявлен рост *M. tuberculosis* complex
 - Выявлен рост нетуберкулезных микобактерий
 - Массивность бактериовыделения условно можно установить по дате получения положительного роста (количественные критерии не применимы)
 - Отрицательный

Результат методом ПЦР в режиме реального времени

- ДНК микобактерий туберкулезного комплекса - **не обнаружена**
- ДНК микобактерий туберкулезного комплекса – **обнаружена**

Результат по видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий

- Указание метода исследования
- Указание вида микобактерий

Результаты определения чувствительности микобактерий к противотуберкулезным препаратам:

- Для *M. tuberculosis* complex –по критическим концентрациям
- Для нетуберкулезных микобактерий – по минимальным подавляющим концентрациям (МИК)

6.5.7 Меры биологической безопасности при работе с микобактериями

Меры контроля биологической безопасности внутрилабораторной среды при работе с материалом, потенциально инфицированным микобактериями, включают обеззараживание поверхностей в помещениях, оборудования, аппаратуры и других объектов в лаборатории с помощью химической дезинфекции и технических устройств.

Основные правила проведения данных мероприятий сводятся к следующему:

- В лаборатории используют дезинфицирующие средства с учетом их туберкулоцидной активности.
- Все поверхности, лабораторное оборудование и другие объекты в «заразной» зоне лаборатории должны рассматриваться как потенциально инфицированные;
- Слив необеззараженных жидкостей в канализационную сеть запрещается.
- Отработанные материалы, лабораторную посуду, твердые отходы и пр. из «заразной» зоны помещают в дезинфекционное средство, обеззараживание пробирок, расходного материала, перчаток, наконечников, проводят в боксе биологической безопасности 2 класса. Отходы собирают в пластиковые закрывающиеся емкости и специальные упаковочные мешки, после чего выносят для последующего автоклавирования под давлением 2,0 кгс/кв. см (0,2 МПа) при температуре 132 ± 2 °C в течение 60 мин.
- После автоклавирования пакет с инаktivированным материалом выносят в специализированный контейнер для мусора с последующим вывозом на сжигание в специальных печах. При работе с микроорганизмами III - IV групп патогенности обработку рабочей одежды осуществляют в соответствии с СП 1.3.2322-08.
- Руки следует мыть специальным бактерицидным мылом или обработать кожным антисептиком сразу после работы с потенциально инфицированной лабораторной посудой, после всех микробиологических процедур, снятия защитной одежды, а также перед тем, как покинуть помещение лаборатории. Для вытирания рук после мытья следует пользоваться одноразовыми бумажными полотенцами.

7. Постаналитический этап микробиологического исследования

Постаналитический этап лабораторного исследования можно разделить на внутрилабораторную и внелабораторную части. Внутрилабораторная часть постаналитического этапа включает проверку квалифицированным врачом-бактериологом результата исследования на предмет его достоверности и оформление бланка с результатом исследования. Внутрилабораторная часть заканчивается авторизацией бланка

отчета, а в ряде случаев и формулировкой микробиологического заключения и передачей его клиницисту.

Внелабораторная часть постаналитического этапа — помощь клиницисту в интерпретации результатов микробиологических исследований, которая осуществляется специалистами лаборатории.

7.1 Рассмотрение результатов микробиологического исследования

Лаборатория должна иметь разработанный порядок рассмотрения результатов микробиологических исследований перед их выдачей. Оценка результатов должна проводиться в сравнении с внутрилабораторным контролем качества и, если возможно, с доступной клинической информацией и результатами предшествующих исследований [164].

7.2 Хранение и утилизация клинических образцов

Лаборатория должна определить продолжительность срока сохранения доставленных на микробиологическое исследование образцов.

D	• Все респираторные образцы рекомендуется хранить при температуре 4⁰С в течение 10 -14 дней проведения микробиологического исследования. - Все «положительные» чашки с посевами рекомендуется хранить в течение 3-5 дней при комнатной температуре после того, как исследование было уже завершено.
----------	--

Комментарий: Безопасная утилизация проб должна производиться в соответствии с местными правилами и требованиями по обращению с отходами класса Б.

7.3 Отчеты о результатах

7.3.1 Общие положения

Отчет о результатах каждого микробиологического исследования должен быть точным, ясным, недвусмысленным и соответствовать специфическим инструкциям методики исследования.

Лаборатория должна определить формат и среду отчета (например, электронную или бумажную) и способ, которым он будет передаваться из лаборатории.

В отчете должна содержаться информация для интерпретации результатов микробиологического исследования.

7.3.2 Содержание отчета

В лабораторном отчете должна содержаться информация, которая касается ненадлежащего качества доставленных образцов:

- замечания о качестве пробы, которые могут компрометировать результаты исследования;
- замечания относительно пригодности пробы в отношении критериев приема или отказа респираторных образцов.

Отчет о микробиологическом исследовании должен содержать:

- ясное, недвусмысленное указание на проведенное исследование;
- наименование лаборатории, которая представляет отчет;
- однозначную идентификацию пациента;
- дату и время взятия первичной пробы, если эти данные известны и существенны для оказания помощи пациенту;
- тип первичного образца;
- результаты исследования, выраженные в единицах СИ или в единицах, сопоставимых с единицами СИ, или в других приемлемых единицах;
- иные комментарии, предостережения или пояснения: сообщения в виде экспертных правил и заключений;
- идентификацию лица (лиц), проводящего исследование и уполномоченного выдавать отчеты;
- дату и время выдачи отчета.

7.4 Выдача результатов микробиологического исследования

7.4.1 Общие положения

В лаборатории должна быть разработана документированная процедура выдачи результатов исследований, включающая указания о том, кто может выдавать результаты и кому.

1. Процедура должна обеспечивать соблюдение следующих условий:

- в случае, когда полученная первичная проба непригодна или может привести к неверному результату;
- в случае, когда результаты исследования оказались в интервалах «тревожный» - первый высев *P. aeruginosa*, выделение в образцах нижних дыхательных путей мукоидных штаммов *P. aeruginosa*, первичное выделение MRSA, выделение бактерий группы *B. ceracia complex*:

- немедленно извещается врач (или другой уполномоченный медицинский работник);
- ведутся записи о предпринятых действиях, дате документа, времени, ответственном сотруднике лаборатории, лице, которому передано сообщение, переданных результатах

исследования и любых затруднениях, перечисленных в уведомлении.

2. Результаты должны быть понятно написаны и сообщены лицу, уполномоченному получать и использовать полученную информацию.
3. В случае, когда результаты переданы в порядке промежуточного отчета, должен быть направлен и окончательный отчет.
4. В случае необходимости в лаборатории должен быть разработан порядок передачи результатов исследования по телефону. Результаты, переданные устно, должны затем быть переданы в письменной форме. Должна проводиться регистрация всех отчетов, переданных в устной форме.

7.4.2 Сообщение о выделенных микроорганизмах

- Если на питательных средах рост микрофлоры не наблюдался за все время наблюдения, рекомендуется сообщать об отсутствии роста микрофлоры в доставленном образце;
- при обнаружении в респираторном образце только нормальной микрофлоры верхних дыхательных путей рекомендуется перечислять все выделенные микроорганизмы с комментарием об их принадлежности к нормальной микрофлоре верхних дыхательных путей без проведения определения чувствительности к антимикробным препаратам;
- рекомендуется сообщать обо всех выделенных из респираторных образцов этиологически значимых микроорганизмах в любых количествах (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia complex*, микромицеты);
- рекомендуется сообщать обо всех потенциально значимых микроорганизмах, выделенных из мокроты и из глубоких мазков с задней стенки глотки при выделении в количестве $> 10^3$ КОЕ/мл;
- поскольку все больше и больше различных родов бактерий выделяется из нижних дыхательных путей больных МВ, микробиологам рекомендуется быть готовыми объяснять значение выделения новых таксонов (*R. pickettii*, *Pandora* spp., *Cupriavidus respiraculi*, *Inquilinus limosus* и др.);
- для НГОВ, устойчивых к колистину, при невозможности идентифицировать выделенный микроорганизм, рекомендуется сообщить результат с формулировкой «вероятный микроорганизм XXX», где XXX наиболее вероятный из Приложения Б7 «Алгоритмы микробиологической диагностики *Burkholderia cepacia complex*». Рекомендуется добавить примечание: «Выделенный штамм XXX отправлен для молекулярной идентификации»;

- при невозможности отправить культуру для идентификации молекулярными методами рекомендуется сообщить о выделенном микроорганизме: «Выделена неидентифицированная грамотрицательная неферментирующая палочка, устойчивая к колистину»;
- при невозможности идентифицировать полученные культуры микромицетов (за исключением грибов рода *Candida*) рекомендуется направлять их в специализированную микологическую лабораторию. (Выделенные культуры микромицетов до отправки следует хранить в холодильнике при температуре 4°C с ежемесячным пересевом для поддержания жизнеспособности культуры. Перед отправкой следует пересеять культуру в стерильную пластиковую пробирку с завинчивающейся крышкой на скошенный агар Сабуро).

7.4.3 Сообщение о чувствительности выделенных микроорганизмов

- При интерпретации результатов определения чувствительности микроорганизмов рекомендуется указывать стандарт и год издания, по которому проводилось исследование (Клинические Рекомендации, EUCAST, CLSI);
- рекомендуется указывать степень чувствительности или устойчивости в общепринятых обозначениях: Ч, УР, Р (Ч – чувствительный, УР – умеренно резистентный, Р – резистентный) или в международных обозначениях S I R (S – чувствительный, I – умеренно устойчивый, R – устойчивый), а при определении МПК – значения МПК в мг/л с интерпретацией в степень чувствительности (Ч УР Р или S I R) [101].

7.5. Интерпретация результатов микробиологического исследования

Интерпретация результатов микробиологического исследования отделяемого нижних дыхательных путей при хронической респираторной инфекции у пациентов с МВ представляет собой определенные трудности:

- Результаты исследования мазков из глубоких отделов задней стенки глотки имеют разную ценность по сравнению с результатами исследования мокроты. Так, у детей младшего возраста отсутствие *P.aeruginosa* и других НГОВ в мазках из зева, взятых тампоном, не означает, что они не присутствуют в нижних дыхательных путях [166].

В таблице 12 представлены основные патогены, которые имеют этиологическое значение при хронических респираторных инфекциях у пациентов с МВ.

Основные микроорганизмы, имеющие этиологическое значение при МВ.

Микроорганизм	Компонент микробиоты верхних дыхательных путей и ротовой полости	Этиологическое значение в зависимости от количества
<i>S. aureus</i>	НД	При любом количестве
<i>P. aeruginosa</i>	НП	При любом количестве
<i>B. cepacia complex</i>	НП	При любом количестве
<i>Achromobacter</i> spp.	НД	При доминировании в микробиоте верхних дыхательных путей и ротовой полости.
Другие НГОБ	НД	При доминировании в микробиоте верхних дыхательных путей и ротовой полости.
<i>Aspergillus</i> spp.	НП	При любом количестве
<i>Enterobacterales</i>	НД	При доминировании в микробиоте верхних дыхательных путей и ротовой полости.
<i>H. influenzae</i>	НД	При доминировании в микробиоте верхних дыхательных путей и ротовой полости.
<i>S. pneumoniae</i>	НД	При доминировании в микробиоте верхних дыхательных путей и ротовой полости.
Нетуберкулезные микобактерии	НП	При любом количестве

Примечание:

НП- не присутствуют в микробиоте верхних дыхательных путей и ротовой полости;

НД – не являются доминирующими в микробиоте верхних дыхательных путей и ротовой полости.

- Отсутствие ведущих патогенов в мокроте и в глубоких мазках с задней стенки глотки является благоприятным предиктором их отсутствия в нижних отделах дыхательных путей.
- Выделение *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *B. cepacia complex* из респираторных образцов больных МВ независимо от количества рекомендуется всегда считать клинически значимым:

1. Микроорганизмы, выделенные из мокроты у пациентов с МВ, хорошо коррелируют с наличием этих микроорганизмов в нижних дыхательных путях [167,168];

2. Выделение любого из трех ведущих возбудителей (*S. aureus*, *P.aeruginosa* и *B. ceracia complex*) из глубоких мазков с задней стенки глотки рекомендуется сообщать как клинически значимое;

3. О других микроорганизмах из глубоких мазков с задней стенки глотки (таблица 12) настоятельно не рекомендуется сообщать, поскольку они могут считаться частью микробиоты верхних дыхательных путей и ротоглотки [167,168].

- Выделение *B. ceracia complex* должно расцениваться как опасное для больных МВ, так как пациенты с микроорганизмами этой группы должны рассматриваться отдельно от группы с *B. ceracia*-отрицательными пациентами с МВ, как с медицинской, так и с социальной точки зрения. Точная идентификация этого комплекса бактерий очень важна для пациентов с МВ, особенно в свете того факта, что нет точных доказательств, что микроорганизмы, с которыми наиболее часто путают *B. ceracia*: *B. gladioli*, *R. pickettii*, *Pandoreae* spp.- играют значительную роль в течении хронической респираторной инфекции при МВ [63,169,170].
- Наличие *Aspergillus* spp. в респираторном биосубстрате может являться одним из критериев диагноза АБЛА, ХАЛ или ИА, их клиническую значимость следует оценивать в зависимости от клинической картины заболевания.
- Другие выделенные микроорганизмы, перечисленные в таблице 12, обычно связывают с обострением хронической респираторной инфекции при МВ и их клиническую значимость рекомендуется оценивать в зависимости от выделенного количества.
- Интерпретировать клиническую значимость *H. influenzae*, *Achromobacter* spp, *S.maltophilia*, *S. pneumoniae*, *Enterobacterales* рекомендуется в зависимости от клинической картины и количества выделенных микроорганизмов.

8.Антимикробная терапия

8.1 Антибактериальная терапия

Больные МВ представляют собой одну из самых тяжелых категорий пульмонологических больных, и корректная антибактериальная терапия респираторной инфекции при МВ определяет прогноз заболевания [2,171,172]. В настоящее время показано, что продолжительность жизни у больных МВ зависит от этиологии хронической легочной инфекции [173,174,175,176]. Адекватная АБТ может задержать развитие хронической инфекции нижних дыхательных путей, замедлить темп прогрессирования легочных расстройств. В настоящих Клинических рекомендациях описаны основные принципы антимикробной терапии и перечислены антимикробные препараты для лечения

хронической респираторной инфекции, вызванной *P. aeruginosa*, другими НГОВ, а также для лечения заболеваний, ассоциированных с *Aspergillus* spp. Подробные схемы антибактериальной терапии, способы применения и режимы дозирования представлены в Клинических рекомендациях (КР372) «Кистозный фиброз (муковисцидоз) у детей» 2016г. и в Национальном консенсусе «Муковисцидоз: определения, диагностические критерии, терапия» 2016г.

