



Association of laboratory
specialists and organizations
«Federation of Laboratory Medicine»

Ассоциация специалистов
и организаций лабораторной службы
«Федерация лабораторной медицины»

127083, Россия, г. Москва, ул. 8 Марта, д.1, стр.12, этаж 3, помещение XXV, комната 11
www.fedlab.ru, info@fedlab.ru

КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Микробиологическая диагностика инфекций, вызванных стрептококком группы В у беременных и новорожденных

Тип клинических рекомендаций:
Правила проведения клинических лабораторных исследований

Москва - 2016

РАЗРАБОТЧИКИ

¹*Ответственный разработчик - Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины»*

²*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦАГиП им. В.И.Кулакова» Минздрава России)*

³*Государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинского менеджмента Департамента здравоохранения города Москвы» (ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ»)*

⁴*Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи*

⁵*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации*

^{1,2,3} Мелкумян А.Р., ^{1,5} Припутневич Т.В., ¹Кочетов А.Г., ^{1,2}Любасовская Л.А., ²Анكيرская А.С., ²Дубоделов Д.В., ²Родченко Ю.В., ²Муравьева В.В., ^{1,4}Тартаковский И.С., ^{1,3}Цибин А.Н., ⁵Кафарская Л.И., ⁵Ефимов Б.А., ²Зубков В.В., ²Рюмина И.И., ²Шмаков Р.Г., ²Павлович С.В., ²Кан Н.Е., ²Тютюнник В.Л., ²Сухих Г.Т.

РЕЦЕНЗЕНТЫ

Савичева Алевтина Михайловна - заведующий лабораторией микробиологии ФГБНУ «Научно-исследовательского института акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта», доктор медицинских наук, профессор, г. Санкт-Петербург.

Алиева Елена Васильевна - профессор кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом бактериологии ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, главный внештатный бактериолог Ставропольского края, доктор медицинских наук, профессор, г. Ставрополь.

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Настоящие клинические рекомендации устанавливают единые требования к выполнению микробиологической диагностики инфекций беременных и новорожденных, вызванных β - гемолитическим стрептококком группы В (*Streptococcus agalactiae*) для медицинских организаций Российской Федерации, имеющих лицензию по специальностям «Акушерство и гинекология», «Неонатология», «Педиатрия», «Клиническая лабораторная диагностика», «Бактериология».

Рекомендации обсуждены на II Российском конгрессе лабораторной медицины в городе Москве 14 октября 2016 года.

Представлены от Ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины».

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АБП	– Антибактериальные препараты
АМП	– Антимикробные препараты
ВИЧ	– Вирус иммунодефицита человека
ДДМ	– Диско-диффузионный метод
ДНК	– Дезоксирибонуклеиновая кислота
ИМП	– Инфекции мочевыводящих путей
ИХТ	– Иммунохроматографический тест
КОЕ	– Колониеобразующая единица
КСГ	– Клинико-статистические группы заболеваний
МКБ - X	– Международная классификация болезней X пересмотра
МПК	– Минимальная подавляющая концентрация
МУК	– Методические указания
ПЦР - РТ	– Полимеразная цепная реакция в режиме «реального времени»
СГВ	– Стрептококки группы В
СГВ-бактериурия	– Бактериурия, вызванная стрептококками группы В
СГВ-инфекции	– Инфекции, вызванные стрептококками группы В
СГВ-сепсис	– Сепсис, вызванный стрептококками группы В
СОП	– Стандартные операционные процедуры
САМР-тест	– тест, основанный на феномене усиления гемолитического действия контрольного штамма <i>Staphylococcus aureus</i> в присутствии гемолизинов других

САМР-фактор	<p>бактерий</p> <p>– продуцируемая стрептококками фосфолипаза, которая совместно с бета - гемолизином, продуцируемым некоторыми штаммами <i>Staphylococcus aureus</i>, лизирует эритроциты</p>
<i>EUCAST</i>	<p>– <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing</i></p> <p>Европейский комитет по тестированию антимикробной чувствительности</p>
<i>GBS</i>	– <i>Group B streptococcus</i>
<i>MALDI-TOF-MS</i>	<p>– <i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass-Spectrometry</i> (Матрично-активированная лазерная десорбционная/ионизационная времяпролетная масс-спектрометрия)</p>
<i>POCT</i>	<p>– <i>Point-of-care testing</i></p> <p>тесты по месту лечения</p>

УРОВЕНЬ ДОКАЗАТЕЛЬНОСТИ РЕКОМЕНДАЦИЙ

Доказательной базой для рекомендаций явились публикации, вошедшие в Кохрейновскую библиотеку, базы данных PubMed, EMBASE и MEDLINE, электронную библиотеку (www.e-library.ru). Глубина поиска составила 40 лет. Клинические рекомендации созданы на основе согласованного мнения членов ассоциации специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины», Российского общества акушеров-гинекологов, Российского общества неонатологов, а также обобщения опыта авторов, их отечественных и зарубежных коллег и апробированных рекомендаций, действующих в настоящее время в США [1], Канаде [2], Великобритании [3], Швеции [4].

Оценка уровня доказательности и значимости рекомендаций производилась в соответствии с данными, изложенными ниже.

Оценка уровня доказательности

Уровень рекомендаций	Определение	Применение
A	Убедительные доказательства эффективности и существенной клинической пользы	Настоятельно рекомендуется
B	Сильные или умеренные доказательства эффективности, ограниченные клинические преимущества	Как правило, рекомендуется
C	Недостаточные доказательства эффективности или эффективность незначима по сравнению с возможными неблагоприятными последствиями	Необязательно к исполнению
D	Умеренные доказательства эффективности или эффективность незначима по сравнению с возможными неблагоприятными последствиями	Как правило, не рекомендуется

Качество доказательности рекомендации

I	Данные рандомизированных контролируемых клинических исследований или строго разработанных экспериментальных лабораторных исследований, выполненных независимыми исследователями
II	Данные хорошо спроектированных клинических исследований без рандомизации, когорты или случай-контроль аналитических исследований (предпочтительно из более чем одного центра), многочисленные исследования, результаты неконтролируемых исследований или некоторые доказательства из лабораторных экспериментов
III	Данные на основе мнений авторитетных специалистов, основанные на клинических или лабораторных опытах, описательных исследований или отчетов экспертных комиссий

Уровни доказательности рекомендаций приводятся при изложении текста ниже.

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Введение.....	9
1.1.Этиология.....	11
1.2.Эпидемиология.....	13
2. Клинические формы инфекций, вызванных стрептококком группы В	16
2.1. Профили клинико-статистических групп заболеваний	18
2.2. Коды МКБ-Х.....	19
3.Требования к обеспечению выполнения лабораторного исследования.....	19
3.1.Требования к специалистам и вспомогательному персоналу	19
3.2.Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала.....	20
3.3.Требование к материально-техническому обеспечению выполнения исследований	20
4.Сбор, хранение и доставка образцов биологического материала.....	21
4.1.Особенности сбора проб у разных категорий пациентов	22
5. Методы лабораторной диагностики <i>Streptococcus agalactiae</i>	25
5. 1.Идентификация <i>Streptococcus agalactiae</i> на основе морфологических и биохимических свойств	26
5.2. Идентификация <i>Streptococcus agalactiae</i> с применением молекулярно-генетических методов	28
5.3.Идентификация <i>Streptococcus agalactiae</i> с применением время-пролетной масс-спектрометрии (<i>MALDI-TOF MS</i>).....	28
5.4.Идентификация <i>Streptococcus agalactiae</i> с применением тестов по месту лечения (<i>Point-of-care testing</i>)	29
6. Определение чувствительности к антимикробным препаратам <i>Streptococcus agalactiae</i>	31
6.1. Методы определения чувствительности <i>Streptococcus agalactiae</i> к антимикробным препаратам	31
7. Алгоритм применения различных методов лабораторной диагностики <i>Streptococcus agalactiae</i>	33
8. Хранение штаммов <i>Streptococcus agalactiae</i>	34
9. Контроль качества лабораторных исследований.....	34
9.1. Внутрилабораторный контроль качества исследования	34
9.2. Внешняя оценка качества исследования	36
Список литературы	37
Приложения	50

1. ВВЕДЕНИЕ

Стрептококк группы В (СГВ, GBS, *Streptococcus agalactiae*) вызывает тяжело протекающие заболевания у новорожденных детей и представляет опасность для определенных пациентов других возрастных групп.