А	• Рекомендована антибактериальная терапия всем пациентам с легочными проявлениями МВ, у которых отмечается обострение МВ или выявляются возбудители респираторной инфекции в количестве более и равно 10^3-10^4 КОЕ/мл при плановом микробиологическом исследовании, а также при хроническом высеве <i>P.aeruginosa</i>. Уровень достоверности доказательства 1+ [12, 171,172,177,178,179,180].
----------	---

Комментарий: Выбор лекарственных средств определяется: видом возбудителя, выявленного у больного; чувствительностью возбудителя (*in vitro*) к данному АБП; фазой заболевания (обострения – ремиссия); продолжительностью инфекционного процесса (хроническая инфекция – впервые выявленный возбудитель).

Оценка эффективности лечения: клинически (симптомы инфекционного процесса – лихорадка, хрипы в легких, дыхательная недостаточность), по данным лабораторных методов обследования (лейкоцитоз, уровень С-реактивного белка) и по данным микробиологического исследования (эрадикация возбудителя, персистирование, суперинфекция, снижение выделения возбудителя $<10^3$ КОЕ/мл).

8.1.1 Антибактериальная терапия при выделении *P. aeruginosa*

В	• Рекомендуется одновременное назначение 2–3 противомикробных препаратов из разных групп, что предотвращает развитие устойчивости <i>P. aeruginosa</i> и способствует достижению максимального клинического эффекта. Наиболее часто применяют комбинации аминогликозидов с цефалоспоридами 3–4 поколения. Целесообразно периодически менять комбинации антибиотиков, эффективных в отношении синегнойной палочки. Следует помнить, что лабораторное определение чувствительности микроорганизма к антибиотикам не всегда полностью совпадает с клиническим ответом на проводимую терапию. Уровень достоверности доказательства 2++ [12, 171,172,177,178,179,180].
----------	---

8.1.2 Антибактериальная терапия при выделении *B. cerasia complex*

С	• При инфицировании <i>B. cerasia complex</i> рекомендуется немедленное терапевтическое вмешательство вследствие высокой вирулентности данного микроорганизма. Уровень достоверности доказательства 3 [2,12,181].
----------	--

Комментарий: Инфицирование *B. cerasia complex* достоверно ухудшает клиническое состояние больного и прогноз. Есть отдельные сообщения об успешной эрадикации некоторых изолятов *B. cerasia* с применением ранней агрессивной антибактериальной терапии до начала формирования хронической инфекции.

1. Наибольшую активность *in vitro* сохраняют цефтазидим, пиперациллин/тазобактам, меропенем, имипенем, ко-тримоксазол и тетрациклины.
2. Большинство микроорганизмов *B. cerasia complex* устойчивы к антипсевдомонадным антибиотикам, являются природно устойчивыми к колистину и аминогликозидам.

Об эрадикации *B. cerasia complex* можно судить только через год после последнего посева при условии, как минимум, трёх отрицательных бактериологических анализов мокроты. В отношении больных, выделяющих *B. cerasia complex*, проводится политика строжайшего инфекционного контроля и гигиенических мер [173].

8.1.3 Антибактериальная терапия при выделении *Achromobacter spp.*

Achromobacter spp. характеризуется полирезистентностью, способностью образовывать биопленки, что объясняет неудачи антибактериальной эрадикационной терапии микроорганизмов рода *Achromobacter* при хронической инфекции.

При высеве из бронхиального секрета *Achromobacter spp.* рекомендовано соблюдение следующих правил антимикробной терапии:

С	• При хронической инфекции рекомендуется использовать длительные ингаляции колистина, при отсутствии эффекта- ингаляции меропенема. Согласно международным рекомендациям, для лечения обострений, обусловленных <i>Achromobacter spp.</i>, рекомендуют использовать комбинацию двух антисинегнойных антибиотиков различных классов. Уровень достоверности доказательства 3 [2,12].
----------	--

Комментарий: роль *Achromobacter spp.* при МВ окончательно не определена, в связи с чем, чёткой стратегии относительно сроков и объёма лечения не разработано.

8.2 Лечение аспергиллеза

А	Выявление <i>Candida</i> spp. в БАЛ, мокроте и других респираторных субстратах не является признаком микоза легких и показанием для назначения противогрибковых ЛС.
В	При отсутствии клинических признаков микоза (АБЛА, ХАЛ или инвазивного аспергиллеза) без подтверждения данными компьютерной томографии и лабораторными показателями, выявление <i>Aspergillus</i> spp. в БАЛ, мокроте и других респираторных образцах рекомендуется расценивать как колонизацию дыхательных путей, которая не является показанием для назначения противогрибковых ЛС. Уровень достоверности доказательства 1+ [182].

8.2.1 Лечение аллергического бронхолегочного аспергиллеза

А	При аллергическом бронхолегочном аспергиллезе (АБЛА) проводят лечение противогрибковыми ЛС, иногда в сочетании с системными глюкокортикостероидами. Уровень достоверности доказательства 1+ [182,183].
----------	---

Препараты выбора:

- вориконазол (А);
- итраконазол (А).

8.2.2 Лечение хронического аспергиллеза легких

А	При ХАЛ рекомендуют проводить длительную (3-6 месяцев) антимикотическую терапию в сочетании с хирургическим лечением. Препараты выбора - вориконазол и итраконазол. Эхинокандины (анидулафунгин, каспофунгин, микафунгин) или липидный комплекс Амфотерицина В назначают редко, в случае тяжелого состояния пациента и/или неэффективности азолов. Уровень достоверности доказательства 1+ 183,184]
В	Позаконазол рекомендуется применять при непереносимости вориконазола или итраконазола. Уровень достоверности доказательства 1+ [183,184]

Препараты выбора:

- вориконазол, итраконазол (А);
- позаконазол (В).

8.2.3 Лечение инвазивного аспергиллеза

А	• При инвазивном аспергиллезе легких рекомендуется незамедлительная антимикотическая терапия в сочетании с устранением или снижением выраженности иммуносупрессии. Препарат выбора – вориконазол. • Применение амфотерицина В не рекомендовано в связи с высокой токсичностью. • В случае инвазивного аспергиллеза итраконазол для приема внутрь в связи с вариабельной биодоступностью применять не рекомендуется. Уровень достоверности доказательства 1+ 183,185,186]
---	---

Препарат выбора:

- вориконазол.
- Альтернативные препараты:
- каспофунгин (В);
- липидный комплекс амфотерицина В (В);
- микафунгин (С).

А	• Применение вориконазола разрешено с возраста 2 лет, позаконазола – 13 лет, итраконазола – 18 лет. При использовании триазольных ЛС рекомендуется учитывать межлекарственные взаимодействия. Для достижения эффекта и предупреждения нежелательных явлений показано определение концентрации триазольных ЛС в плазме крови.
---	--

9. Организация работы клинического микробиолога по микробиологической диагностике при МВ.

Бактериальные инфекции легких являются главными факторами, определяющими тяжесть течения и смертность пациентов с МВ [11]. Микробиология инфекций отличается от аналогичных инфекций у пациентов без МВ, а фенотипы бактерий нередко бывают атипичными. В связи с этим можно выделить основную проблему микробиологической диагностики: не всегда в микробиологических лабораториях выделяют и правильно идентифицируют бактерии или грибы, которые являются типичными патогенами при МВ (*B. cepacia complex*, *Achromobacter* spp., *Aspergillus* spp);

Сложность микробиологии МВ диктует необходимость специальных знаний по следующим вопросам:

- профилактика инфекций при муковисцидозе, включая предотвращение перекрестного инфицирования;
- антибактериальной терапии.

Эти и многие другие проблемы знакомы, как правило, тем микробиологическим лабораториям, которые проводят микробиологическую диагностику инфекций при МВ и имеют опыт работы с необычными патогенами.

Для проведения успешной микробиологической диагностики необходимо длительное сотрудничество между клиническими микробиологами и клиницистами [11].

Организация адекватной микробиологической диагностики инфекций дыхательного тракта может значительно повысить уровень и качество жизни больных в связи со своевременной и правильно проводимой микробиологической диагностикой.

С	При отсутствии в регионе микробиологической лаборатории, которая специализируется на проведении исследований пациентам с МВ, рекомендуется назначать не менее одного врача-бактериолога, ответственного за проведение микробиологических исследований при МВ в каждой лаборатории.
С	Всех новых пациентов с высевом или подозрением на высев <i>B. ceracia complex</i> рекомендуется в срочном порядке направлять к клиницистам.
С	О выделении новых штаммов MRSA рекомендуется в срочном порядке сообщать клиницистам.
С	В микробиологической лаборатории рекомендуется организовать систему своевременной идентификации <i>P. aeruginosa</i> для возможности организации оперативного начала эрадикационной терапии.
С	Микробиологам рекомендуется участвовать в регулярных междисциплинарных встречах для обсуждения отдельных пациентов, а также решения проблем диагностики и терапии.

10.Критерии оценки качества оказания медицинской помощи по группам заболеваний или состояний

Группа заболеваний или состояний:

кистозный фиброз (муковисцидоз)

Код/коды по МКБ-10: E84.0; E84.1; E84.8 E84.9

Формы оказания медицинской помощи:

- **экстренная** - медицинская помощь, оказываемая при внезапных острых заболеваниях, состояниях, обострении хронических заболеваний, представляющих угрозу жизни пациента;
- **неотложная** - медицинская помощь, оказываемая при внезапных острых заболеваниях, состояниях, обострении хронических заболеваний без явных признаков угрозы жизни пациента;
- **плановая** - медицинская помощь, которая оказывается при проведении профилактических мероприятий, при заболеваниях и состояниях, не сопровождающихся угрозой жизни пациента, не требующих экстренной и неотложной медицинской помощи, и отсрочка оказания которой на определенное время не повлечет за собой ухудшение состояния пациента, угрозу его жизни и здоровью.

Виды оказания медицинской помощи:

- **первичная** медико-санитарная помощь;
- **специализированная**, в том числе высокотехнологичная, медицинская помощь;
- **скорая**, в том числе скорая специализированная, медицинская помощь.

Условия оказания медицинской помощи:

- **амбулаторно** (в условиях, не предусматривающих круглосуточного медицинского наблюдения и лечения), в том числе на дому при вызове медицинского работника;
- **в дневном стационаре** (в условиях, предусматривающих медицинское наблюдение и лечение в дневное время, но не требующих круглосуточного медицинского наблюдения и лечения);
- **стационарно** (в условиях, обеспечивающих круглосуточное медицинское наблюдение и лечение).

1. Событийные (смысловые, содержательные, процессные) критерии качества:

- Подготовлено направление и собран биологический материал (мазок с задней стенки глотки, мокрота) для бактериологического исследования культуральным методом от пациентов при наличии признаков инфекционно-воспалительного процесса нижних дыхательных путей с целью установления этиологической значимости выделенных патогенов.

да ☐ или нет ☐

2. Временные критерии качества

- Биологический материал: мазок с задней стенки глотки, мокрота от пациентов при наличии признаков инфекционно-воспалительного процесса собран и направлен для бактериологического исследования культуральным методом в случае острой инфекции не позднее 24 часов с момента обращения пациента за медицинской помощью.

да ☐ или нет ☐

- Специфическая этиотропная антибактериальная терапия назначена (скорректирована) не позднее одного часа (при экстренной и неотложной помощи) и 24 часов (при плановой госпитализации) с момента сообщения о положительном результате культурального посева на наличие возбудителей инфекций и установлении антибиотикочувствительности выделенных возбудителей.

да ☐ или нет ☐

3. Результативные критерии качества

- Отсутствие отрицательной динамики в соматическом статусе пациента после начала приема (коррекции) специфической антимикробной терапии по результатам бактериологического исследования биологического материала из нижних дыхательных путей.

да ☐ или нет ☐

- Отсутствие отрицательной динамики в лабораторных показателях после начала приема (коррекции) специфической антимикробной терапии по результатам бактериологического исследования биологического материала из нижних дыхательных путей.

да ☐ или нет ☐

- Отсутствие возбудителя (возбудителей) в биологическом материале из нижних дыхательных путей против которых направлена специфическая антимикробная терапия или существенное снижение концентрации возбудителя (на 2-порядка) по результатам контрольного бактериологического исследования.

да ☐ или нет ☐

11. Контроль качества лабораторных исследований

11.1 Внутрिलाбораторный контроль качества исследования

Порядок ведения внутреннего контроля качества, периодичность и частота выполняемых процедур устанавливается действующей в лаборатории системой менеджмента качества в соответствии с нормативной документацией. Внутрिलाбораторный контроль качества включает преаналитический, аналитический и постаналитический этапы ведения

лабораторных исследований. Необходимо также проводить периодические, не реже 1 раза в год проверку технической компетентности персонала лаборатории. Документальное оформление результатов проведенных контрольных процедур осуществляется по утвержденным действующей системой менеджмента качества формам. Регистрация проведения контроля должна осуществляться на всех уровнях: преаналитическом, аналитическом и постаналитическом, для каждого этапа должны быть разработаны и документированы правила проведения всех процедур. Регистрация и хранение контрольных результатов могут осуществляться на электронных носителях.

Контроль преаналитического этапа должен быть выполнен при сборе образца, хранении, доставке, ручной обработки и регистрации. Для этого должны быть разработаны стандартные операционные процедуры (СОП) для сотрудников лаборатории и медицинского персонала МО, с информацией о процедуре взятия биоматериала, условиях и сроках хранения проб и правилах безопасной транспортировки.

Процедура ведения аналитического этапа регламентирует порядок контроля за соблюдением требований к условиям проведения анализа (лабораторные помещения, воздушная среда, температурные режимы инкубации и хранения, режимы дезинфекции и стерилизации и т.д.), выполнение процедуры ведения контрольных штаммов бактериальных культур, контроль качества питательных сред, контроль качества тест-систем и реагентов. Контроль качества материалов и оборудования включает: соблюдение сроков годности реактивов и наборов реагентов, наличие на рабочем месте СОП по эксплуатации каждого прибора, наличие журналов регистрации сервисного обслуживания и ремонта оборудования.

Для ведения контроля качества аналитического этапа бактериологической диагностики хронической респираторной инфекции, необходимо наличие в лаборатории коллекции контрольных штаммов типовых культур. Индикаторами качества постаналитического этапа исследования являются: интерпретация и оценка результатов анализа, предоставление отчета исследования, клиническое использование результатов анализа.

11.2 Внешняя оценка качества исследования

Лабораториям, проводящим бактериологическую диагностику хронических респираторных инфекций у пациентов с МВ, рекомендовано участвовать в программах внешней оценки качества для подтверждения правильности своих результатов лабораторных исследований и возможности их сопоставления с результатами других лабораторий. Организации, аккредитованные для проведения межлабораторной оценки качества выполнения лабораторных исследований периодически (несколько раз в год) рассылают контрольные штаммы для определения правильности проводимых

микробиологических и молекулярно-генетических исследований. Лаборатория, получив данные сравнительной оценки правильности выполнения исследования, при неудовлетворительной оценке результатов должна принимать соответствующие меры для исправления своих ошибок.

12. Список литературы

1. Ашерова И.К., Капранов Н.И. Муковисцидоз – медико - социальная проблема. М., Ярославль: Печатный дом, 2013: 236 с.
2. Капранов Н.И., Каширская Н.Ю., Муковисцидоз. ред. М.: ИД «Медпрактика-М», 2014: 672 с.
3. Капранов Н.И., Шабалова Л.А., Каширская Н.Ю., Симонова О.И., Воронкова А.Ю., Семькин С.Ю., Поликарпова С.В., Постников С.С., Антибиотикотерапия при муковисцидозе у детей// Антибиотики и химиотерапия.-2001.-46 (2).-С.26-32.
4. Бойцов А.Г., Васильев О.Д. Неферментирующие бактерии // Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство. – под ред. В. В. Долгова, В.В. Меньшикова – Москва: «ГЭОТАР-Медиа», 2013. – с.380-381.
5. C.Williams, R. Ranjendran, G. Ramage Pathogenesis of Fungal Infections in Cystic Fibrosis. *Curr Fungal Infect Rep* (2016) 10:163–169.
6. M. Pihet, J. Carrere, B. Cimon, D. Chabasse, L. Delhaes, F. Symoens, J. P. Bouchara. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis—a review. *Medical Mycology* June 2009, 47 (Special Issue), 387-397
7. John J. LiPuma et al. The Changing Microbial Epidemiology in Cystic Fibrosis 2010, M. Pihet, J. Carrere, B. Cimon, D. Chabasse, L. Delhaes, F. Symoens, J. P. Bouchara. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis—a review. *Medical Mycology* June 2009, 47 (Special Issue), 387-397.
8. M. Pihet, J. Carrere, B. Cimon, D. Chabasse, L. Delhaes, F. Symoens, J. P. Bouchara. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis—a review. *Medical Mycology* June 2009, 47 (Special Issue), 387-397.
9. Борзова Ю.В., Козлова Я.И., Сусллова И.Е., Богомолова Т.С., Аак О.В., Спиридонова В.А., Степаненко Т.С., Орлов А.В., Климко Н.Н. Микозы у больных муковисцидозом. Сборник тезисов всероссийской научно-практической конференции Боткинские чтения 11-12 мая 2017.
10. Чернуха М.Ю., Аветисян Л.Р., Шагинян И.А., Алексеева Г.В., Авакян Л.В., Каширская Н.Ю., Капранов Н.И., Семькин С.Ю., Сиянова Е.А, Медведева О.С., Красовский С.А., Усачева М.В., Кондратьева Е.И., Амелина Е.Л., Чучалин А.Г., Гинцбург А.Л. Алгоритм микробиологической диагностики хронической инфекции

- лёгких у больных муковисцидозом. Клин. Микробиол. Антимикроб. Химотер. 2014, Том16, №4, с.276-290.
11. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus E. Kerem, S.Conway, S. Elborn, H. Heijerman –Jurnal of cystic fibrosis, 4 (2005), 7-26.
 12. Национальный консенсус «Муковисцидоз: определения, диагностические критерии, терапия» 2016г стр.52-57
 13. Cumitechs should be cited as follows, e.g.: Gilligan, P. H., D. L. Kiska, and M. D. Appleman. 2006. *Cumitech 43, Cystic Fibrosis Microbiology*. Coordinating ed., M. D. Appleman. ASM Press, Washington, D.C. с. 10-19
 14. Daneshvar, M. I., D. G. Hollis, A. G. Steigerwalt, A. M. Whitney, L. Spangler, M. P. Douglas, J. G. Jordon, J. P. MacGregor, B. C. Hill, F. C. Tenover, D. J. Brenner, and R. S. Weyant. 2001. Assignment of CDC weak oxidizer group 2 (WO-2) to the new genus *Pandoraea* and characterization of three new *Pandoraea* genomospecies. *J. Clin. Microbiol.* 39:1819–1826.
 15. John J. Puma. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis/ Clinical Microbiology reviews/ Apr., 2010, vol.23, №2, p.299-323
 16. Gerd Doring, Niels Hoiby. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus/*Journal of cystic fibrosis*/ 3(2004) 67-91.
 17. The *Burkholderia cepacia* complex. Suggestions for prevention and Infection control. Second edition. September 2004
 18. *Pseudomonas aeruginosa* infection in people with cystic fibrosis. Suggestions for prevention and Infection control. Second edition. September 2004
 19. О.В. Кондратенко, А.В. Лямин, Н.Л. Акимова. Новые патогены у пациентов с муковисцидозом: *Inquilinus limosus*/ Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия/2016, том 18, №3 с.162-165.
 20. Руководство по медицинской микробиологии. Книга 3. Том 1. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика. /Колл.авторов//Составитель А.С.Лабинская, редактор Н.Н. Костюкова.- М.: Издательство БИНОМ. 2013.-752с.:ил.
 21. Del Campo, R., M.-I. Morosini, E. G. de la Pedrosa, A.Fenoll, C. Munoz-Almagro, L. Maiz, F. Baquero, R.Canton, and the Spanish Pneumococcal Infection Study Network. 2005. Population structure, antimicrobial resistance, and mutation frequencies of *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 43:2207–2214.
 22. Górny R.L, et.al. Fungal fragments as indoor air biocontaminants. *Appl. Environment. Microbiol.* 2002.

23. Козлова Я.И. Микогенная аллергия у жителей помещений, пораженных микромицетами. Дисс. 2008г.
24. J.C. Liu et al. What is the clinical significance of filamentous fungi positive sputum cultures in patients with cystic fibrosis? *Journal of Cystic Fibrosis* 12 (2013) 187–193 .
25. Aaron SD, Vandemheen KL, Freitag A, Pedder L, Cameron W, Lavoie A, et al. Treatment of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis: a randomized, placebo-controlled pilot study. *PLoS One* 2012; 7: e36077.
26. Geller DE, Kaplowitz H, Light MJ, Colin AA (1999) Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: reported prevalence, regional distribution, and patient characteristics. Scientific Advisory Group, Investigators, and Coordinators of the Epidemiologic Study of Cystic Fibrosis. *Chest* 116: 639–646.
27. Becker JW, et al. Prevalence of allergic bronchopulmonary aspergillosis and atopy in adult patients with cystic fibrosis. *Chest* 1996.
28. Paugam A, Baixench MT, Demazes-Dufeu N, Burgel PR, Sauter E, Kanaan R, et al. Characteristics and consequences of airway colonization by filamentous fungi in 201 adult patients with cystic fibrosis in France. *Med Mycol* 2010; 48.
29. Blyth CC, Middleton PG, Harun A, Sorrell TC, Meyer W, Chen SC. Clinical associations and prevalence of *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? *Med Mycol* 2010.
30. Parize P., Billaud S., Bienvenu A., Dourdy S., lePogam V., Reix P., Piot S., Robert R., Lortholary O., Bouchara J., Dorieu I. Impact of *Scedosporium apiospermum* complex seroprevalence in patients with cystic fibrosis. *J Cyst. Fibros.* 2014.
31. C.Schwarz, A.Thronicke, D.Staab, K. Tintelnot. *Scedosporium apiospermum*: a fungal pathogen causing pneumonia in a patient with cystic fibrosis. *JMM Case Reports*. 2015.
32. Symoens F, Knoop C, Schrooyen M, Denis O, Estenne M, Nolard N, et al. Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25: 603–7.
33. Sahi H, Avery RK, Minai OA, Hall G, Mehta AC, Raina P, et al. *Scedosporium apiospermum* (*Pseudoallescheria boydii*) infection in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2007; 26: 350–6.
34. Kabra SK, Alok A, Kapil A, Aggarwal G, Kabra M, Lodha R et al. Can throat swab after physiotherapy replace sputum for identification of microbial pathogens in children with cystic fibrosis? *Indian J Pediatr* 2004; 71: 21-23.

35. Jung A, Kleinau I, Schonian G, Bauernfiend A, Chen C, Griesse M, Doring G, Gobel U, Wahn U, Paul K. Sequential genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* from upper and lower airways of cystic fibrosis patients *Eur Respir J* 2002; 20: 1457-1463.
36. Rosenfeld, M., J. Emerson, F. Accurso, D. Armstrong, R. Castile, K. Grimwood, P. Hiatt, K. McCoy, S. McNamara, B. Ramsey, and J. Wagener. 1999. Diagnostic accuracy of oropharyngeal culture in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 28:321–328.
37. The American Society for Microbiology Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology , Gilligan et al, 2000
38. Smith, T. F. 2000. Specimen requirements: selection, collection, transport, and processing, p. 11–26. In S. Specter, R. L. Hodinka, and S. A. Young (ed.), *Clinical Virology Manual*, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C.
39. Nair B, Stapp J, Stapp L, Bugni L, van Dalen J, Burns JL. Utility of Gram staining for evaluation of the quality of cystic fibrosis sputum samples. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2791-2794.
40. Murray PR, Washington JA (1975) Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. *Mayo Clin Proc* 50: 339-344.
41. Sadeghi E, Matlow A, MacLusky I, Karmali MA. Utility of Gram stain in evaluation of sputa from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 54-58.
42. Lynne S. Garcia. Editor in chief, original and second editions, / editor in chief Henry D. Isenberg *Clinical microbiology procedures handbook—2nd ed. update*) ASM Press American Society for Microbiology 2007; 311-320.
43. JE Foweraker, S Jalili, V Athithan, D Grogono, MC Curran, RA Floto. New Approaches To The Culture Of Mycobacterium Abscessus Complex From Patients With Cystic Fibrosis *Thorax* 2015; 70. 180.
44. Peter H. Gilligan Infections in Patients with Cystic Fibrosis *Clinics in Laboratory Medicine*, Volume 34, Issue 2, Pages 197-217.
45. Charles R. Esther Jr. Detection of rapidly growing mycobacteria in routine cystic fibrosis cultures *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Apr. 2011, p. 1421–1425.
46. Pye A, Stockley RA, Hill SL. Simple method for quantifying viable bacterial numbers in sputum. *J Clin Pathol* 1995; 48: 719-724.
47. Wong K, Roberts MC, Owens L, Fife M, Smith AL. Selective media for the quantification of bacteria in cystic fibrosis sputum. *J Med Microbiol* 1984; 17: 113-119.
48. European manual of clinical microbiology – 1st edition / editors Cornaglia G., Courcoul R., Herrmann J.-L., Kahlmeter G., Peigue – Lafeuille H., Vila J. – 2012; 163-169.

49. N. Kondori, M. Gilljam, A. Lindblad, B. Jonsson, E.R. B. Moore, C. Wennerås. Exophiala dermatitidis High Rate of Recovery in the Airways of Patients with Cystic Fibrosis Is Associated with Pancreatic Insufficiency *Jurnal jf clinical microbiology*. Mar. 2011, p. 1004–1009 Vol. 49,
50. D'Souza HA, Baron EJ. BBL CHROMagar Staph aureus is superior to mannitol salt for detection of Staphylococcus aureus in complex mixed infections. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 806-808.
51. Flayhart D, Lema C, Borek A, Carroll KC. Comparison of the BBL CHROMagar Staph aureus agar medium to conventional media for detection of Staphylococcus aureus in respiratory samples. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3566-69.
52. Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahle A, Ackermann H, Brade V, Wichelhaus TA. Prevalence and clinical significance of Staphylococcus aureus smallcolony variants in cystic fibrosis lung disease. *J Clin Microbiol* 2007; 45(1):168-172.
53. Н., Бидненко С.И., Макушенко А.С., Ванечутте М., Лютко О.Б., Озерянская Н.М., Авдеева Л.В. Алгоритм идентификации атипичных форм стафилококков (SSCVs) — возбудителей хронических гнойно-воспалительных процессов у людей. *Антибиотики и химиотерапия*, 2013. - № 11.-С.26-30.
54. Laine L, Perry JD, Lee J, Oliver M, James AL, De La Foata C, Halimi D, Orenge S, Galloway A, Gould FK. A novel chromogenic medium for isolation of Pseudomonas aeruginosa from the sputa of cystic fibrosis patients. *J Cystic Fibrosis* 2009; 8: 143-149.
55. Henry D, Campbell M, McGimpsey C, Clarke A, Loudon L, Burns JL, et al. Comparison of isolation media for recovery of Burkholderia cepacia complex from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1999;37:1004-7.
56. Wright RM, Moore JE, Shaw A, Dunbar K, Dodd M, Webb K, et al. Improved cultural detection of Burkholderia cepacia from sputum in patients with cystic fibrosis. *J Clin Pathol* 2001;54:803-5.
57. Wright RM, Moore JE, Shaw A, Dunbar K, Dodd M, Webb AK, Redmond AOB, Crowe M, Murphy PG, Peacock S, Elborn JS. Improved cultural detection of Burkholderia cepacia from sputum in patients with cystic fibrosis. *J Clin Pathol* 2001; 54: 803-805
58. Gilligan, P. H., P. A. Gage, L. M. Bradshaw, D. V. Schidlow, and B. T. DeCicco. 1985. Isolation medium for the recovery of Pseudomonas cepacia from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 22:5–8.
59. Henry, D., M. Campbell, C. McGimpsey, A. Clarke, L. Loudon, J. L. Burns, M. H. Roe, P. Vandamme, and D. Speert. 1999. Comparison of isolation media for recovery of

- Burkholderia cepacia complex from respiratory secretion of patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 37:1004–1007.
60. Welch, D. F., M. J. Muszynski, C. H. Pai, M. J. Marcon, M. M. Hribar, P. H. Gilligan, J. M. Matsen, P. A. Ahlin, B. C. Hilman, and S. A. Chartrand. 1987. Selective and differential medium for recovery of *Pseudomonas cepacia* from the respiratory tracts of patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1730–1734.
 61. Sharp SE, Searcy C. Comparison of mannitol salt agar and blood agar plates for identification and susceptibility testing of *Staphylococcus aureus* in specimens from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4545-4546
 62. Christenson, J. C., D. J. Welch, G. Mukwaya, M. J. Muszynski, R. E. Weaver, and D. J. Brenner. 1989. Recovery of *Pseudomonas gladioli* from respiratory tract specimens of patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 27:270–273.
 63. Kiska, D. L., M. C. Jones, J. A. Carraciolo, B. Eskridge, M. Jordan, S. Miller, D. Hughes, N. King, and P. H. Gilligan. 1996. Accuracy of four commercial systems for identification of *Burkholderia cepacia* and other gram-negative nonfermenting bacilli recovered from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 34:886–891.
 64. Wilsher, M. L., J. Kolbe, A. J. Morris, and F. Welch. 1997. Nosocomial acquisition of *Burkholderia gladioli* in patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:1436–1440.
 65. Clode, F. E., L. A. Methercell, and T. L. Pitt. 1999. Nosocomial acquisition of *Burkholderia gladioli* in patients with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:1436–1440.
 66. Barker, P. M., R. E. Wood, and P. H. Gilligan. 1997. Lung infection with *Burkholderia gladioli* in a child with cystic fibrosis: acute clinical and spirometric deterioration. *Pediatr. Pulmonol.* 23:123–125.
 67. Jones, A. M., T. N. Stanbridge, B. J. Isalska, M. E. Dodd, and A. K. Webb. 2001. *Burkholderia gladioli*: recurrent abscesses in patient with cystic fibrosis. *J. Infect.* 42:69–71.
 68. Coenye, T., P. Vandamme, and J. J. LiPuma. 2003. *Ralstonia respiraculi* sp. nov., isolated from the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:1339–1342.
 69. Shelly, D. B., T. Spilker, E. J. Gracely, T. Coenye, P. Vandamme, and J. J. LiPuma. 2000. Utility of commercial systems for the identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *J. Clin. Microbiol.* 38:3112–3115.