Неонатальные инфекции, вызванные стрептококком группы В, остаются в центре внимания многих специалистов в области перинатальной медицины. Ранние СГВ-септицемии и пневмонии новорожденных отличаются тяжелым течением и высокой летальностью, что обратило на себя внимание ещё в 70-е годы прошлого века, когда в развитых странах СГВ вытеснил грамотрицательные бактерии с первых позиций в этиологической структуре неонатальных инфекций. С тех пор прошли десятилетия, но ведущая роль СГВ в структуре бактериальных перинатальных инфекций остается незыблемой, несмотря на предпринимаемые лечебные и профилактические мероприятия. СГВ-инфекции новорожденных относятся к плохо управляемым инфекциям [5].

В подавляющем большинстве случаев новорожденные инфицируются СГВ во время родов от матери, причем чаще это происходит при вагинальном родоразрешении [1, 6]. Риск заболевания доношенного ребенка составляет 1-2% [1,6,7], недоношенного – 15-20%, а при сроке гестации менее 28 недель – практически 100% [8,9]. СГВ вызывает ранние неонатальные инфекции, такие как сепсис, менингит, пневмония, остеомиелит, артрит и пиелонефрит, частота которых в разных странах колеблется от 0,2 до 5 и более на 1000 живорожденных детей [6, 10].

В акушерской практике со стрептококком группы В связывают бактериемию, инфекции мочевых путей, хориоамнионит, преждевременное излитие околоплодных вод, преждевременные роды, послеродовой эндометрит и др. [8, 11-18].

По данным ФГБУ «НЦАГиП им. В.И. Кулакова» Минздрава России частота тяжелых СГВ-инфекций у новорожденных (сепсис, менингит, пневмония) с ранним началом, за период 1997 – 2013 г.г. имела отчётливую

тенденцию к снижению. Показатель составлял в 1997 году 3,53/на 1000 живорожденных, летальность - 60%. К 2006 году заболеваемость снизилась до 0,46 ‰. С 2008 г. по 2013 г. отмечен подъём заболеваемости до 1,14 - 2,14‰. Сравнительно высокие показатели заболеваемости СГВ-инфекциями объясняются сосредоточением в Центре значительной доли беременных высокого риска, большим числом преждевременных родов, а начиная с 2008 года выхаживанием детей, родившихся с очень низкой и экстремально низкой массой тела. Что касается частоты вагинального носительства, то выявление его в различных группах женщин, варьировало от 8 -10% у небеременных женщин и до 13-25% у беременных с различной степенью риска инфекционной патологии, достигая наивысших показателей при невынашивании беременности [5].

На основании четырехлетнего мониторинга в Городском клиническом перинатальном центре города Омска выявлено носительство *S. agalactiae* у 6-8% пациенток различных категорий. Отмечается, что перинатальное инфицирование СГВ недоношенных новорожденных с низкой массой тела при рождении в 50% случаев приводит к клинической манифестации генерализованного инфекционного процесса, а инфицирование доношенных новорожденных - в половине случаев к развитию локальных гнойно-воспалительных процессов [19].

В ГБУ «НИИОЗММ ДЗМ» проведен ретроспективный анализ распространенности СГВ среди новорожденных пяти родильных домов города Москвы. По результатам микробиологического исследования 4534 проб клинического материала от 2265 новорожденных групп высокого инфекционного риска развития СГВ в среднем выделен у 4,9%. В ряде родильных домов отмечен низкий уровень выявления СГВ вследствие отсутствия целенаправленной диагностики, с применением хромогенных сред или ПЦР детекции *S. agalactiae* [20].

В США, Канаде и странах Европы приняты регламентированные Национальные программы профилактики и лечения СГВ-инфекций,

обязательные для выполнения всеми медицинскими учреждениями [1-4]. В России отсутствует официальная регистрация СГВ-инфекций и нет клинических рекомендаций по их профилактике [5]. Действующие нормативные документы по оказанию медицинской помощи по профилю «Акушерство и гинекология» [21,22] регламентируют проведение антибиотикопрофилактики в родах при выявлении стрептококка группы В, но не определяют алгоритм и методы диагностики колонизации и/или инфекции, вызванных СГВ. Отсутствие клинических и лабораторных стандартов диагностики на СГВ-инфекции и её регистрации у беременных и новорожденных не даёт представлений о реальной значимости этой проблемы в нашей стране.

Внедрение современных методов лабораторной диагностики и программы профилактики СГВ – инфекций позволит добиться стойкого снижения заболеваемости среди новорожденных детей, беременных и родильниц.

1.1. Этиология

Streptococcus agalactiae входит в состав бактерий рода *Streptococcus* и является единственным представителем стрептококков группы В по классификации Р. Лендсфилд. СГВ - грамположительные кокки, образующие цепочки переменной длины. По типу дыхания СГВ являются факультативными анаэробами. Типичные штаммы слабо лизируют *in vitro* эритроциты жвачных животных (гемолиз типа β), что стало основой для отнесения бактерии к бета-гемолитической группе стрептококков. Однако, 25-30% штаммов атипичны по данному признаку и проявляют α -гемолиз или не обладают выраженными гемолитическими свойствами.

СГВ образует два типа полисахаридных антигенов: группоспецифический, который является общим для всех штаммов, интегрированный в стенку бактерии, и капсульные. Выявление первого позволяет дифференцировать бактерию от стрептококков других групп, а по

капсульным антигенам штаммы бактерии делят на 10 известных в настоящее время серотипов (Ia, Ib, II-IX). Дополнительными идентификационными маркерами разных вариантов СГВ служат поверхностные антигены α , β и Rib. С их помощью дифференцируют серотипы, имеющие одинаковый капсульный антиген (например, Ia и Ib). Серотипирование СГВ проводят иммунологическими методами (иммуноэлектрофорез, иммунопреципитация, иммунофлюоресценция, иммуноферментный анализ, коаггутинация, капиллярная преципитация, агглютинация, латекс-агглютинация). К сожалению, наборы для серотипирования СГВ в Российской Федерации недоступны, но в последние годы отечественные производители молекулярно-генетических тестов интенсивно разрабатывают тест-системы ПЦР в режиме реального времени для определения серотипов и сиквенс-типов *S. agalactiae*. Из иммунологических методов в рутинной практике чаще используют метод латекс-агглютинации. Часть штаммов СГВ не удается серотипировать, что обусловлено наличием пока неизвестных капсульных антигенов и механизмов, регулирующих их экспрессию. В эпидемиологических целях для типирования штаммов *S. agalactiae* применяют молекулярно-генетические методы (ПЦР, ПЦР с рассеянными затравками, риботипирование, IS-типирование, пульс-электрофорез и др.).