80. Smith A, Baker M. Cefsulodin chocolate blood agar: a selective medium for the recovery of *Haemophilus influenzae* from the respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 1997; 46: 883-885.
81. Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae*. Методические рекомендации для микробиологов. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия том 2, №2, 2000, стр. 93-109.
82. Nagano Y, Millar BC, Goldsmith CE, Walker JM, Elborn JS, Rendall J, Moore JE. Development of selective media for the isolation of yeasts and filamentous fungi from the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *J Cystic Fibrosis* 2008; 7: 566-572.
83. А.Г.Бойцов, О.Д. Васильев Неферментирующие бактерии // Клиническая лабораторная диагностика. Национальное руководство. – под ред. В. В. Долгова, В.В. Меньшикова – Москва: «ГЭОТАР-Медиа», 2013. – с.380-381.
84. UK Standards for Microbiology Investigations Identification of *Pseudomonas* species and other Non-Glucose Fermenters Bacteriology – Identification. ID 17. Issue no: 3. Issue date: 13.04.15. Page: 2-41
85. Laboratory standards for processing microbiological samples from people with cystic fibrosis. Report of the UK Cystic Fibrosis Trust Microbiology Laboratory Standards Working Group 2010 p. 29-31
86. Joyanes P, del Carmen Conejo M, Martinez-Martinez L, Perea EJ. Evaluation of the VITEK 2 system for the identification and susceptibility testing of three species of nonfermenting Gram-negative rods frequently isolated from clinical samples. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3247-3253.
87. Snyder JW, Munier GK, Johnson CL. Direct comparison of the BD phoenix system with the MicroScan WalkAway system for identification and antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae and nonfermentative Gram-negative organisms. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2327-2333.
88. Лямин А.В. Особенности биологических свойств и факторов патогенности штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных из разных источников. Аспирантский вестник Поволжья, №3-4, 2010. – 220-224 с.
89. Manual of clinical microbiology — 11th edition / editors in chief, James H. Jorgensen, Michael A. Pfaller; volume editors, Karen C. Carroll [and 4 others]. – 2015 p.774.
90. С.В. Поликарпова, С.В. Жилина, Н.В. Пивкина, О.Г. Тимофеева Особенности микробиологической диагностики инфекций нижних дыхательных путей у больных муковисцидозом. Справочник заведующего КДЛ, 2017 №1: с. 70-79; №2: с. 17-24.

91. Hogardt M, Ulrich J, Riehn-Kopp H, Tummeler B. EuroCare quality assessment of diagnostic microbiology of cystic fibrosis isolates. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3435-3438.
92. Shelly, D. B., T. Spilker, E. J. Gracely, T. Coenye, P. Vandamme, and J. J. LiPuma. 2000. Utility of commercial systems for the identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *J. Clin. Microbiol.* 38:3112–3115.
93. Brisse, S., S. Stefani, J. Verhoef, A. Van Belkum, P. Vandamme, and W. Goessens. 2002. Comparative evaluation of the BD Phoenix and VITEK 2 automated instruments for identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 40:1743–1748.
94. Spilker T, Vandamme P, LiPuma JJ. 2012. A multilocus sequence typing scheme implies population structure and reveals several putative novel *Achromobacter* species. *J Clin Microbiol* 50:3010–3015.
95. Schreckenberger, P. C., M. I. Danshvar, R. S. Weyant, and D. G. Hollis. 2003. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and other nonfermentative gram-negative rods, p. 749–779. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgenson, M. A. Pfaller, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. ASM Press, Washington, D.C.
96. Liu, L., T. Coenye, J. L. Burns, P. W. Whitby, T. L. Stull, and J. J. LiPuma. 2002. Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* 40:1210–1213.
97. Joyanes P, del Carmen Conejo M, Martinez-Martinez L, Perea EJ. Evaluation of the VITEK 2 system for the identification and susceptibility testing of three species of nonfermenting Gram-negative rods frequently isolated from clinical samples. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3247-3253.
98. Wellinghausen N, Kothe J, Wirths B, Sigge A, Poppert S. Superiority of molecular techniques for identification of Gram-negative, oxidase-positive rods, including morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2005; 43:4070-75.
99. Nicolas Degand, Etienne Carbonnelle, Brunhilde Dauphin, Jean-Luc Beretti, Muriel Le Bourgeois, Isabelle Sermet-Gaudelus, Christine Segonds, Patrick Berche, Xavier Nassif, and Agnès Ferroni Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Cystic Fibrosis Patients *J Clin Microbiol.* 2008 Oct; 46(10): 3361–67
100. Ferroni, A., I. Sermet-Gaudelus, E. Abachin, G. Quesne, G. Lenoir, P. Berche, and J.-L. Gaillard. 2002. Use of 16S rRNA gene sequencing for identification of nonfermenting

- gram-negative bacilli recovered from patients attending a single cystic fibrosis center. *J. Clin. Microbiol.* 40:3793–3797.
101. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», 2018г.
 102. Foweraker JE, Laughton CR, Brown DFJ, Bilton D. Phenotypic variability of *P. aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 921-927.
 103. Grimwood K, Kidd TJ, Tweed M. Successful treatment of cepacia syndrome. *J Cystic Fibrosis* 2009; 8: 291-293.
 104. Morosini MI, Garcia-Castillo M, Loza E, Perez-Vazquez M, Baquero F, Canton R. Breakpoints for predicting *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to tobramycin in cystic fibrosis patients: use of highrange Etest strips. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4480-85.
 105. М.В. Сухорукова Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам: что стоит за результатом. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2013, Том 15, №3 с.219-229.
 106. Comparative evaluation of test assays for detection of methicillin resistance in *S.aureus*. R. Monno et al. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003; 9: 574-575.
 107. Flayhart D, Lema C, Borek A, Carroll KC. 2004. Comparison of the BBL CHROMagar *Staph aureus* agar medium to conventional media for detection of *Staphylococcus aureus* in respiratory samples. *J Clin Microbiol* 42:3566–3569.
 108. Perez LR, Antunes AL, Bonfanti JW, Pinto JB, Roesch EW, Rodrigues D, Dias CA. 2012. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in clinical specimens from cystic fibrosis patients by use of chromogenic selective agar. *J Clin Microbiol* 50:2506–2508.
 109. Brown DF, Walpole E. 2001. Evaluation of the Mastalex latex agglutination test for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* grown on different screening media. *J Antimicrob Chemother* 47:187–189.
 110. Marlowe EM, Linscott AJ, Kanatani M, Bruckner DA. 2002. Practical therapeutic application of the oxoid PBP2' latex agglutination test for the rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in blood cultures. *Am J Clin Pathol* 118:287–291.
 111. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin United States, 2003. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002;51: 566–87.

112. Moravvej Z, Estaji F, Askari E, Solhjoui K, Naderi Nasab M, Saadat S. 2013. Update on the global number of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) strains. *Int J Antimicrob Agents* 42:370–371.
113. Розова Л.В., Годовых Н.В. Индуцибельный тип резистентности к клиндамицину стафилококков, выделенных у больных хроническим остеомиелитом // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 3. – С. 70-73.
114. Ajantha GS, Kulkarni RD, Shetty J, Shubhada C, Jain P. 2008. Phenotypic detection of inducible clindamycin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates by using the lower limit of recommended inter-disk distance. *Indian J Pathol Microbiol* 51:376–378.
115. Burns JL, Saiman L, Whittier S, Krzewinski J, Liu Z, Larone D, Marshall SA, Jones RN. 2001. Comparison of two commercial systems (Vitek and MicroScan-WalkAway) for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 39:257–260.
116. Marley EF, Mohla C, Campos JM. 1995. Evaluation of E-Test for determination of antimicrobial MICs for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 33:3191–3193.
117. Di Bonaventura G, Ricci E, Della Loggia N, Catamo G, Piccolomini R. 1998. Evaluation of the E test for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with long-term bladder catheterization. *J Clin Microbiol* 36:824–826.
118. Hogardt M, Ulrich J, Riehn-Kopp H, Tummler B. EuroCare quality assessment of diagnostic microbiology of cystic fibrosis isolates. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 3435-3438.
119. Burns JL, Saiman L, Whittier S, Larone D, Krzewinski J, Liu Z, Marshall SA, Jones RN. Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1818-22.
120. Burns JL, Saiman L, Whittier S, Krzewinski J, Liu Z, Larone D, Marshall SA, Jones RN. Comparison of two commercial systems (Vitek and MicroScan WalkAway) for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 39: 257-260.
121. Zebouh M, Thomas C, Honderlick P, Lemee L, Segonds C, Wallet F, Husson M-O. Direct antimicrobial susceptibility testing method for analysis of sputum collected from patients with cystic fibrosis. *J Cystic Fibrosis* 2008; 7: 238-243.
122. Foweraker JE, Laughton CR, Brown DFJ, Bilton D. Phenotypic variability of *P. aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its

- impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 921-927.
123. Hodson, M. E., C. G. Gallagher, and J. R. Govan. 2002. A randomized clinical trial of nebulized tobramycin or colistin in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* 20:658–664.
 124. Ramsey, B. W., M. S. Pepe, J. M. Quan, K. L. Otto, A. B. Montgomery, J. Williams-Warren, K. M. Vasiljev, D. Borowitz, C. M. Bowman, B. C. Marshall, S. Marshall, and A. L. Smith. 1999. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. Cystic Fibrosis Inhaled Study Group. *N. Engl. J. Med.* 340:23–30.
 125. Morosini MI, Garcia-Castillo M, Loza E, Perez-Vazquez M, Baquero F, Canton R. Breakpoints for predicting *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to tobramycin in cystic fibrosis patients: use of highrange Etest strips. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4480-4485
 126. Poole K, Srikumar R. 2001. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Curr Top Med Chem* 1:59–71.
 127. Aaron SD, Ferris W, Henry DA, Speert DP, MacDonald NE. 2000. Multiple combination bactericidal antibiotic testing for patients with cystic fibrosis infected with *Burkholderia cepacia*. *Am J Respir Crit Care Med* 161:1206–1212.
 128. Hoban DJ, Bouchillon SK, Johnson JL, Zhanel GG, Butler DL, Miller LA, Poupard JA, Gemifloxacin Surveillance Study Research Group. 2001. Comparative in vitro activity of gemifloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin and ofloxacin in a North American surveillance study. *Diagn Microbiol Infect Dis* 40:51–57.
 129. Livermore, D., and N. Woodford. 2000. Carbapenemases: a problem of waiting? *Curr. Opin. Microbiol.* 3:489–495.
 130. Canton, R., S. Valdezate, A. Vindel, B. S. D. Saz, L. Maiz, and F. Baquero. 2003. Antimicrobial susceptibility profile of molecular typed cystic fibrosis *Stenotrophomonas maltophilia* isolates and differences with non-cystic fibrosis isolates. *Pediatr. Pulmonol.* 35:99–107
 131. San Gabriel, P., J. Shou, S. Tabibi, Y. Chen, M. Trauzzi, and L. Saiman. 2004. Antimicrobial susceptibility and synergy studies of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:168–171.
 132. Sader, H. S., and R. N. Jones. 2005. Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric gram-negative bacilli. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25: 95–109.
 133. Saiman, L., Y. Chen, S. Tabibi, P. S. Gabriel, J. Zhou, Z. Liu, L. Lai, and S. Whittier. 2001. Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 39:3942–3945.

134. Sader, H. S., and R. N. Jones. 2005. Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric gram-negative bacilli. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25: 95–109.
135. Daneshvar, M. I., D. G. Hollis, A. G. Steigerwalt, A. M. Whitney, L. Spangler, M. P. Douglas, J. G. Jordon, J. P. MacGregor, B. C. Hill, F. C. Tenover, D. J. Brenner, and R. S. Weyant. 2001. Assignment of CDC weak oxidizer group 2 (WO-2) to the new genus *Pandoraea* and characterization of three new *Pandoraea* genomospecies. *J. Clin. Microbiol.* 39:1819–1826.
136. Johnson, L. N., J. Han, S. M. Moskowitz, J. L. Burns, X. Qin, and J. A. Englund. 2004. *Pandoraea* bacteremia in a cystic fibrosis patient with associated systemic illness. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23:881–882.
137. Wellinghausen, N., A. Essig, and O. Sommerburg. 2005. *Inquilinus limosus* in patients with cystic fibrosis, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 11:457–459.
138. Антибиотикорезистентность *Haemophilus influenzae* в России: результаты многоцентрового проспективного исследования ПеГАС О.В. Сивая¹, Р.С. Козлов¹, О.И. Кречикова, Н.В. Иванчик, Л.К. Катосова, Л.В. Гудкова. Клин микробиол антимикроб химиотер 2014, Том 16, № 1 стр. 57-69
139. Denning DW, Radford SA, Oakley KL, Hall L, Johnson EM, Warnock DW. Correlation between in vitro susceptibility testing to itraconazole and in-vivo clinical outcome of *Aspergillus fumigatus* infection. *European Respiratory Journal* 2016 47: 45
140. Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, Morrison VA, Segal BH, Steinbach WJ, Stevens DA, van Burik J-A, Wingard JR, Patterson TF. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008, 46: 327-360.
141. Timpe A, Runyon E.H. The relationship of atypical acid-fast bacteria to human disease; a preliminary report. *J Lab Clin Med.* 1954 Aug; 44(2):202-9.
142. Falkinham J.O. Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria *Clin microb rev*, Apr. 1996, p. 177–215 Vol. 9, No. 2.
143. Billinger M.E., Olivier K.N., Viboud C., et al. Nontuberculous mycobacteria-associated lung disease in hospitalized persons, United States, 1998-2005 // *Emerg Infect Dis.*-2009.- Vol. 15.- P. 1562-1569.
144. Moore J., Kruijshaar M.E., Ormerod L.P., Drobniewski F., Abubakar I. Increasing number of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. Health Protection, Agency Centre for Infections, Respiratory Diseases Department - Tuberculosis Section. - London NW9 5EQ, UK.