СГВ в организме человека могут колонизировать ротоглотку, анальную область прямой кишки, влагалище (чаще преддверие влагалища), уrogenитальный тракт, кожу. Наличие у части штаммов СГВ дополнительных факторов вирулентности делает их инвазивными, способными вызывать сепсис, поражать разные ткани и органы (легкие, головной мозг, суставы и др.). Инвазивность штаммов и их адаптация к определенным возрастным группам людей коррелирует с их принадлежностью к ряду серотипов и генотипов, определение которых предоставляет информацию для предварительной оценки клинической и эпидемиологической опасности выделяемых от пациентов бактерий [23-25].

Из числа экскреторных факторов наибольшее значение имеет β -гемолизин/цитолизин, вызывающий повреждение клеток, в том числе эритроцитов, и индуцирующий нарушения функционального состояния сердца и печени, способствующий проникновению бактерии через эпителиальные барьеры и развитию сепсиса, препятствующий фагоцитозу бактерии. Важен также CAMP-фактор: его патогенетическое значение не доказано, но он является дифференцирующим маркером культур *S. agalactiae* и *S. pyogenes*.

СГВ проявляет стабильную чувствительность к пенициллину и другим β -лактамам антибиотикам. В последние годы значительно возросла резистентность *S. agalactiae* к линкозамидам и макролидам (во многих странах частота выделения устойчивых к клиндамицину штаммов достигла 13-20%, а к эритромицину — 25-32%). Особенно часто устойчивыми к эритромицину оказываются штаммы, относящиеся к V серотипу. Многие из них проявляют устойчивость к обоим упомянутым антибиотикам [26]. Нередка устойчивость к тетрациклинам, причем в ряде случаев она сочетается с резистентностью к макролидам, линкозамидам и хлорамфениколу. До 2003 года резистентность *S. agalactiae* к фторхинолонам не регистрировали. В последующий период в Японии и США выделили штаммы СГВ с высоким уровнем устойчивости к широкому спектру фторхинолонов. Обнаруженные в Японии штаммы относились к серотипу Ib [26,27].

1.2. Эпидемиология

S. agalactiae распространен повсеместно. Природный резервуар бактерии обширен и включает различные виды млекопитающих (человек, обезьяна, крупный рогатый скот, верблюд, лошадь, дельфин, собака, кошка, хомяк, мышь), птиц (курица) и холоднокровных животных (лягушки, рыбы, ящерицы). Инфекция может передаваться от животных человеку, но большинство выделяемых от людей штаммов бактерий циркулируют среди

населения, минуя зоонозный резервуар. Различия между штаммами бактерий, выделяемыми от людей и сельскохозяйственных животных достаточно велики, что указывает на наличие нескольких самостоятельных эковаров агента, патогенных для основных хозяев.

СГВ является комменсалом микробиоты кишечника человека. Колонизируя дистальную часть прямой кишки, СГВ периодически распространяются и на другие локусы (влагалище, урогенитальный тракт, кожу и пр.). У большей части инфицированных взрослых людей колонизация протекает бессимптомно в виде здорового носительства.

Установлено, что СГВ у 20-40% женщин можно обнаружить во влагалище и часто в уретре их половых партнеров. Показана достоверная связь носительства СГВ во влагалище не только с ранними септицемиями новорожденных, но и с самопроизвольными выкидышами, преждевременными родами, преждевременным излитием околоплодных вод, мочевиной инфекцией у беременных, рождением детей с низкой массой тела, развитием хориоамнионита в родах, эндометритом и сепсисом у родильниц [28-30]. Однако связь акушерской патологии и СГВ-носительства оказалась далеко не прямолинейной. Носительство СГВ во влагалище не является постоянным и чаще всего носит интермиттирующий характер. Наиболее высок уровень колонизации у женщин репродуктивного возраста и беременных женщин [31-33]. У беременных СГВ выделяют из перечисленных областей в 7-30% случаев (чаще у молодых, имеющих высокую половую активность или пользующихся внутриматочными средствами контрацепции). Из них 60-75% остаются СГВ-носителями до конца беременности. Обследование во время беременности не дает адекватного прогноза о возможности колонизации родовых путей во время родов. И хотя контаминация плода в родах происходит у каждой второй роженицы – носительницы СГВ, только у 2-5% инфицированных новорожденных развиваются тяжелые формы СГВ-инфекций с летальностью 20-70% [34] и высокими показателями при преждевременных родах. Тяжелые

инфекции ассоциированы с длительными родами и ранним разрывом плодных оболочек. Чаще всего СГВ-сепсис регистрируют у новорожденных, рожденных матерями с высокой степенью колонизации влагалища, тем не менее, около 30% неонатального СГВ-сепсиса регистрируют при низких титрах СГВ в родовых путях [35]. Механизм заражения плода всегда связан с восходящим из влагалища инфицированием околоплодных вод, размножением и накоплением в них СГВ. Заражение плода происходит при заглатывании и аспирации инфицированных околоплодных вод. Однако, возможно инфицирование плода через неповрежденные оболочки – интраканаликулярно [36, 37].

Эпидемиология поздней формы болезни детей мало изучена. Предполагают, что она возникает в результате передачи возбудителя, как во время родов, так и в последующий период и в половине случаев связана с отсроченным началом развития заболевания при заражении от матери в родах, либо с горизонтальным путем передачи от инфицированных медицинских работников в стационаре или взрослого во внебольничной среде [1,15].

Мониторинг распространения серотипов СГВ на определенных территориях среди разных групп населения важен в прогностическом отношении и для правильной интерпретации результатов бактериологических исследований, а также для разработки вакцины с оптимальным антигенным составом для определенной популяции населения. В 80-ые годы прошлого века в ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д. О. Отта» проведена работа по изучению циркуляции серотипов СГВ беременных женщин, новорожденных детей и медицинского персонала акушерского стационара Северо-Западного региона России. Среди обслуживающего персонала клиник преобладали штаммы Ia, III и III/R. У новорожденных чаще выделяли IIc, Iac, Ibc серотипы. Было выявлено 18 типовых комбинаций антигенов стрептококка [38]. В Московском регионе преобладали серотипы Iac и Ibc, зафиксировано 15 комбинаций типовых

антигенов стрептококка [39]. Официальная статистика распространенности серотипов СГВ в Российской Федерации отсутствует.

В настоящее время в мире отсутствует вакцина против СГВ – инфекций, хотя интенсивно идут разработки в разных странах мира [40-45].

2. КЛИНИЧЕСКИЕ ФОРМЫ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫЕ СТРЕПТОКОККОМ ГРУППЫ В

В зависимости от сроков манифестации различают две формы клинического проявления инфекции у новорожденных: раннюю и позднюю. Их симптоматика неспецифична.

Ранняя форма в 90% случаев проявляется в первые 12 часов после рождения ребенка. В подавляющем большинстве случаев развиваются сепсис и/или пневмония, реже гнойный менингит или менингоэнцефалит, чаще у недоношенных детей, спорадически проявляются поражения других органов.

Выраженность клинических проявлений ранней формы СГВ-инфекции варьируема. У недоношенных детей возможно молниеносное течение заболевания, сопровождающееся септическим шоком, респираторным дистресс-синдромом и летальным исходом, наступающим в течение нескольких часов.

Пневмония сопровождается дыхательной недостаточностью вплоть до персистирующей легочной гипертензии. Нарушения дыхания проявляются уже в первые часы после рождения ребенка.

Начальная стадия менингита нередко остается незамеченной из-за слабой выраженности и вариативности клинических нарушений, ассоциированных с поражением центральной нервной системы.

Поздняя форма инфекций новорожденных проявляется в период 2-12 недель жизни, реже в возрасте до 6 месяцев. У 80-85% заболевших детей она проявляется менингитом, реже сепсисом, остеомиелитом и/или септическим артритом, спорадически этмоидитом, лимфаденитом, конъюнктивитом,

эндокардитом, эпиглоттитом, эмпиемой, некротизирующим фасциитом и токсическим шоком.

У беременных женщин инфекция может сопровождаться воспалительными заболеваниями мочевыводящих путей, хориоамнионитом, эндометритом, ассоциированной с кесаревым сечением раневой инфекцией.

Бессимптомная бактериурия у беременных женщин

Бактериурия обнаруживается в моче 2-7% беременных женщин [46-50]. СГВ - бактериурия у беременной маркер массивной колонизации родовых путей, связана с повышенным риском ранних СГВ - инфекций новорожденных [46-49] и поэтому является абсолютным показателем для антибиотикопрофилактики в родах даже при низких концентрациях возбудителя в моче (С III) [54,55].

Факторы, сочетающиеся с инфицированием плода (новорожденного) [11, 56-65]:

- преждевременные роды (АII);
- повышение температуры тела у роженицы выше 38°C (АII);
- безводный промежуток более 18 часов (критический период 24 часа);
- низкая масса тела, недоношенность (рост заболеваемости СГВ-инфекцией увеличивается в 7-15 раз);
- инфицированность плаценты и/или амниотической жидкости (хориоамнионит, внутриматочная инфекция).

Прогностические маркеры инфицирования плода (новорожденного) во время беременности (родов):

- анамнестические факторы риска: в анамнезе дети, рожденные с признаками заболевания, вызванного СГВ (АII) [66-69].
- СГВ в моче во время настоящей беременности (маркер высокого риска колонизации плода) (АIII) [31,33,46,48,65].

- интактные плодные оболочки и родоразрешение путем операции кесарева сечения не исключают инфицирования новорожденного (СП) [70,71].

Риск передачи СГВ новорожденному:

- при инфицировании матери составляет 42-72%.
- примерно 2/3 колонизированных новорожденных от матерей с выявленным СГВ будут бессимптомными носителями [72].
- на каждые 100 инфицированных доношенных новорожденных приходится один случай тяжелой СГВ-инфекции, в сроки гестации 28-37 недель – 15-20% случаев на 100 новорожденных и при сроке менее 28 недель беременности – может достигать 100% [8].
- потенциальным источником СГВ-инфекции может являться не только мать ребенка, но и медицинский персонал (в 16-47% случаев) [72].

-

2.1. Профили клинико-статистических групп заболеваний

Акушерство и гинекология

- Осложнения, связанные с беременностью
- Беременность, закончившаяся абортным исходом
- Родоразрешение
- Осложнения послеродового периода
- Послеродовой сепсис
- Воспалительные болезни женских половых органов

Инфекционные болезни

- Сепсис, дети
- Другие инфекционные и паразитарные болезни, дети

Неонатология

- Малая масса тела при рождении, недоношенность
- Крайне малая масса тела при рождении, крайняя незрелость

- Лечение новорожденных с тяжелой патологией с применением аппаратных методов поддержки или замещения витальных функций.

2.2. Клинические шифры, согласно МКБ-Х

- О 60 – преждевременные роды
- О 42 – преждевременный разрыв плодных оболочек
- О 42.0 – преждевременный разрыв плодных оболочек, начало родов в последующие 24 часа
- О 42.2 – преждевременный разрыв плодных оболочек, задержка родов, связанная с проводимой терапией
- О 42.9 – преждевременный разрыв плодных оболочек, неуточненный
- А 40 – стрептококковая септицемия

3.ТРЕБОВАНИЯ К ОБЕСПЕЧЕНИЮ ВЫПОЛНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Требования к специалистам и вспомогательному персоналу

Уровень компетентности персонала, участвующего в проведении исследований, должен соответствовать действующему законодательству и быть подкреплен документально (дипломы, сертификаты, свидетельства и др.) в соответствие с действующей номенклатурой специальностей [73-75]:

- Специалисты с высшем 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».
- 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».

Выполнение исследований по месту лечения (*Point-of-care testing*) по выявлению стрептококков группы В может быть выполнено клиническими специалистами с высшим и средним медицинским образованием согласно ГОСТ Р ИСО 22870-2009 [76].

3.2. Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала

Медицинский персонал, непосредственно участвующий в проведении исследования в лаборатории, обязан соблюдать требования по безопасности труда при работе в клинико-диагностической лаборатории и бактериологической лаборатории при работе с микроорганизмами III-IV групп патогенности. В лаборатории должны соблюдаться правила биологической безопасности, правила сбора и утилизации отходов, правила по охране труда при работе в лаборатории [77-83].

Все сотрудники должны выполнять инструкции и правила техники безопасности, изложенные в технических паспортах к электрическим приборам, используемым в работе; персонал, работающий с реактивами, должен быть обучен обращению с ними, использовать средства персональной защиты, соблюдать правила личной гигиены.

3.4. Требование к материально-техническому обеспечению выполнения исследований

Лабораторная служба медицинских организаций должна иметь санитарно-эпидемиологическое заключение для работы с микроорганизмами

III-IV групп патогенности и медицинскую лицензию на выполнение видов работ по специальностям «Клиническая лабораторная диагностика», «Лабораторная диагностика», «Бактериология» и «Бактериология» на доврачебном этапе [79]. Организация помещений, требования к оборудованию и правила работы в лаборатории должны соответствовать действующим нормативно-правовым документам, регламентирующим деятельность клиничко-диагностических и бактериологических лабораторий учреждений здравоохранения [77-80].

Сбор, временное хранение, обеззараживание и транспортировка потенциально опасных отходов, образующихся в процессе выполнения технологии, должна проводиться в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами [83]. Отходы класса Б, потенциально содержащие микроорганизмы, подлежат обязательному обеззараживанию (дезинфекции)/обезвреживанию. Вывоз и обезвреживание отходов должно производиться аккредитованной организацией.

Для проведения микробиологической диагностики инфекции, вызванных стрептококком группы В, лаборатории должны быть оснащены материально-техническими ресурсами согласно приложению 1.

4. СБОР, ХРАНЕНИЕ И ДОСТАВКА ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Для выявления колонизации влагалища беременных стрептококком группы В проводится сбор вагинально-ректальных мазков. Во всех остальных случаях забирается биоматериал только при наличии клинических признаков инфекции.

Весь биологический материал, поступающий в лабораторию, должен быть правильно промаркирован и/или штрих-кодирован. С пробами доставляются направления. В направлении указывают фамилию, имя, отчество пациента, пол, возраст или дату рождения, № истории болезни/амбулаторной карты, срок беременности, наименование образца

(вагинально-ректальный мазок, кровь, спинномозговая жидкость, моча и пр.), вид лабораторного исследования (посев, ПЦР-РТ, экспресс-тест на СГВ), предварительный клинический диагноз, применяемые антимикробные препараты, фамилия и инициалы назначившего исследование врача [1, 80, 84- 86]. Сбор проб, хранение и транспортировка биоматериала определяется в каждом конкретном случае с учетом симптоматики заболевания в соответствии с МУК 4.2.2039-05 [84] и ГОСТ Р 53079.4-2008 [85].

4.1. Особенности взятия проб у разных категорий пациентов

Беременные женщины

В плановом порядке с целью выявления колонизации беременных СГВ проводят сбор вагинально-ректальных мазков беременным женщинам из группы риска в соответствии с прогностическими маркерами инфицирования плода (новорожденного) во время беременности (АИ) [1,86]. Взятие образцов проводят в амбулаторно-поликлинических учреждениях, отделениях родовспомогательных стационаров или беременными женщинами самостоятельно, после предварительного информирования о порядке взятия в устной или письменной форме. Стерильный тампон вводят круговыми движениями по стенке влагалища, затем тот же тампон вводят в анальное отверстие на расстояние 1,5-2 см.