145. Mazza-Stalder J., Jaton-Ogay K., Nicod L. Non tuberculous mycobacteria pulmonary disease: what's new? Service de pneumologie, Institut de microbiologie CHUV, 1011 Lausanne. Jesica // *Rev Med Suisse*. -2009.- Vol. 5.- № 226.-P. 2344-6, 2348-50.
146. Andrejak C., Thomsen V.O., Johansen I.S., et al. Nontuberculous pulmonary mycobacteriosis in Denmark: incidence and prognostic factors // *Am J Respir Crit Care Med*.-2010.-Vol.181.-P. 514-521.
147. Lai C.C., Tan C.K., Chou C.H., et al. Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000-2008 // *Emerg Infect Dis*.- 2010.- Vol. 16.-P. 294-296.
148. Van der Werf et al. BMC Infectious Diseases 2014, 14:62; Moore et al. BMC Public Health 2010, 10:612. *Emerging Infectious Diseases* www.cdc.gov/eid Vol. 17, No. 3, March 2011.
149. Гунтупова Л.Д., Борисов С.Е., Соловьева И.П. Микобактериозы во фтизиопульмонологической практике: обзор литературы и собственный опыт // Практическая медицина. – 2011. – № 3 (51). – С. 39–50.
150. Литвинов В.И., Дорожкова И.Р., Макарова М.В., Краснова М.А., Фрейман Г.Е. Выделение и идентификация нетуберкулезных микобактерий // Вестник РАМН.- 2010. - № 3.- С.7-11.
151. Оттен Т.Ф., Васильев А.В. Микобактериоз. - СПб: Медицинская пресса, 2005.- 224 с.14-17.
152. Смирнова Т. Г., Андреевская С. Н., Ларионова Е. Е., Андриевская И. Ю., Устинова В. В., Черноусова Л. Н. Мониторинг видового разнообразия нетуберкулезных микобактерий в ряде областей РФ с использованием ДНК-стрипов GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Германия) «Туберкулёз и болезни лёгких» 2017; 95(5):54-59. DOI : 10.21292/2075-1230-2017-95-5-54-59].
153. Laura Viviani a,1 , Michael J. Harrison b,1 , Anna Zolin a , Charles S. Haworth b , R. Andres Floto b,c Epidemiology of nontuberculous mycobacteria (NTM) amongst individuals with cystic fibrosis (CF) Journal of Cystic Fibrosis 15 (2016) 619–623.
154. Manika K, Giouleka P, Zarogoulidis K, Kioumis I. Multidrug-resistant tuberculosis in an adult with cystic fibrosis. *Respiration*. 2013;85(4):350-3. doi: 10.1159/000338846. Epub 2012 Aug 3.
155. Patil N, Marco A, Montales MT, Bhaskar N, Mittadodla P, Mukasa LN. Pulmonary Tuberculosis in a Patient with Cystic Fibrosis. *N Am J Med Sci*. 2015 May;7(5):233-5. doi: 10.4103/1947-2714.157494.

156. Adjemian J, Olivier KN, Seitz AE, Falkinham III JO, Holland SM, Prevots DR. Spatial clusters of nontuberculous mycobacterial lung disease in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* 2012;186(6):553–8.
157. Binder AM, Adjemian J, Olivier KN, Prevots DR. Epidemiology of nontuberculous mycobacterial infections and associated chronic macrolide use among persons with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 188(7):807–12.
158. Viviani L, Zolin A, Mehta A, Olesen HV. The European Cystic Fibrosis Society patient registry: valuable lessons learned on how to sustain a disease registry. *Orphanet J Rare Dis* 2014;9:81.
159. Wanyama SS, Thomas M, Jansen J, on behalf of all members of the BMRRBM. Comparing the best spirometry values of the year with values obtained at the last consultation in cystic fibrosis patients in Belgium using the CF registry data. *J Cyst Fibros* 2010;9(S1):S111.
160. Mussaffi H, Rivlin J, Shalit I, Ephros M, Blau H. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis associated with allergic bronchopulmonary aspergillosis and steroid therapy. *Eur Respir J* 2005;25:324–8 Denmark.
161. Levy I, Grisaru-Soen G, Lerner-Geva L, Kerem E, Blau H, Bentur L, et al. Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel. *Emerg Infect Dis* 2008; 14(3):378–84.
162. Черноусова Л.Н., Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е., Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Попов С.А., Журавлев В.Ю., Пузанов В.А., Марьяндышев А.О., Вахрушева Д.В., Кравченко М.А., Сафонова С.Г., Васильева И.А., Эргешов А.Э. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза РФ. – Москва. – 2015. ООО «Издательство «Триада», 2015. Тверь: – 46 с.
163. Согласованные рекомендации Американского фонда кистозного фиброза (муковисцидоза) и Европейского общества кистозного фиброза по лечению микобактериоза у пациентов с кистозным фиброзом – С-Пб.: Благотворительный фонд «Острова», 2017 г. – 32 с.: ил.
164. ГОСТ Р ИСО 15189-2015 Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности ISO 15189:2012 Medical laboratories — Requirements for quality and competence (IDT) с. 30-31
165. Rosenfeld, M., J. Emerson, F. Accurso, D. Armstrong, R. Castile, K. Grimwood, P. Hiatt, K. McCoy, S. McNamara, B. Ramsey, and J. Wagener. 1999. Diagnostic accuracy of

- oropharyngeal culture in infants and young children with cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* 28:321–328.
166. Ramsey, B. W. 1996. What is the role of upper airway bacterial cultures in patients with cystic fibrosis? *Pediatr. Pulm.* 21:265–266.
 167. Cystic Fibrosis Foundation. 1994. Microbiology and infectious disease in cystic fibrosis, p. 1–26. In Cystic Fibrosis Foundation, Concepts of Care, vol. V, section 1. *Cystic Fibrosis Foundation*, Bethesda, Md.
 168. Ramsey, B. W. 1996. What is the role of upper airway bacterial cultures in patients with cystic fibrosis? *Pediatr. Pulm.* 21:265–266.
 169. Blecker-Shelly, D., T. Spikler, E. J. Gracely, T. Coeyne, P. Vandamme, and J. J. Li-Puma. 2000. Utility of commercial systems for the identification of *Burkholderia cepacia* complex from cystic fibrosis sputum culture. *J. Clin. Microbiol.* 38:3112–3115.
 170. Coenye, T., P. Vandamme, J. R. W. Govan, and J. J. LiPuma. 2001. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J. Clin. Microbiol.* 39:3427–3436.
 171. Tramper-Stranders GA, van der Ent CK, Molin S, et al. Initial *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: characteristics of eradicated and persistent isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012; 18 (6): 567–74.
 172. Ашерова И.К., Капранов Н.И. Муковисцидоз – медико-социальная проблема. М., Ярославль: Печатный дом, 2013.
 173. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: 2005. Annual data report to the center directors. Bethesda, MD: *Cystic Fibrosis Foundation*, 2006.
 174. Flume PA, O’Sullivan BP, Robinson KA, et al. Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007; 176: 957–69.
 175. Kosorok MR, Zeng L, West SE, et al. Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *Pediatr. Pulmonol.* 2001; 32: 277–87.
 176. Dodge JA, Lewis PA, Stanton M, Wilsher J. Cystic fibrosis mortality and survival in the UK: 1947–2003. *Eur. Respir.* 2007; 29: 522–6.
 177. Шагинян И.А., Капранов Н.И., Чернуха М.Ю. и др. Микробный пейзаж нижних дыхательных путей у различных возрастных групп детей, больных муковисцидозом. Журнал микробиологии, эпидемиологии и инфекционных болезней. 2009; 5: 15–20.
 178. Demco CA, Stern RC, Doershuk CF. *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis: incidence and prevalence. *Pediatr. Pulmonol.* 1998; 25: S304–8.

179. Alan R. Smyth, Scott C Bell, Snezana Bojcin, et al. Review. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2014; 13: 23–42.
180. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry: 2005. Annual data report to the center directors. Bethesda, MD: *Cystic Fibrosis Foundation*, 2006.
181. Красовский С.А., Никонова В.С., Каширская Н.Ю. и др. Клинико-генетическая, микробиологическая и функциональная характеристика больных муковисцидозом, проживающих в Москве и Московской области. *Вопросы современной педиатрии*. 2013; 12 (1): 24–30.
182. Stivens D.A., et al. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Cystic Fibrosis – State of Art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference, 2003
183. Климко Н.Н. Микозы: диагностика и лечение Руководство для врачей. — 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Фармтекб 2017. — 272 с.
184. D. W. Denning, J. Cadranel, C. Beigelman et al. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *European Respiratory Journal* 2016 47: 45-68.
185. T.F. Patterson, G.R. Thompson, D. W. Denning et al. Practice Guidelines for the Diagnosis and Management of Aspergillosis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America *Clinical Infectious Diseases*, Volume 63, Issue 4, 15 August 2016, Pages e1–e60.
186. E.M. Harman, F. Talavera, R.P. Byrd Aspergillosis Guidelines Updated: *Medscape* Aug 15, 2016.

Приложение А. Состав рабочей группы

Клинические рекомендации «Кистозный фиброз (муковисцидоз): бактериологическая диагностика хронической респираторной инфекции» разработаны:

Основные разработчики:

- Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины» (Ассоциация «ФЛМ») ¹;
- Межрегиональная ассоциация общественных объединений «Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии» (МАКМАХ)².

Разработчики:

- Российское респираторное общество ³;
- Российское общество медицинских генетиков ⁴;

ФИО	Место работы с указанием занимаемой должности, ученой степени и звания	Профессиональная ассоциация, членом которой является специалист
Аветисян Люсине Рамуальдовна	«ФНИЦЭМ им.Н.Ф. Гамалеи» МЗ России лаборатория молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций ФГБУ ведущий научный сотрудник к.м.н.	1,2
Амелина Елена Львовна.	ФГУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России заведующая лабораторией муковисцидоза к.м.н.	3
Андреевская Софья Николаевна	ФГБНУ «ЦНИИТ», лаборатория молекулярно-генетических методов исследования старший научный сотрудник к.м.н.	
Богомолова Татьяна Сергеевна	ФГБОУ ВО СЗГМУ «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России заведующая НИЛ микологического мониторинга и биологии грибов, доцент кафедры медицинской микробиологии к.б.н.	2
Борзова Юлия Владимировна	ГБОУ ВО «Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова минздрава России заведующая микологической клиникой к.м.н.	2
Васильева Наталья Всеволодовна	ФГБОУ ВО СЗГМУ «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России Директор НИИ медицинской микологии им. П.Н. Кашкина, зав. кафедрой медицинской микробиологии д.б.н., профессор	2

Вечорко Валерий Иванович	ГБУЗ «Городская клиническая больница №15 им. О.М.Филатова ДЗ г. Москвы» главный врач, к.м.н.	1
Воронкова Анна Юрьевна	ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» старший научный сотрудник научно-клинического отдела муковисцидоза, к.м.н.	3,4
Жилина Светлана Владимировна	ГБУЗ «Морозовская ДГКБ» ДЗ г. Москвы руководитель группы микробиологических исследований КДЛ, к. м. н.	1,2
Иванчик Натали Владимировна	НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» МЗ РФ Смоленск старший научный сотрудник, к.м.н.	1,2
Каширская Наталья Юрьевна	ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» главный научный сотрудник научно-клинического отдела муковисцидоза, д.м.н профессор	3,4
Климко Николай Николаевич	ФГБОУ ВО СЗГМУ «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России заведующий кафедрой клинической микологии, аллергологии и иммунологии д.м.н, профессор	2
Козлов Роман Сергеевич	НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» МЗ РФ, директор, президент Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ) д.м.н. член-корреспондент РАН, профессор,	2
Кондратенко Ольга Владимировна	ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» МЗ РФ, к.м.н., доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии, врач-бактериолог микробиологического отдела КДЛ Клиник ФГБОУ ВО СамГМУ МЗ РФ.	1,2
Кондратьева Елена Ивановна	ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» заведующая научно-клиническим отделом муковисцидоза д.м.н., профессор	3,4
Кочетов Анатолий Глебович	ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» РУДН г. Москва, президент Ассоциации «ФЛМ», главный внештатный специалист МЗ РФ по клинической лабораторной диагностике, д.м.н., профессор	1
Красовский Станислав Александрович	ФГУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России лаборатория муковисцидоза старший научный сотрудник к.м.н.	3,4
Ларионова Елена	ФГБНУ «ЦНИИТ», отдел микробиологии,	

Евгеньевна	заведующая лабораторией микробиологической диагностики туберкулеза старший научный сотрудник к.б.н.	
Лямин Викторович	Арте М ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» МЗ РФ, к.м.н., доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии, врач-бактериолог микробиологического отдела КДЛ Клиник ФГБОУ ВО СамГМУ МЗ РФ.	1,2
Никонова Виктория Сергеевна	ФГБНУ «Медико-генетический научный центр»старший научный сотрудник научно-клинического отдела муковисцидоза к.м.н.	3,4
Поликарпова Светлана Вениаминовна	ГБУЗ «Городская клиническая больница №15 им. О.М.Филатова ДЗ г.Москвы» заведующая бактериологической лабораторией, к.м.н.	1,2
Смирнова Татьяна Геннадьевна	ФГБНУ «ЦНИИТ», лаборатория молекулярно-генетических методов исследования старший научный сотрудник к.м.н.	
Сухорукова Марина Витальевна	НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» МЗ РФ Смоленск старший научный сотрудник, к.м.н.	1,2
Черноусова Лариса Николаевна	ФГБНУ «ЦНИИТ», Руководитель отдела микробиологии д.б.н. профессор	
Чернуха Марина Юрьевна	ФГБУ «ФНИЦЭМ им.Н.Ф. Гамалеи» МЗ России лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций ведущий научный сотрудник, д.м.н.	
Шагинян Игорь Андронникович	ФГБУ «ФНИЦЭМ им.Н.Ф. Гамалеи» МЗ России заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций главный научный сотрудник, д.м.н.	
Шерман Виктория Давидовна	ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» научно-клинический отдел муковисцидоза старший научный сотрудник, к.м.н.	3,4

Приложение А2. Методология разработки клинических рекомендаций

- **Целевая аудитория данных клинических рекомендаций:**

1. врач-бактериолог;
2. врач клинической лабораторной диагностики;
3. врач-лаборант;
4. врач-миколог (до окончания действия сертификата)
5. биолог;
6. медицинский микробиолог.

Клинические рекомендации «Кистозный фиброз (муковисцидоз): микробиологическая диагностика хронической респираторной инфекции» предназначены для применения в медицинских организациях Российской Федерации.

Клинические рекомендации разработаны для решения следующих задач:

- проверки на соответствие установленным Протоколом требований при проведении процедуры лицензирования медицинской организации;
- установления единых требований к порядку микробиологической диагностики хронической респираторной инфекции при МВ;
- унификации разработок базовых программ обязательного медицинского страхования и оптимизация медицинской помощи больным хронической респираторной инфекцией при МВ;
- обеспечения оптимальных объемов, доступности и качества медицинской помощи, оказываемой пациенту в медицинской организации;
- разработки стандартов медицинской помощи и обоснование затрат на ее оказание;
- обоснование программы государственных гарантий оказания медицинской помощи населению, в том числе и детям;
- проведению экспертизы и оценки качества медицинской помощи объективными методами и планирования мероприятий по его совершенствованию;
- выбора оптимальных технологий профилактики, диагностики, лечения и реабилитации для конкретного больного;
- защиты прав пациента и врача при разрешении спорных и конфликтных вопросов.

- **Методология**

Методы, использованные для сбора/селекции доказательств:

- поиск в электронных базах данных.

- **Описание методов, использованных для сбора/селекции доказательств:**

- доказательной базой для рекомендаций явились публикации, вошедшие в Кохрейновскую библиотеку, базы данных PubMed, EMBASE и MEDLINE, электронную библиотеку (www.e-library.ru). Глубина поиска составляла 25 лет.