Пробу доставляют в лабораторию в кратчайшие сроки для выполнения исследования. При необходимости длительного хранения используют транспортные среды: стерильная пробирка с пластиковым аппликатором со средой Эймса (Amies), Стюарта (Stuart) или с селективным Lim бульоном. При использовании транспортных сред Эймса и Стюарта, сроки хранения составляют 24-48 часов при 2-8° С. Для обогащения и накопления стрептококков группы В рекомендуется селективный Lim бульон. Входящие в его состав антибиотики (колистин 10 мкг/мл и налидиксовая кислота 15 мкг/мл) подавляют рост сопутствующей бактериальной микрофлоры и создают селективные преимущества для роста *S. agalacticae*. Бульон может

быть использован как для посева вагинально-ректального мазка, так и для селективного обогащения СГВ независимо от выбора метода выделения/детекции *S. agalacticae* (СII).

При подозрении на СГВ-инфекции различной локализации у беременных проводят сбор биологического материала для культурального и молекулярно-биологического исследования из соответствующих локусов (из предполагаемого очага инфекции) [1,80,84-86].

При взятии *мочи* для бактериологического или молекулярно-биологического исследований собирают среднюю порцию утренней свободно выпущенной мочи в количестве 5-10 мл в одноразовый стерильный контейнер [86,87]. Образец мочи должен быть доставлен в лабораторию в течение 1-2 ч. При невозможности выполнить это требование допускают хранение пробы мочи при температуре + 2-8°C в течение 24 ч с момента взятия.

Взятие крови для посева производят из локтевой вены после двукратной обработки кожи локтевого сгиба стерильной салфеткой, смоченной кожным антисептиком или 70° этиловым спиртом. **После обработки кожи вену пальпировать нельзя!** Через 1-2 минуты с соблюдением правил асептики забирают кровь в коммерческие флаконы для аэробного культивирования. Для ряда коммерческих флаконов, благодаря вакуумной аспирации крови, необходимый объем крови поступает во флакон автоматически через иглу-бабочку и переходник.

У женщин с массой тела до 80 кг объем крови для исследования должен составлять 5-10 мл. Пробы крови берут как можно раньше от начала лихорадки, по возможности 2-3 пробы с интервалом 30-60 мин из периферических вен верхних конечностей (взятие крови на высоте лихорадки не повышает чувствительность метода, более важным для выявления этиологии заболевания становится оптимальный объем взятой крови и количество проб). Взятие одной пробы из периферической вены, а другой из катетера допустимо только в исключительных случаях: при необходимости

выявить катетер-ассоциированную бактериемию или при объективных трудностях, связанных с проведением венепункции.

Новорожденные дети

Новорожденным без клинических признаков инфекции, рожденным от матерей, не колонизированных СГВ плановое обследование на носительство СГВ не показано. Новорожденным без клинических признаков инфекции из группы риска по СГВ-инфекции, рожденным от матерей – носителей СГВ (вагинально-ректальное носительство, СГВ-бактериурия) показано плановое обследование в течение первых суток жизни на предмет колонизации слизистых оболочек СГВ. Обследование проводят путем взятия на микробиологическое исследование мекония, мазков со слизистой оболочки ротоглотки и мазков из ануса. Взятие биологического материала проводится стерильным тампоном в стерильной пластиковой пробирке.

Пробу доставляют в лабораторию в кратчайшие сроки для выполнения исследования. При необходимости длительного хранения используют транспортные среды: стерильная пробирка с пластиковым аппликатором со средой Эймса (Amies), Стюарта (Stuart) или с селективным Lim бульоном. При использовании транспортных сред Эймса и Стюарта, сроки хранения составляют 24-48 часов при 2-8° С.

При подозрении на СГВ-инфекции различной локализации у новорожденных проводят сбор биологического материала для культурального и молекулярно-биологического исследования из соответствующих локусов (из предполагаемого очага инфекции) [1,80,84-86].

Бактериологическое исследование крови при наличии клинических признаков инфекции проводят обязательно. Взятие крови для микробиологического посева производят из вены после двукратной обработки кожи стерильной салфеткой, смоченной кожным антисептиком. Через 1-2 минуты с соблюдением правил асептики забирают кровь в коммерческие педиатрические флаконы для гемокультивирования. Для ряда коммерческих флаконов, благодаря вакуумной аспирации крови,

необходимый объем крови поступает во флакон автоматически через иглу-бабочку и переходник. Объем крови для исследования должен составлять 0,1-1 мл.

При подозрении на менингит берут пробы спинномозговой жидкости, посредством люмбальной пункции или через шунт. Клинический материал немедленно доставляют в лабораторию в шприце или в стерильной пробирке/контейнере.

5. МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ *Streptococcus agalactiae*

При первичном сборе вагинально-ректальных мазков в Lim бульон образцы инкубируют 18-24 ч при 35°-37°С, что на 50% повышает выделение бактерий, по сравнению с агаризованными транспортными средами общего назначения (AI) [88-91]. Посев проб с агаризованных транспортных сред и Lim бульона проводят плотными непрерывными штрихами на хромогенную среду для селективного выделения СГВ. При использовании Lim бульона для посева можно применить кровяной агар с 5% дефибринированной кровью (баранья, крупного рогатого скота или лошадиная).

При посеве мочи и других биологических жидкостей с количественной оценкой применяют метод секторных посевов на кровяной агар с 5% дефибринированной кровью [86] и хромогенную среду для селективного выделения СГВ, что позволяет повысить высеваемость [92-98]. Посевы культивируют в атмосфере 5% CO₂ при температуре 35-37°С в течение 18-24 часов. При отсутствии роста инкубирование продлевается до 48 часов.

На кровяном агаре большинство штаммов *S. agalactiae* образует гладкие, блестящие, мелкие (диаметром 0,5-2 мм) колонии с зоной β-гемолиза, реже встречаются бактерии с α-гемолизом или культуры без гемолиза. На хромогенных средах цвет колоний СГВ отличается в зависимости от производителя, поэтому необходимо руководствоваться инструкцией производителя. Для выделения *S. agalactiae* рекомендуется

применение хромогенных сред, зарегистрированных в Российской Федерации. В зависимости от производителя цвет колоний СГВ может отличаться, поэтому при интерпретации результатов необходимо руководствоваться инструкцией.

Гемокультивирование при СГВ - сепсисе дает положительный результат в 60-70%, при пневмонии – приблизительно в 50% случаев, а при менингеальной форме инфекции этот показатель еще ниже [99-103]. Низкая чувствительность метода, по-видимому, обусловлена малым посевным объемом крови новорожденных и грудных детей. Кровь культивируют по стандартной методике посевов для аэробных (факультативно-анаэробных) микроорганизмов.

Выделенные на питательных средах культуры *S. agalactiae* идентифицируют по морфологии колоний и бактериальных клеток в мазках, окрашенных по Граму, с применением латексов для агглютинации, а также по биохимическим свойствам с помощью тест-систем для визуального и автоматического считывания (бактериологические анализаторы), и по белковому спектру с использованием метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (*MALDI-TOF-MS*).

5.1. Идентификация *Streptococcus agalactiae* на основе морфологических и биохимических свойств

Выделенные на питательных средах культуры *S. agalactiae* идентифицируют по морфологии колоний и бактериальных клеток в мазках, окрашенных по Граму, с применением латексов для агглютинации, а также по биохимическим свойствам с помощью тест-систем для визуального и автоматического считывания (бактериологические анализаторы), и по белковому спектру с использованием метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (*MALDI-TOF-MS*).