Клинические рекомендации созданы на основе согласованного мнения членов ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины» (Ассоциация «ФЛМ»), Межрегиональной ассоциацией общественных объединений «Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии» (МАКМАХ), Российского респираторного общества, Российского общества медицинских генетиков, а также обобщения опыта авторов, их отечественных и зарубежных коллег и апробированных рекомендаций, действующих в настоящее время в Великобритании, США [13,85].

- **Методы, использованные для оценки качества и силы доказательств:**

- консенсус экспертов;
- оценка значимости в соответствии с уровнями достоверности доказательств и уровнями убедительности рекомендаций.

Приложение 1. Уровни достоверности доказательств с указанием использованной классификации уровней достоверности доказательств

Уровни доказательств	Описание
1++	Мета-анализы высокого качества, систематические обзоры рандомизированных контролируемых исследований (РКИ), или РКИ с очень низким риском систематических ошибок
1+	Качественно проведенные мета-анализы, систематические обзоры или РКИ с низким риском систематических ошибок
1-	Мета-анализы, систематические обзоры или РКИ с высоким риском систематических ошибок
2++	Высококачественные систематические обзоры исследований случай-контроль или когортных исследований. Высококачественные обзоры исследований случай-контроль или когортных исследований с очень низким риском эффектов смешивания или систематических ошибок и средней вероятностью причинной взаимосвязи
2+	Хорошо проведенные исследования случай-контроль или когортные исследования со средним риском эффектов смешивания или систематических ошибок и средней вероятностью причинной взаимосвязи
2-	Исследования случай-контроль или когортные исследования с высоким риском эффектов смешивания или систематических ошибок и средней вероятностью причинной взаимосвязи
3	Не аналитические исследования (например: описания случаев, серий случаев)
4	Мнение экспертов

- **Методы, использованные для анализа доказательств:**

- Обзоры опубликованных мета-анализов;
- Систематические обзоры с таблицами доказательств.

Приложение 2. Уровни убедительности рекомендаций с указанием использованной классификации уровней убедительности рекомендаций

Сила доказательств	Описание
A	По меньшей мере, один мета-анализ, систематический обзор, или РКИ, оцененные, как 1++ , напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие устойчивость результатов или группа доказательств, включающая результаты исследований, оцененные, как 1+, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие общую устойчивость результатов
B	Группа доказательств, включающая результаты исследований, оцененные, как 2++, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие общую устойчивость результатов или экстраполированные доказательства из исследований, оцененных, как 1++ или 1+
C	Группа доказательств, включающая результаты исследований оцененные, как 2+, напрямую применимые к целевой популяции и демонстрирующие общую устойчивость результатов; или экстраполированные доказательства из исследований, оцененных, как 2++
D	Доказательства уровня 3 или 4; или экстраполированные доказательства, из исследований, оцененных, как 2+

- **Описание методов, использованных для анализа доказательств:**

При отборе публикаций как потенциальных источников доказательств использованная в каждом исследовании методология изучалась для того, чтобы убедиться в ее валидности. Результат изучения влиял на уровень доказательств, присваиваемый публикации, что, в свою очередь, влияло на силу вытекающих из нее рекомендаций.

Методологическое изучение базировалось на нескольких ключевых вопросах, которые были сфокусированы на тех особенностях дизайна исследований, которые оказывали существенное влияние на валидность результатов и выводов. Эти ключевые вопросы варьировали в зависимости от типов исследований, и применяемых вопросников, используемых для стандартизации процесса оценки публикаций. Была использована методология National Institute for Health and Care Excellence (NICE).

Для исключения влияния на процесс оценки субъективного фактора каждое исследование оценивалось независимо, по меньшей мере, двумя независимыми членами

рабочей группы. Какие-либо различия в оценках обсуждались группой в полном составе. Для достижения консенсуса привлекался независимый эксперт.

- **Методы, использованные для формулирования рекомендаций:**

консенсус экспертов.

- **Индикаторы надлежащей практики (Good Practice Points — GPPs):**

- рекомендуемая доброкачественная практика базируется на клиническом опыте Членов Рабочей группы по разработке рекомендаций.

Уровни убедительности рекомендаций (A-D), уровни достоверности доказательств (1++, 1+, 1-, 2++, 2+, 2-, 3, 4) и индикаторы доброкачественной практики - good practice points (GPPs) приводятся при изложении текста рекомендаций.

- **Метод валидации рекомендаций:**

- Внешняя экспертная оценка;

- Внутренняя экспертная оценка.

- **Описание метода валидации рекомендаций:**

Настоящие рекомендации в предварительной версии были рецензированы независимыми экспертами, которых попросили прокомментировать, прежде всего, насколько интерпретация доказательств, лежащих в основе рекомендаций, доступна для понимания.

Получены комментарии со стороны врачей-бактериологов, пульмонологов, реаниматологов, специалистов первичного звена (участковых терапевтов, педиатров), эпидемиологов в отношении доходчивости изложения рекомендаций и оценки их важности, как рабочего инструмента повседневной практики.

Комментарии, полученные от экспертов, тщательно систематизировались и обсуждались членами рабочей группы.

- **Консультация и экспертная оценка:**

Клинические рекомендации были представлены и одобрены на III Конгрессе «Федерации лабораторной медицины» 12 октября 2017г.

Предварительная версия была выставлена для широкого обсуждения на сайте медицинского профессионального сообщества для того, чтобы лица, не участвующие в конгрессе, имели возможность принять участие в обсуждении и совершенствовании рекомендаций.

Рекомендации были представлены экспертам Ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины» (Ассоциация «ФЛМ»), Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии» (МАКМАХ).

Обсуждены и рекомендованы профильной комиссией по клинической микробиологии и антимикробной резистентности Министерства Здравоохранения Российской Федерации 18 октября 2017г.

Для окончательной редакции рекомендации были повторно проанализированы Членами рабочей группы, которые пришли к заключению, что все замечания и комментарии экспертов приняты во внимание, риск систематических ошибок при разработке рекомендаций сведен к минимуму, рекомендации не противоречат действующим нормативно-правовым актам, направленным на охрану здоровья (ст. 41 Конституции Российской Федерации, Федеральный закон от 21.11.2011 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации») и санитарно-эпидемиологическое благополучие населения (Федеральный закон от 30.03.1999 «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»).

- **Порядок обновления клинических рекомендаций.**

Мониторинг клинических рекомендаций (анализ использования клинических рекомендаций, сбор информации по недостаткам и замечаниям), внесение дополнений и изменений в клинические рекомендации осуществляет ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины» (Ассоциация «ФЛМ»), Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии» (МАКМАХ).

Обновление последней версии клинических рекомендаций осуществляется по мере необходимости, но не реже 1 раза в 3 года. Система ведения клинических рекомендаций предусматривает взаимодействие членов ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины» (Ассоциация «ФЛМ»), Межрегиональной ассоциацией общественных объединений «Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии» (МАКМАХ), Российского респираторного общества, Российского общества медицинских генетиков.

Приложение А3. Связанные документы

Данные клинические рекомендации разработаны с учетом следующих нормативно-правовых документов:

1. Федеральный закон от 30.03.1999 N 52-ФЗ "О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения" (Собрание законодательства Российской Федерации, N 14, ст. 1650; 2002, N 1 (ч. I), ст. 2; 2003, N 2, ст. 167; N 27 (ч. I), ст. 2700; 2004, N 35, ст. 3607; 2005, N 19, ст. 1752; 2006, N 1, ст. 10; 2007, N 1 (ч. I), ст. 21, 29; N 27, ст. 3213; N 46, ст. 5554; N 49, ст. 6070; 2008, N 24, ст. 2801; N 29 (ч. I), ст. 3418);
2. Федеральный закон от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2011 г., № 48, ст. 6724);
3. Федеральный закон Российской Федерации от 29 ноября 2010 г., № 326-ФЗ "Об обязательном медицинском страховании в Российской Федерации»;
4. Приказ Минздравсоцразвития России № 1664н от 27 декабря 2011 г. «Об утверждении номенклатуры медицинских услуг», зарегистрирован в Минюсте 24 января 2012 г., регистрационный № 23010;
5. Приказ Минздрава России от 29 декабря 2012 г. № 1629н «Об утверждении перечня видов высокотехнологичной медицинской помощи»;
6. Международная классификация болезней, травм и состояний, влияющих на здоровье (МКБ – 10);
7. ГОСТ Р 52600 -2006 «Протоколы ведения больных. Общие положения» (Приказ Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 05.12.2006 № 288);
8. ГОСТ ИСО/МЭК 17025. Национальный стандарт Российской Федерации. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.
9. ГОСТ Р 52905 – 2007. Национальный стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Требования безопасности.
10. ГОСТ Р 53079.1-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Правила описания методов исследования.
11. ГОСТ Р 53079.4-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа.

12. ГОСТ Р 53133.1—2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Контроль качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Пределы допускаемых погрешностей результатов измерения аналитов в клинико-диагностических лабораториях.
13. ГОСТ Р 53133.2—2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Оценка качества клинических лабораторных исследований. Часть 2. Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов.
14. ГОСТ Р ИСО 15189 – 2015. Национальный стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
15. Приказ МЗ РФ от 19 января 1995г. № 8 О развитии и совершенствовании деятельности лабораторий клинической микробиологии (бактериологии) лечебно-профилактических учреждений.
16. Приказ МЗ РФ от 20 декабря 2012г. № 1183н Об утверждении номенклатуры должностей медицинских работников и фармацевтических работников.
17. Приказ МЗ РФ от 23 июля 2010 г. № 541н. Единый квалификационный справочник должностей руководителей, специалистов и служащих, раздел Квалификационные характеристики должностей работников в сфере здравоохранения.
18. Приказ МЗ РФ от 25 декабря 1997г. № 380 О состоянии и мерах по совершенствованию лабораторного обеспечения диагностики и лечения пациентов в учреждениях здравоохранения Российской Федерации.
19. Приказ Минздравсоцразвития России от 23 июля 2010 г. № 541н «Об утверждении Единого квалификационного справочника должностей руководителей, специалистов и служащих, раздел «Квалификационные характеристики должностей работников в сфере здравоохранения», зарегистрирован в Минюсте РФ 25 августа 2010 г., регистрационный №18247;
20. СП 1.3.2322-08 Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. (СП 1.3.2322-08 с изм. и доп. 2 июня 2009 г., 29 июня 2011 г.);
21. СП 1.2.036-95 Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности.
22. СанПиН 2.1.7.2790-10 Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами.

23. СанПиН 2.1.3.2630-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность"
24. МР 4.2.0114-16 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Лабораторная диагностика внебольничной пневмонии пневмококковой этиологии.
25. МР МЗ РСФСР от 19.12.1991. Методы бактериологического исследования условно-патогенных микроорганизмов в клинической микробиологии.
26. ФКР от 03.10.2014 «По организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза».
27. Приказ МЗ РФ от 15 ноября 2012 года N 932н «Порядок оказания медицинской помощи больным туберкулезом»
28. Приказ МЗ РФ № 109 от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации».

Приложение А4. Требования к специалистам и вспомогательному персоналу

Уровень компетентности персонала, участвующего в проведении микробиологических исследований, должен соответствовать действующему законодательству и быть подкреплён документально (дипломы, сертификаты, свидетельства и др.) в соответствие с действующей номенклатурой специальностей:

- Специалисты с высшим профессиональным образованием по одной из специальностей «Лечебное дело», «Педиатрия», «Медико-профилактическое дело», «Медицинская биохимия», «Медицинская биофизика», «Медицинская кибернетика», имеющие сертификат специалиста по специальности «Клиническая лабораторная диагностика» и «Бактериология», «Микология» (до истечения срока действия сертификата), «Медицинский микробиолог».
- Специалисты с высшим профессиональным образованием по специальности «Биология», «Биохимия», «Биофизика», «Генетика», «Микробиология», «Фармация» и дополнительным профессиональным образованием в соответствии с направлением профессиональной деятельности «Клиническая лабораторная диагностика» или «Бактериология».
- Специалисты со средним медицинским образованием и наличием сертификата по специальности «Лабораторная диагностика», «Лабораторное дело», «Бактериология».

- **Приложение А5. Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала**

- Медицинский персонал, непосредственно участвующий в проведении микробиологической диагностики хронической респираторной инфекции при муковисцидозе, обязан соблюдать требования Санитарно-эпидемиологических правил
- СП 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней" (с изменениями от 2 июня 2009 г.), а также санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами", СП 1.2.036-95 Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности и другим

нормативным документам, действующим на территории РФ в установленном порядке (Приложение А3).

- Для проведения микробиологической диагностики хронической респираторной инфекции при МВ лаборатории должны быть оснащены материально-техническими ресурсами согласно Приложению А6.

Приложение А 6. Ориентировочный перечень оборудования, реагентов и расходных материалов для микробиологической диагностики

Наименование медицинских изделий, оборудования, мебели	Наименование реактивов и расходных материалов
Базисное оснащение	
Бокс биологической безопасности 2 класса, оснащенный НЕРА-фильтром	Контейнер стерильный с закручивающейся крышкой для взятия, хранения и транспортировки биологических образцов
Микроскоп бинокулярный с иммерсионным объективом	Пробирка стерильная (без наполнителя или с транспортной средой) с аппликатором для взятия биологических образцов
Термостат электрический	Чашки Петри одноразовые стерильные
Паровой стерилизатор для стерилизации питательных сред или автоматическая средоварочная машина	Петли микробиологические диаметром 1 и 10 мкл (стерильные или многоразовые)
Паровой стерилизатор для обеззараживания отработанного материала	Шпатели Дригальского стерильные
СВЧ-печь для утилизации отработанного материала	Стекла предметные
Воздушный стерилизатор	Пипетки пластиковые пастеровские стерильные
Фармацевтический холодильник для хранения готовых питательных сред, биологических субстратов и реагентов	Микропробирка, стерильная
Спиртовые, газовые горелки или стерилизаторы микробиологических петель	Стерильный ватный тампон
Дистиллятор	Наконечники для дозаторов полуавтоматических
Электрическая плита	Пакеты для автоклавирования
Бактерицидные лампы или облучатель-рециркулятор	Набор реагентов для окраски мазков по Граму
Стол лабораторный химический	Иммерсионное масло
Стандарт мутности по МакФарланду или прибор (спектрофотометр) для определения мутности суспензии микроорганизмов	Питательная среда основа кровяного агара для неселективного культивирования прихотливых бактерий
Дозаторы переменного объема полуавтоматические	Кровь (баранья, крупного рогатого скота, лошадиная) дефибрированная для питательных сред, стерильная
Контейнеры для сброса отходов	Реагенты для определения уреазной, каталазной, коагулазной и оксидазной активности

Емкости с дезинфицирующим раствором	Рекомендуемые питательные среды для выделения микроорганизмов
Спирт этиловый 95 ⁰	Флакон с питательной средой для посева стерильного биоматериала (кровь, спинномозговая жидкость и т.д.)
Перчатки нестерильные	Питательная среда Мюллера-Хинтона для постановки антибиотикочувствительности
Маска трехслойная одноразовая	Диски с антибактериальными препаратами для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам
Клип-берет одноразовый лабораторный	
Карандаши восковые, алмазные карандаши, водостойкие фломастеры	Дифференциально-диагностические диски (оптохин, бацитрацин, оксидаза, диски с V,X, X+V факторами и т.д.)
Линейка, штангенциркуль для учета результатов определения чувствительности диско-диффузионным методом	Контрольные штаммы микроорганизмов для проведения контроля качества
Дополнительное оснащение	
Автоматизированное рабочее место (сканер штрих кодов, компьютер с ЛИС, принтер)	Готовые питательные среды в чашках Петри
Анализатор для идентификации по биохимическим свойствам или белковому спектру и/или определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам	Тест-системы для идентификации микроорганизмов
Автоматический прибор для учета результатов определения чувствительности диско-диффузионным методом	Тест-панель для идентификации и определения антибиотикочувствительности микроорганизмов на анализаторе
Инкубатор для микроаэрофильного культивирования (инкубатор CO ₂) или анаэроб-контейнер или газогенерирующие пакеты или эксикатор	Дополнительные реагенты для инокуляции суспензии культур микроорганизмов на тест-панель
Вортекс	Реактивы для проведения биохимической идентификации микроорганизмов на тест – панель
Микроскоп флюоресцентный для лабораторных исследований Стереомикроскоп-лупа	Градиентные полоски E-test для определения чувствительности к антибиотикам
Анализатор культур крови	Система анаэробная для культивирования анаэробных микроорганизмов

Приложение Б. Алгоритмы микробиологической диагностики

Приложение Б1. Техника количественного посева мокроты

При необходимости точного количественного посева часть материала, присланного для исследования, используют для микроскопии, после чего готовят разведение 10^{-1} путем добавления к 1 мл исходного образца 9 мл 0,9% физиологического раствора или 2% пептонной воды. При малом количестве посевного материала делают перерасчет объема растворителя, соблюдая соотношение 1:9. Для гомогенизации полученной взвеси используют перемешивающие устройства типа Вортекс в обычном режиме 1 000 об/мин 30 сек. После гомогенизации из разведения 10^{-1} делают серийные разведения до необходимых концентраций.

Существует несколько способов разведений. Из них чаще используют:

1. Метод последовательных разведений.

Готовят ряд из 4-х пробирок с 9 мл стерильного 0,9% физиологического раствора (2% пептонной водой). Подписывают степени разведения на пробирках: 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} .

- Стерильной пипеткой или стерильным одноразовым наконечником дозатора 1 мл суспензии с биологическим материалом из разведения 10^{-1} переносят в 9 мл 0,9% физиологического раствора (2% пептонной воды). Получают разведение 10^{-2} .

Утилизируют пипетку (наконечник).

- Стерильной пипеткой или стерильным одноразовым наконечником дозатора 1 мл суспензии с биологическим материалом из разведения 10^{-2} переносят в 9 мл 0,9% физиологического раствора (2% пептонной воды). Получают разведение 10^{-3} .

Утилизируют пипетку (наконечник).

- Стерильной пипеткой или стерильным одноразовым наконечником дозатора 1 мл суспензии с биологическим материалом из разведения 10^{-3} переносят в 9 мл 0,9% физиологического раствора (2% пептонной воды). Получают разведение 10^{-4} .

Утилизируют пипетку (наконечник).

- Стерильной пипеткой или стерильным одноразовым наконечником дозатора 1 мл суспензии с биологическим материалом из разведения 10^{-4} переносят в 9 мл 0,9% физиологического раствора (2% пептонной воды). Получают разведение 10^{-5} .

Утилизируют пипетку (наконечник).

2. Метод микроразведений

Готовят ряд из 2-х пробирок с 9,9 мл стерильного физиологического раствора (пептонной водой). Подписывают степени разведения на пробирках: 10^{-3} и 10^{-5} .

- Стерильной пипеткой или стерильным одноразовым наконечником дозатора 0,1 мл суспензии с биологическим материалом из разведения 10^{-1} засевают в 9,9 мл физиологического раствора (пептонной воды). Получают разведение 10^{-3} .

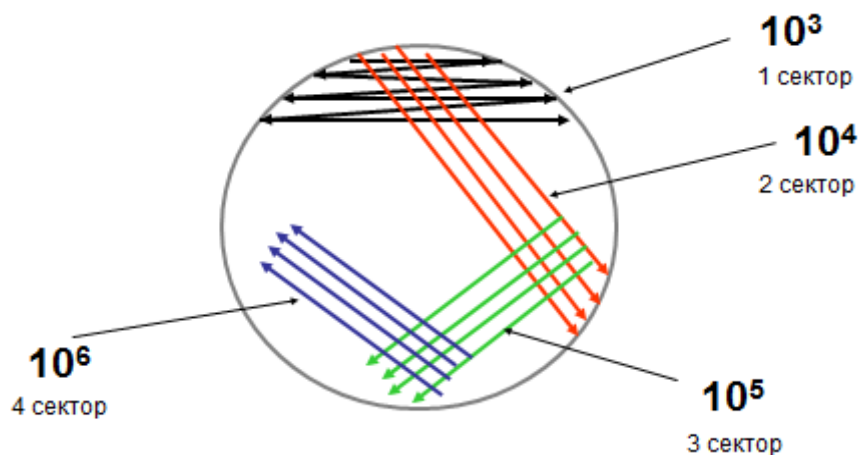
Утилизируют пипетку (наконечник).

- Стерильной пипеткой или стерильным одноразовым наконечником дозатора 0,1 мл суспензии с биологическим материалом из разведения 10^{-3} засевают в 9,9 мл физиологического раствора (пептонной воды). Получают разведение 10^{-5} .

Утилизируют пипетку (наконечник).

Посев на питательные среды из полученных разведений осуществляют в обратной последовательности от большего разведения к меньшему.

Приложение Б2. Метод секторных посевов



Техника посева:

1. Прокаленную и остуженную петлю погружаем в исследуемый образец.
2. В верхней части чашки Петри делаем площадку (сектор 1), плотными штрихами в прямом и обратном направлении. Петлю прокаливаем. Остужаем. Повторного забора материала производить не нужно!
3. Из сектора 1 штрихами проводим рассев в одном направлении (от площадки). Петлю прокаливаем. Остужаем.
4. Из сектора 2 штрихами проводим рассев в одном направлении (от конца штрихов сектора 2). Петлю прокаливаем. Остужаем.
5. Из сектора 3 штрихами проводим рассев в одном направлении (от конца штрихов сектора 3). Петлю прокаливаем. Остужаем.

Интерпретация полученных результатов:

1. Появление видимого интенсивного роста только в 1 секторе оценивается как 10^3 КОЕ, единичные колонии как рост 10^2 и менее.
2. Появление видимого роста во 2 секторе оценивается как 10^4 КОЕ.
3. Появление видимого роста во 3 секторе оценивается как 10^5 КОЕ.
4. Появление видимого роста во 4 секторе оценивается как 10^6 КОЕ. Интенсивный плотный рост в концевых штрихах сектора 4 может оцениваться как $> 10^6$ КОЕ.

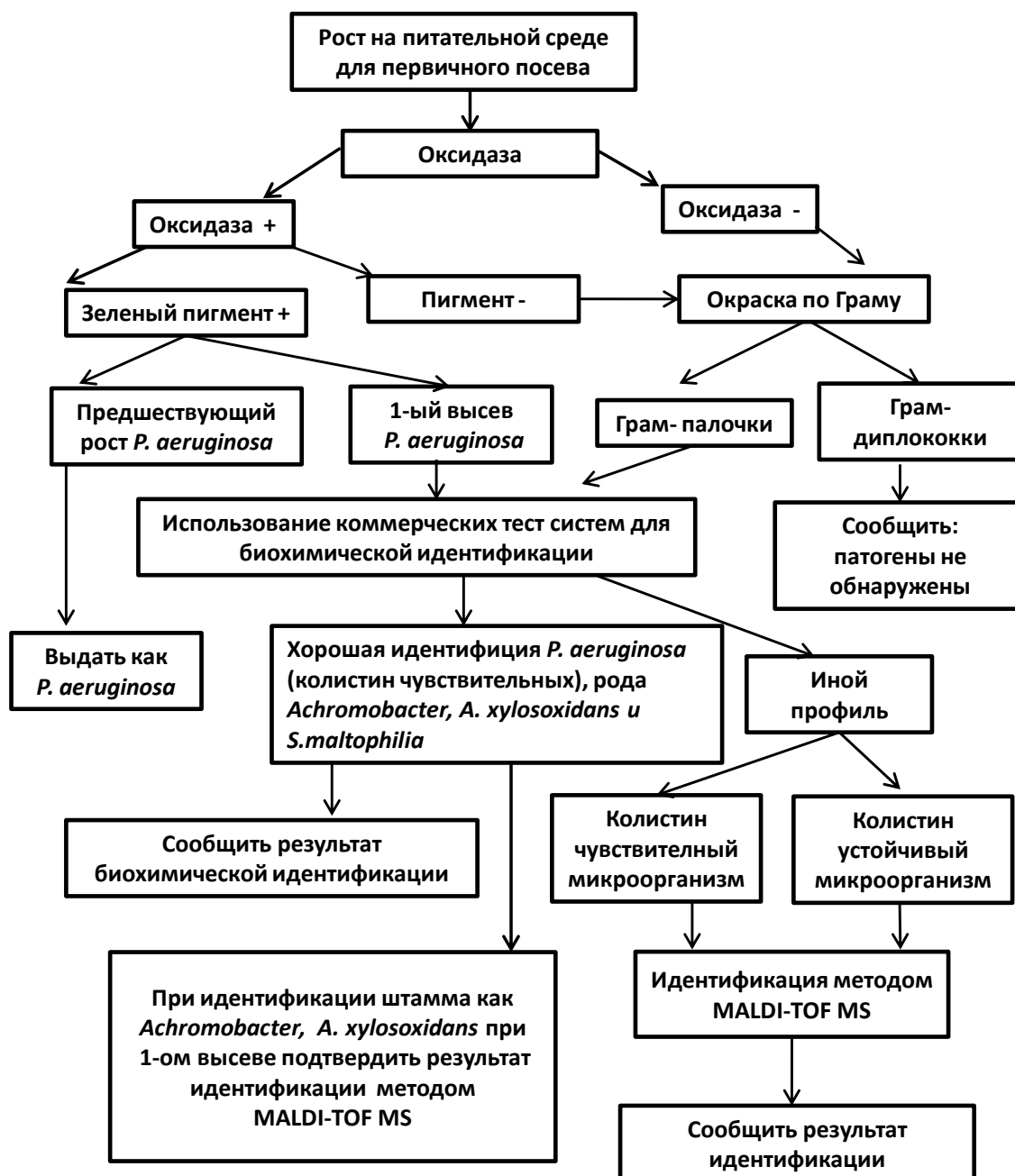
Приложение Б3. Некоторые культуральные и биохимические характеристики клинических штаммов *Pseudomonas fluorescens group*, *Pseudomonas stutzeri group*, *Pseudomonas alcaligenes group*.

	<i>P.aeruginosa</i>	<i>P.fluorescens</i>	<i>P.putida</i>	<i>P.veronii</i>	<i>P.montellii</i>	<i>P.mossellii</i>	<i>P.stutzeri</i>	<i>P.mendocina</i>	<i>P.pseudoalcaligenes</i>	<i>P.alcaligenes</i>	<i>P.luteola</i>	<i>P.oryzihabitans</i>
Оксидаза	99	97	100	100	100	100	100	100	100	96	0	0
Рост на МакКонки	100	100	100	ND ³	ND	ND	100	100	100	96	100	100
Рост на цетримид-агаре	94	89	81(6)	ND	90	100	4	75 (25)	56 (18)	15	0	25 (28)
6%NaCl	65	43	100	ND	0	100 ⁵	80 (16)	100	62 (6)	41	74	62
42°C	100	0	0	0	0	0	69	100	94	V ⁶	94	33
Редукция нитратов	98	19	0	100	0	0	100	100	100	54	62	6
Пиовердин	65	96	93	100	100	100	0	0	0	0	0	0
Пиоцианин	97 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Аргинин дигидролаза	100	97	100	100	100	100	0 ⁴	100	78	12	100	14
Гидролиз мочевины	48 (9)	21 (31)	31 (44)	25	50	ND	33 (22)	50	3	0	26 (38)	77
Гидролиз желатина (инкубация до 7 дней)	82	100	0	13	0	92	0	0	0	0	61	17
Гидролиз ацетамида	100	6 (12)	0	0	0	ND	0	0	ND	ND	ND	ND
Гидролиз эскулина	0	0	0	ND	0	0	0	0	0	0	100	0
Гидролиз крахмала	0	0	0	ND	0	8	100	0	0	0	0	0
Глюкоза ²	97	100	100	100	100	100	96 (4)	100	9	0	100	100
Фруктоза ²	ND	ND	ND	100	100	100	ND	ND	79 (21)	0	ND	ND
Ксилоза ²	90	100	100	100	0	0	93 (7)	75 (25)	18 (12)	0	100	100
Лактоза ²	<1	24	25 (13)	ND	0	0	0	0	0	0	3 (24)	14 (22)
Сахароза ²	0	48	0	100	0	17	0	0	0	0	12	25
Мальтоза ²	<1	2	31	ND	0	17	100	0	0	0	100	97
Маннитол ²	70	53	25	ND	0	75	89 (4)	0	0	0	76 (18)	100
Цитрат Симмонса	95	93	94 (6)	ND	100	100	82 (14)	100	26 (9)	57 (8)	100	97

Примечание:

1. Данные представлены в % позитивных по признаку культур. В скобках процент культур с замедленной реакцией
2. Оксидация/ферментация оценивалась на среде с 1% содержанием углеводов
3. ND – нет данных
4. *P. stutzeri* – подобные грамотрицательные палочки (CDC group36) – положительны по аргинин-дигидролазе
5. Рост при 3 – 5% NaCl, но не при 7%
6. V – вариабельный признак. Большинство штаммов могут расти при 41°C
7. Среда Кинг А

Приложение Б4. Алгоритм микробиологической диагностики *Pseudomonas* и других НГОБ.



Приложение Б5. Характеристика клинических штаммов *B. cepacia* complex, *B. gladioli* и *Pandoraea* spp.