На кровяном агаре большинство штаммов *S. agalactiae* образует гладкие, блестящие, мелкие (диаметром 0,5-2 мм) колонии с зоной β-

гемолиза, реже встречаются бактерии с α -гемолизом или культуры без гемолиза. На хромогенных средах цвет колоний СГВ отличается в зависимости от производителя, поэтому необходимо руководствоваться инструкцией производителя. Рекомендуется использовать хромогенные среды, имеющие регистрационные удостоверения Российской Федерации. В зависимости от производителя цвет колоний СГВ может отличаться, поэтому при интерпретации результатов необходимо руководствоваться инструкцией.

Рост *S. agalactiae* в бульонах сопровождается помутнением с образованием умеренного или небольшого количества осадка в виде гранул или хлопьев. На плотных средах *S. agalactiae* формирует гладкие, опалесцирующие, серовато-белые колонии, которые необходимо дифференцировать с культурами других видов стрептококков, гемолитических энтерококков и листерий. На кровяном агаре типичные штаммы *S. agalactiae* вызывают β -гемолиз, 15-20 % штаммов не лизируют эритроциты, причем выраженность гемолитических свойств во многом зависит от условий культивирования.

Культуры *S. agalactiae* каталазоотрицательные, по Граму окрашиваются положительно, по морфологии клетки полиморфные (шаровидные и слегка вытянутые), располагаются цепочками переменной длины (чаще средние и короткие). Учитывая сходство колоний *S. agalactiae* по цвету с колониями других видов бактерий на хромогенных средах необходимо обязательное подтверждение идентификации одним из методов.

При неавтоматизированном («ручном») методе идентификации *S. agalactiae* дифференцируют по биохимическим свойствам (Приложение 2) [104]. СГВ ферментируют глюкозу, трегалозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, салицин (вариабельно), не ферментируют инулин, маннит, сорбит, раффинозу, эскулин и желатин, но разлагают гиппурат натрия и проявляют гиалуронидазную активность.

При отсутствии возможности биохимической идентификации с применением коммерческих тест-систем с автоматическим считыванием

результатов идентификации необходимо применение иммунологических тестов латекс-агглютинации с групповой антисывороткой В в соответствии с инструкцией производителя. Они ускоряют получение результатов бактериологического анализа, особенно в случаях выделения слабо - или негемолитических штаммов *S. agalactiae*

При идентификации СГБ по групповому антигену следует учитывать, что многие штаммы *Streptococcus porcinus* дают перекрестную реакцию с коммерческими антисыворотками к группоспецифическому антигену В.

При идентификации стрептококков группы В по биохимическим тестам с использованием коммерческих тест-систем для грамположительных бактерий с визуальным или автоматическим считыванием (полуавтоматические и автоматические бактериологические анализаторы) допускается не использовать латекс-агглютинацию.

5.2. Идентификация *Streptococcus agalactiae*, с применением молекулярно-генетических методов

Молекулярно-генетические методы позволяют диагностировать инфекцию быстрее культурального метода и проверять корректность отрицательных результатов других методов диагностики инфекции (СИ). Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РТ) становится методом выбора диагностики при преждевременных родах. Результаты ПЦР-РТ получают через 4,5 - 6 часов при чувствительности теста 90% и специфичности 97,6% [3, 105].

5.3. Идентификация *Streptococcus agalactiae* с применением время-пролетной масс-спектрометрии (MALDI-TOF-MS)

Для проведения идентификации по белковому спектру *S. agalactiae* необходимо стерильной пластиковой петлей (иглой) снять с поверхности агаровой среды изолированную колонию суточной культуры микроорганизма и поместить на две ячейки стальной мишени масс-

спектрометра (двукратное (дублированное) нанесение). Сверху нанести 1 мкл матрицы, рекомендованной производителем. Мишень поместить в масс-спектрометр и создать проект с указанием точек для идентификации и данные по образцу [106,107]. Программное обеспечение масс-спектрометра после снятия и обработки масс-спектра микроорганизма и сравнения с базой данных, выведет результат идентификации в виде таблицы с коэффициентом достоверности (*score*). Уровень достоверности идентификации выше 2,0 свидетельствует о точной видовой идентификации (приложение 3).

5.4. Идентификация *Streptococcus agalactiae* с применением тестов по месту лечения (*Point-of-care testing*)

Значительные затраты времени (24-96 часов) на проведение бактериологического анализа допустимы при плановом скрининге беременных, но неприемлемы в таких ситуациях, как преждевременные роды и роды у женщин с клиническими факторами риска СГВ инфекций. В этих случаях результаты исследования требуются в течение срока, измеряемого минутами или часами.

Кардинально справиться с такой задачей позволяют бесприборные иммунохроматографические и молекулярно-генетические тест-системы по месту лечения (*Point-of-care testing*).

При исследовании вагинально-ректальных мазков в иммунохроматографическом тесте (ИХТ) результат получают в течение 15-20 мин (приложение 4). Современные иммунохроматографические тест-системы основаны на применении моноклональных антител, что обеспечивает высокую специфичность их положительных показаний в ущерб чувствительности. ИХТ имеют широкий диапазон чувствительности (30%-93%) со специфичностью в пределах от 95% до 100% [108,109]. Простота постановки и учета результатов теста, быстрота получения последних, а также отсутствие необходимости в какой-либо аппаратуре и дополнительных

реактивах позволяют использовать их не только в лаборатории, но непосредственно «у постели больного» [110]. При данной инфекции перспективы применения ИХТ весьма велики, так как с их помощью можно обследовать беременных непосредственно перед или в начале родов. Однако, ИХТ дают отрицательные результаты при низком титре возбудителя, что диктует необходимость применения в таких случаях более чувствительных методов лабораторной диагностики. Учитывая низкую чувствительность ИХТ, в Рекомендациях по СГВ – инфекциям в странах Европы и Америки они не считаются достоверными [111]. Поэтому при положительном результате ИХТ следует рассматривать как подтверждение СГВ - инфекции, а отрицательный - нуждается в проверке более чувствительными методами диагностики. Предварительное обогащение клинического материала при культивировании на селективном Lim бульоне в течение 4 ч или более значительно повышает чувствительность ИХТ.

Другим перспективным методом экспресс-диагностики СГВ-инфекций является ПЦР-РТ тест-система GeneXpert, которая объединяет процессы экстракции ДНК, амплификации и детекции в полностью автоматическом режиме. Весь процесс длится менее 60 минут. ДНК-мишень последовательность представляет собой 3'-примыкающий участок гена SFB GBS. Одноразовый картридж содержит образец и все необходимые реагенты для экстракции ДНК и процесса ПЦР. Каждый тест- картридж содержит встроенный компонент для контроля качества образца и внутреннего контроля качества анализа. Картриджи являются автономными, все этапы реакции происходят в одном, закрытом картридже, что полностью исключает контаминацию образцов. Картридж предназначен для проведения только одного теста и готов к установке на борт прибора после инокуляции (встряхивания) в нем вагинально-ректального тампона (приложение 5). Программное обеспечение анализатора обобщает данные амплификации и выдает результат о наличии или отсутствии СГВ в исследуемом образце с чувствительностью 98,5% и специфичностью 99,6% [112,113].

6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *S. AGALACTIAE* К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ

Исследование чувствительности *S. agalactiae* к антимикробным препаратам проводится в соответствии с рекомендациями Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing – EUCAST, v.5.0*) [114] и Клиническими Рекомендациями по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (версия 2015-02) [115]. Применяют метод определения пограничные концентрации (МПК) (*breakpoint*) и диско-диффузионный метод (ДДМ).

6.1. Методы определения чувствительности *Streptococcus agalactiae* к антимикробным препаратам

Метод пограничных концентраций реализован в коммерческих тест – системах (панели, карты и т.д.) для определения антибиотикочувствительности на автоматических и полуавтоматических бактериологических анализаторах.

Для ДДМ применяют питательную среду Мюллера-Хинтон с 5% дефибринированной лошадиной кровью и 20 мг/л β-НАД в чашках Петри. Для приготовления инокулята используют метод прямого суспендирования в стерильном изотоническом растворе колоний чистой 18-24-часовой культуры СГВ, выросшей на плотных питательных средах. Для этого стерильной микробиологической петлей или ватным тампоном необходимо собрать несколько морфологически схожих колоний и суспендировать в стерильном изотоническом растворе. Бактериальную суспензию необходимо довести до плотности 0,5 по стандарту мутности МакФарланда.

Инокулом наносят стерильным тампоном на поверхность агара Мюллера-Хинтон с 5% дефибринированной лошадиной кровью и 20 мг/л β-НАД. Чашки инкубируют в микроаэрофильных условиях в атмосфере с 5% CO₂, при температуре 34-36 °С в течение 16-20 ч.

В соответствии с действующими рекомендациями [114,115], а также учитывая рекомендации по назначению антимикробных препаратов в акушерстве и неонатологии, рекомендуется определять чувствительность *S. agalactiae* к бензилпенициллину, эритромицину, клиндамицину и ванкомицину.

Регламентировано обязательное определение индуцибельной резистентности *S. agalactiae* к клиндамицину [114,115] для выявления антагонизма между клиндамицином и макролидами. Если антагонизм не выявляется, изолят оценивается как чувствительный. При выявлении антагонизма, изолят оценивается как чувствительный, но для пациентов с тяжелой инфекцией монотерапия клиндамицином противопоказана из-за возможности развития полной резистентности в процессе терапии (СП). Для выявления антагонизма (D-феномена) следует расположить диски с эритромицином и клиндамицином рядом на расстоянии 12-16 мм между краями дисков [115].

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *S. agalactiae* к антимикробным препаратам, а также пограничные значения МПК (мг/л) и пограничные значения для ДДМ (мм) представлены в таблице.

Таблица. Критерии оценки чувствительности *S. agalactiae* к антимикробным препаратам.

Антибактериальные препараты	Пограничные значения МПК (мг/л)*		Содержание АБП в диске (мкг)	Пограничные значения ДДМ (мм)*		Перекрестная чувствительность
	S ≤	R >		S ≥	R <	
Бензилпенициллин	0,25	0,25	1ед	18	18	пенициллин, цефалоспорины
Эритромицин	0,25	0,5	15	21	18	азитромицин, klarитромицин, рокситромицин
Клиндамицин	0,5	0,5	2	17	17	
Ванкомицин	2	2	5	13	13	

* R – устойчивость, S – чувствительность

7. АЛГОРИТМ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ *S. AGALACTIAE*

На основании выявления *S. agalactiae* диагностируют либо наличие СГВ – инфекции у беременной или новорожденного, либо, в случае обследования беременных без клинических признаков инфекции, определяют риск передачи возбудителя ребенку во время родов или в последующем. Бактериурия считается клиническим фактором риска независимо от титра бактерий и срока гестации.

На результативность исследования на СГВ клинического материала влияют многочисленные факторы, в т.ч. правильность взятия, хранения и транспортировки материала в лабораторию, своевременность его исследования, алгоритм и методология микробиологического исследования (использование сред обогащения (накопления), хромогенных сред, условия культивирования, качество кровяного агара).

Много случаев инфекции остаются недиагностированными вследствие ошибок, допускаемых при идентификации возбудителя, часть штаммов которого проявляют атипичные гемолитические и другие нетипичные свойства. Применение комплекса методов идентификации *S. agalactiae* позволяет избежать диагностических ошибок. Окончательный диагноз ставят на основании сопоставления результатов лабораторных анализов с данными анамнеза и результатами клинического обследования.

В настоящих Клинических рекомендациях в качестве метода для выявления СГВ - колонизации беременных предлагается взятие вагинально-ректального мазка, с последующим посевом на хромогенные питательные среды для выделения *S. agalactiae*, с последующим определением чувствительности к антибиотикам пенициллину, клиндамицину и эритромицину (приложение 6). В родах (при любом сроке беременности) при выявлении хотя бы одного из клинических факторов риска СГВ - инфекции (раздел Клинические формы инфекций, вызванные стрептококком группы В), используют обследование с применением тестов по месту лечения (СИ)

(*Point-of-care testing*) и превентивное назначение антибиотиков до рождения ребёнка (АШ) (приложение 7). Обследование всех новорожденных групп риска инфекций (мазки из ротоглотки и прямой кишки, меконий, желудочный аспират, кровь и т.д.) на СГВ проводить как молекулярно-генетическим так и культуральным методом (АП) (приложение 8).

8. ХРАНЕНИЕ ШТАММОВ

Для сохранения жизнеспособности и стабильности таксономических и других признаков культуры *S. agalactiae* замораживают двумя способами:

1. Несколько (3-5) колоний чистой культуры *S. agalactiae* с помощью микробиологической петли 1 мкл помещают в коммерческую готовую среду в микропробирках, содержащих бусины и специальный криоконсервант. Флаконы с культурами хранят при температуре -70°C и ниже в низкотемпературном морозильнике. При необходимости исследования свежей культуры стрептококков из флакона извлекают одну из бусин и восстанавливают в триптиказо-соевом бульоне.
2. Выделенные культуры хранят в 600 мкл триптиказо-соевого бульона, который разливают в микропробирки объемом 2 мл, сверху заливают 200 мкл стерильным вазелиновым маслом или глицерином. Микропробирки с культурами хранят в низкотемпературном морозильнике при температуре -70°C и ниже. Восстанавливают культуры путем размораживания из микропробирки.

9. КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

9.1. 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 [76,77,116-120].

Внутрилабораторный 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, а для тестов применяемых по месту лечения и нелабораторного персонала. 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 родовспомогательного медицинского учреждения, 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 дистиллированной воды.

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 микробиологической диагностики инфекций беременных и новорожденных, вызванных стрептококком группы В, необходимо наличие в лаборатории коллекции контрольных штаммов типовых культур *Staphylococcus aureus* (АТСС 25923), *Enterococcus faecalis* (АТСС 29212). Проведение контроля качества постановки антибиотикочувствительности необходимо ввести с применением контрольного штамма *Streptococcus pneumoniae* АТСС 49619 [113,114].

Индикаторами качества постаналитического этапа исследования являются: интерпретация и оценка результатов анализа, предоставление отчета исследования, клиническое использование результатов анализа, уровень внутриутробного инфицирования новорожденных и послеродовых гнойно-воспалительных инфекций рожениц, обобщенные сведения о чувствительности *S. agalactiae* к антимикробным препаратам с возможностью выбора альтернативной терапии (при наличии у беременной аллергической реакции к терапии пенициллинами).