	<i>B. ambifaria</i>	<i>B. anthina</i>	<i>B. arboris</i>	<i>B. cenocepacia</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. contaminans</i>	<i>B. diffusa</i>	<i>B. dolosa</i>	<i>B. lata</i>	<i>B. latens</i>	<i>B. metallica</i>	<i>B. multivorans</i>	<i>B. pseudomultivorans</i>	<i>B. pyrrocinia</i>	<i>B. seminalis</i>	<i>B. stabilis</i>	<i>B. ubonensis</i>	<i>B. vietnamiensis</i>	<i>B. gladioli</i>	<i>Pandoraea</i> spp.
Оксидаза ²	+	+	+	+	+	V	+	+	V	+	+	+	+	V	+	+	+	+	V	V
Рост на МакКонки ³	+	+	+	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+
BCSA ²	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	V
42°C ³	V	V	V	V	V	V	V	+	-	+	+	+	+	V	+	-	V	+	-	V
Желтый пигмент ³	V	-	V	-	V	V	-	-	V	-	V	-	-	V	V	-	-	-	V	-
Коричневый пигмент ³	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-
Гемолиз ⁴	V β	-	V β	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	V β	-	-	-	V β		
Окисление: ⁵ мальтозы ³	+	+	+	V	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
лактозы ²	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	-	-
D-ксилозы ³	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	V	+	-
Сахарозы ²	+	V	V	+	V	+	V	-	V	+	V	-	-	V	V	-	+	+	-	-
Адонитола ³	+	V	+	V	V	+	V	+	V	+	+	+	V	+	+	+	-	-	+	-
Редукция нитрата ^{3,7}	V	V	V	V	-	V	+	+	V	-	-	+	V	V	-	-	V	V	V	V
Лизин декарбоксилаза ²	+	V	V	+	+	+	+	-	+	+	+	V	+	+	V	+	-	+	-	-
Орнитин декарбоксилаза ³	-	-	+	V	V	-	-	-	V	-	-	-	-	V	V	+	-	-	-	-
Гидролиз эскулина ^{3,7}	V	-	-	V	V	V	-	-	V	-	+	-	-	-	V	-	-	-	V	-
Желатиназа ^{3,7}	+	-	+	V	V	+	V	-	V	V	+	-	-	V	+	+	+	-	V	-
PNPG или ONPG ^{2,6}	+	V	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	+	V	-	+	+	V

Примечания:

1.(+) - >90% позитивных штаммов, V – от 10 до 90 % позитивных штаммов, (-) - < 10% позитивных штаммов

2.Количество протестированных клинических изолятов: *B. ambifaria* – 51, *B. anthina* – 24, *B. arboris* – 16, *B. cenocepacia* – 928, *B. cepacia* – 181, *B. contaminans* – 54, *B. diffusa* - 16, *B. dolosa* - 57, *B. lata* - 25, *B. latens* - 6, *B. metallica* - 7, *B. multivorans* - 715, *B. pseudomultivorans* - 11, *B. pyrrocinia* - 85, *B. seminalis* - 19, *B. stabilis* - 73, *B. ubonensis*

- 2, *B.vietnamiensis* – 145, *B. gladioli* – 280, *Pandoraea spp.* – 75 [Manual of clinical microbiology, 11th ed., 2015, стр. 798, ссылки 112, 156, 162, неопубликованные данные LiPuma и D. A. Henry].

4. Гемолиз на кровяном 5% кровяном агаре с эритроцитами барана, β – бета-гемолиз,

5. Реакция окисления регистрировалась в период 2-7 дней инкубации

6. PNPG - p-нитрофенил- β – D-глюкозидаза

7. Данные получены на основании результатов тестирования на API 20NE.

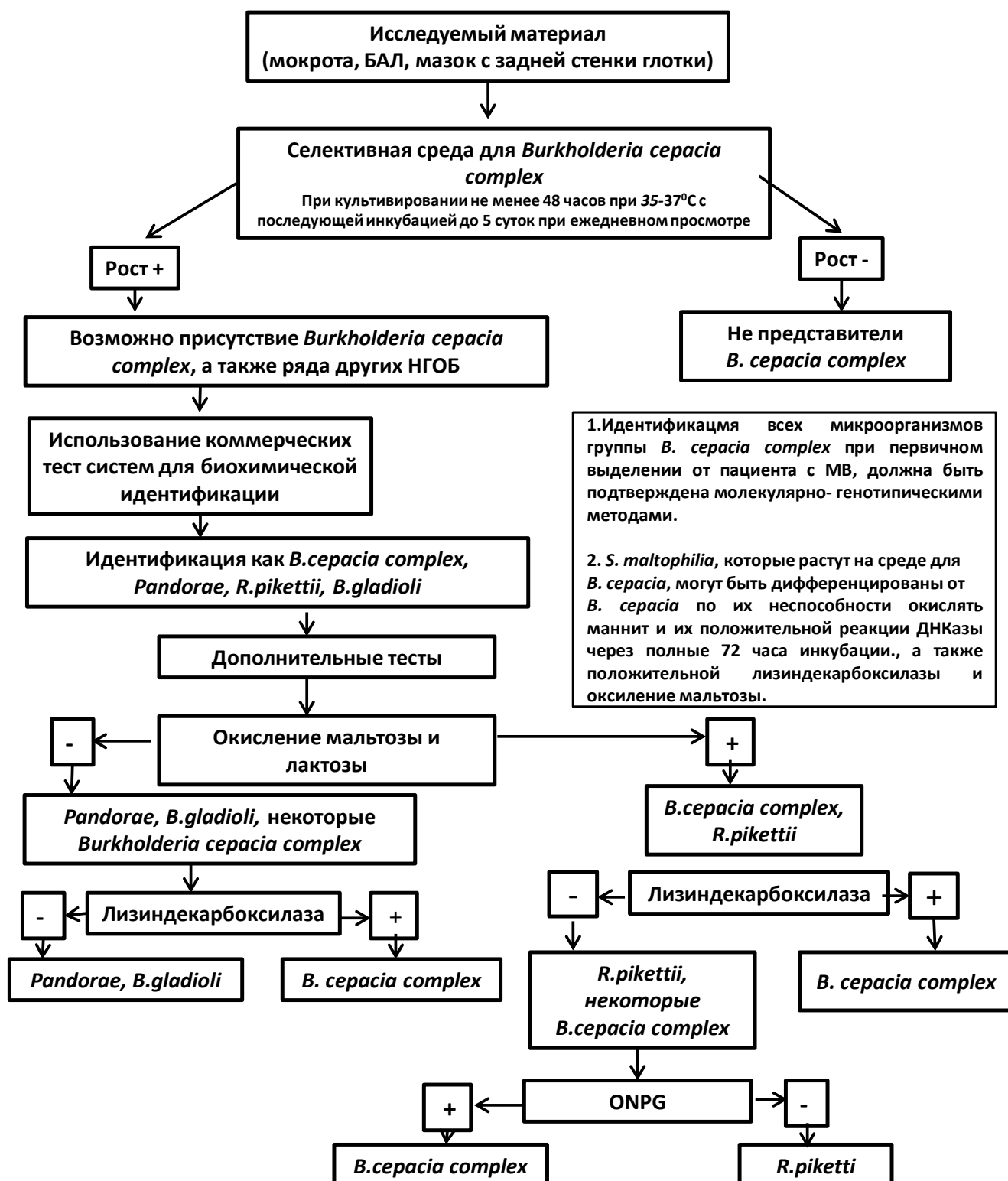
Приложение Б6. Характеристика клинических штаммов *Ralstonia spp.* и *Cupriavidus spp.*

Тест	<i>R. pickettii</i>	<i>R. mannitolilytica</i>	<i>R. insidiosa</i>	<i>C. respiraculi</i>	<i>C. gilardii</i>	<i>C. pauculus</i>
Каталаза	V	+	+	+	+	+
Оксидаза	+	+	+	+	+	+
BCSA	+	+	+	-	-	V
42°C	V	+	ND	ND	+	V
Колистин-резистентность	+	+	ND	ND	ND	-
Редукция нитрата	+	-	+	V	-	-
Гидролиз твин 80	+	+	ND	ND	-	+
Мочевина	+	+	V	-	-	+
Лизин декарбоксилаза	-	-		-	-	-
ONPG	-	V	V	-	V	ND
Окисление: L-арабинозы	+	+	ND	ND	-	-
D-арабитол	-	+	ND	ND	ND	-
Глюкоза	+	+		-	-	-
Инозитол	-	-	ND	ND	ND	-
Лактоза	V	+	V	-	-	-
Мальтоза	V	+	ND	ND	ND	-
Маннитол	-	+	ND	ND	ND	-
Сахароза	-	-	-	-	-	-
Ксилоза	+	+	ND	ND	-	-
Подвижность	+	+	ND	ND	+	+
Жгутики	1 полярный	1 полярный	ND	ND	1 полярный	перитрихии

Примечания:

(+) - >90% позитивных штаммов, V – от 10 до 90 % позитивных штаммов, (-) - < 10% позитивных штаммов [Manual of clinical microbiology, 11th ed., 2015, стр. 798, ссылки 17-20, неопубликованные данные LiPuma]

Приложение Б7. Алгоритм идентификации *B.cepacia complex*.



Приложение Б8. Природная резистентность некоторых НГОБ

НГОБ обладают природной устойчивостью к бензилпенициллину, цефотаксиму, цефомандолу цефуроксиму, гликопептидам, гликопептидам, фузидовой кислоте, макролидам, линкозамидам, стрептограминам, рифампифину, даптомицину, линезолиду

№	Возбудитель	Ампициллин	Амоксициллин/клавулат	Цефтазидим	Цефепим	Пиперациллин/тазобактам	Тикарциллин/клавулат	Аминогликозиды	Фторхинолоны	Карбапенемы: имипенем	Карбапенемы: меропенем	Полимиксин	Ко-тримоксазол	Хлорамфеникол	Тетрациклины (доксикалин)
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R
2	<i>Burkholderia cepacia complex</i>	R	R	S	S	-	R	R ¹	S ²	R ³	S	R ¹	S	R ²	R ²
3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	R ⁵	R ⁵	R ⁵	R ⁵	R ⁵	-	R ⁴	S ⁴	R ⁵	R ⁵	-	S	R	-
4	<i>Acromobacter spp.</i>	R	R	S	S	-	-	R	R	-	-	-	R	-	-

1 – отсутствие локусов для связывания на полисахаридах (клеточной стенки) у штаммов *Burkholderia cepacia complex* является причиной их природной резистентности к аминогликозидам и полимиксинам.

2 - Природно обусловленное снижение проницаемости клеточной мембраны и наличие системы эффлюкса приводит к резистентности к тетрациклинам, хлорамфениколу и ципрофлоксацину in vitro. Однако штаммы *Burkholderia cepacia complex* в виду своей генетической неоднородности демонстрируют переменную чувствительность к фторхинолонам и доксициклину и хлорамфениколу.

3 – Штаммы *Burkholderia cepacia complex* в большинстве случаев устойчивы к имипенему, но при этом чувствительны к меропенему in vitro, что обусловлено различными механизмами формирования резистентности к этим веществам.

4- В подавляющем большинстве случаев изоляты *Stenotrophomonas maltophilia* аминогликозид-ацетил-трансферазу, а также имеют гены SmQnr, экспрессия которых обуславливает снижение чувствительности к фторхинолонам.

5- Хромосомно-кодируемые бета-лактамазы гидролизуют все бета-лактамы соединения, включая карбапенемы

1. Руководство по медицинской микробиологии. Книга 3. Том 1. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика. /Колл.авторов//Составитель А.С.Лабинская, редактор Н.Н. Костюкова. - М.: Издательство БИНОМ. 2013.-752с.:ил.
2. Клинические рекомендации **Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (2015)**
3. http://www.eucast.org/guidance_documents/

Приложение В. Информация для пациентов

Приложение В1 Правила сбора биоматериала для микробиологической диагностики

Правила получения свободно отделяемой мокроты для культурального исследования

1. Для сбора мокроты необходимо использовать стерильные герметично закрывающиеся пластиковые контейнеры.
2. Перед сбором мокроты необходимо попросить пациента тщательно почистить зубы, прополоскать рот кипяченой водой. Если мокрота собирается утром – лучше собирать ее натощак.
3. Пациент должен хорошо откашляться и собрать отделяемое из нижних дыхательных путей (не слюну!) в стерильный контейнер.

Для облегчения процедуры сбора мокроты и повышения качества собираемого образца целесообразно использовать памятки для пациентов.

Для получения индуцированной мокроты можно использовать следующие приемы:

1. Дренажные положения (постуральный дренаж).
2. Упражнения дыхательной гимнастики.
3. Вибрационный массаж грудной клетки.
4. Ультразвуковые ингаляции в течение 15-20 минут с использованием гипертонического раствора хлорида натрия в концентрации 3-7%. У пациентов с бронхиальной астмой ингаляции должны проводиться с осторожностью, для предупреждения бронхоспазма целесообразно предварительно провести ингаляцию 200-400 мкг сальбутамола [8].

Правила получения мазков из глубоких отделов задней стенки глотки

1. Забор материала проводят натощак или через 2 часа после еды стерильным вязким тампоном.
2. Аккуратно прижимая язык шпателем, вводят тампон между дужками миндалин и язычком, не касаясь губ, щек, языка и язычка.
3. Помещают тампон на заднюю стенку глотки, вызывают кашель и после не менее трех кашлевых толчков удаляют тампон, на который были собраны выделения при кашле.
4. Взяв материал, тампон помещают в пробирку с транспортной средой.

Приложение В2. Правила сбора биоматериала для диагностики микобактериальной инфекции

- Основой успешной лабораторной диагностики микобактериальной инфекции является *качественно собранный диагностический материал*, доставленный для исследования с соблюдением сроков (не более 3-х дней) и температурных условий (температура не выше +4 +8°C).
- Для исследования на наличие в материале микобактерий в лабораторию доставляют не менее 5 мл мокроты выделенной утром, после полоскания зева водой, до еды (анализ сдается 3 дня подряд).

Правила сбора мокроты:

Достаточный объем исследуемой порции мокроты составляет 3 - 5 мл. Некоторые больные выделяют микобактерии нерегулярно, поэтому в целях повышения информативности практикуется повторное (до 3 раз) исследование мокроты. Такая тактика позволяет повысить число положительных находок.

При сборе мокроты необходимо иметь в виду, что в момент ее откашливания создается высокий риск воздушно-капельного распространения инфекции.

Сбор мокроты должен производиться в присутствии и при непосредственном участии медицинского работника. Лицам, ответственным за сбор мокроты, необходимо руководствоваться следующими правилами:

- Следует объяснить пациенту причины исследования и необходимость откашливать не слюну или носоглоточную слизь, а содержимое глубоких отделов дыхательных путей, что достигается в результате продуктивного кашля, возникающего после нескольких глубоких вдохов.
- Необходимо предупредить пациента, что он должен предварительно почистить зубы и прополоскать полость рта кипяченой водой, что позволяет механически удалить основную часть вегетирующей в ротовой полости микрофлоры и остатки пищи, загрязняющие мокроту и затрудняющие ее обработку.
- Стоя позади пациента, следует рекомендовать ему держать флакон как можно ближе к губам и сразу же сплевывать в него мокроту по мере ее откашливания. Выделение мокроты усиливается после одного или нескольких глубоких вдохов.
- По завершении сбора мокроты необходимо закрыть флакон крышкой, промаркировать и поместить в контейнер для транспортировки в лабораторию.

Важно! Направление на исследование не должно соприкасаться с контейнером, содержащим мокроту. Полностью заполненное направление помещают в отдельный пакет и транспортируют отдельно от контейнера с мокротой.