9.2. Внешняя оценка качества исследования

Лабораториям 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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prevention of perinatal group B streptococcal disease revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm Rep.* 2010; 59: 1–36.
2. The prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease. Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada clinical practice guideline, No. 149, 2004 (revised 2013). *J Soc Obstet Gynaecol Can;* 26: 826-32.
3. The Prevention of Early-onset Neonatal Group B Streptococcal Disease. NHS, Royal College of the Obstetricians & Gynaecologists, Green-top Guideline No. 36, 2012.
4. Recommendations for term and late preterm infants at risk for perinatal bacterial infection Revised guidelines of the Swiss Society of Neonatology in collaboration with the Paediatric Infectious Disease Group of Switzerland (PIGS): modified version based on a previous publication in the *Journal of the Swiss Society of Paediatrics.* *Swiss Medical Weekly,* 2013; 143.
5. Анкирская А.С., Припутневич Т.В., Муравьева В.В., Любасовская Л.А., Карапетян Т.Э., Мелкумян А.Р., Чубаров В.В., Калакуцкая А.Н. Дискуссионные вопросы профилактики внутриутробных инфекций, вызванных стрептококками группы В: какую стратегию выбираем? *Акушерство и гинекология.* 2015; 7: 9-14.
6. Boyer K.M., Gotoff S.P. Strategies for chemoprophylaxis of GBS early-onset infections. *Antibiot Chemother.* 1985; 35: 267-80.
7. National Institutes of Health. Summary of the workshop on perinatal infections due to group B Streptococcus. *J Infect Dis.* 1977; 136(1): 137-52.
8. Phares C.R., Lynfield R., Farley M.M. et al. Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005. *JAMA.* 2008; 299(17): 2056-65.
9. Schrag S.J., Zywicki S., Farley M.M. et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N Engl J Med.* 2000; 342(1): 15-20.

10. World Health Organization. WHO: recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. Modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1977; 56(3): 247-53.
11. Adair C.E., Kowalsky L., Quon H. et al. Risk factors for early-onset group B streptococcal disease in neonates: a population-based case-control study. *CMAJ.* 2003; 169(3): 198-203.
12. Aharoni A., Potasman I., Levitan Z. et al. Postpartum maternal group B streptococcal meningitis. *Rev Infect Dis.* 1990; 12(2): 273-6.
13. Braun T.I., Pinover W., Sih P. Group B streptococcal meningitis in a pregnant woman before the onset of labor. *Clin Infect Dis.* 1995; 21(4): 1042-3.
14. Krohn M.A., Hillier S.L., Baker C.J. Maternal peripartum complications associated with vaginal group B streptococci colonization. *J Infect Dis.* 1999; 179(6): 1410-5.
15. Pass M.A., Gray B.M., Dillon H.C. Jr. Puerperal and perinatal infections with group B streptococci. *Am J Obstet Gynecol.* 1982; 143(2): 147-52.
16. Shimoni Z., Ben David M., Niven M.J. Postpartum group B streptococcal tricuspid valve endocarditis. *Isr Med Assoc J.* 2006; 8(12): 883-4.
17. Strasberg G.D. Postpartum group B streptococcal endocarditis associated with mitral valve prolapse. *Obstet Gynecol.* 1987; 70 (3 Pt 2): 485-7.
18. Yancey M.K., Duff P., Clark P. et al. Peripartum infection associated with vaginal group B streptococcal colonization. *Obstet Gynecol.* 1994; 84(5): 816-9.
19. Наумкина Е.В., Абросимова О.А., Пахалкова Е.В., Рогатых Н.А., Миронов А.Ю. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (2): 107-110.
20. Мелкумян А.Р., Цибин А.Н., Латыпова М.Ф., Стребков В.Г. Распространенность СГВ - инфекций среди новорожденных г. Москвы. Тезисы на VIII Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням. 28-30 марта 2016 г. Москва. – С.181.

21. Приказ Минздрава России от 12 ноября 2012г. № 572н Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «Акушерство и гинекология» с изменениями от 12.01.2016 г.
22. Клинические рекомендации (протокол). Преждевременные роды. 2013.
23. Harrison L.H., Elliott J.A., Dwyer D.M., Libonati J.P., Ferrieri P., Billmann L., et al. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. Maryland Emerging Infections Program. J Infect Dis. 1998; 177: 998-1002.
24. Florindo C., Viegas S., Paulino A., Rodrigues E., Gomes J.P., Borrego M.J. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility profiles in *Streptococcus agalactiae* colonizing strains: association of erythromycin resistance with subtype III-1 genetic clone family. Clin Microbiol Infect. 2010; 16(9): 1458-63.
25. Martins E.R., Andreu A., Correia P., Juncosa T., Bosch J., Ramirez M. et al. Group B streptococci causing neonatal infections in barcelona are a stable clonal population: 18-year surveillance. J Clin Microbiol. 2011; 49(8): 2911-18.
26. Campelo F.A., Pedrosa A.C., Antúnez I.Á., Capuz B.L. Phenotypes and mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides in *Streptococcus agalactiae* isolates with clinical significance in an eight-year period (2002-2010) Rev Esp Quimioter. 2012; 25(1): 42-6.
27. Park C., Nichols M., Schrag S.J. Two cases of invasive vancomycin-resistant group B streptococcus infection. N Engl J Med. 2014; 370 (9): 885-6.
28. McDonald H.M., Chambers H.M. Intrauterine Infection and Spontaneous Midgestational Abortion: Is the Spectrum Microorganisms Similar to That in Preterm Labor? Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology. 2000; 8 (5/6): 220-7.
29. Regan J.A., Klebanoff M.A., Nugent R.P. et al. Colonization with group B streptococci in pregnancy and adverse outcome. Am. J Obst. Gyn. 1996; 174: 1354-60.

30. Тотолян А.А., Суворов А.Н., Дмитриев А.В. Стрептококки группы В в патологии человека. С-П., Человек; 2009: 212 с.
31. Persson K., Christensen K.K., Christensen P. et al. Asymptomatic bacteriuria during pregnancy with special reference to group B streptococci. *Scand J Infect Dis.* 1985; 17(2): 195-9.
32. Tucker J.M., Goldenberg R.L., Davis R.O. et al. Etiologies of preterm birth in an indigent population: is prevention a logical expectation? *Obstet Gynecol.* 1991; 77(3): 343-47.
33. Wood E.G., Dillon H.C. Jr. A prospective study of group B streptococcal bacteriuria in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1981; 140(5): 515-20.
34. Davies H.D., Raj S., Adair C. et al. Population based active surveillance for group B streptococcal infection in Alberta, Canada: implication for vaccine formulation. *Pediatric. Infect. Dis.* 2001; .20 (9), 879-89.
35. Eschenbach D.A. Specific Bacterial Infections: Group B Srteptococcus. The Global Library Women's Medicine (ISSN: 1756-2228). 2011.
36. Jordan H.T., Farley M.M., Craig A. et al. Revising the need for vaccine prevention of late-onset neonatal group B streptococcal disease: a multistate, population-based analysis. *Pediat. Infect. Dis. J.* 2008; 27: 1057-64.
37. Locksmith G.J., Clark P., Duff P. Maternal and neonatal infection rates with three different protocols for prevention of group B streptococcal disease. *Am.J. Obstet.Gynecol.* 1999; 180: 416-22.
38. Зациорская С. Л. Стрептококки группы В у беременных и новорожденных : Дис... канд. мед. наук. Л., 1995. 123с.
39. Бочков И.А., Шевчук М.С., Семина Н.А. Экологические и эпидемиологические особенности циркуляции стрептококков группы В в родильном доме. *ЖМЭИ.* 1989.; 4: 37-42.
40. Baker C.J., Edwards M.S. Group B streptococcal conjugate vaccines. *Arch Dis Child.* 2003; 88: 375-8.
41. Heath P.T., Feldman R.G. Vaccination against group B Streptococcus. *Expert Review of Vaccines.* 2005; 4: 207-18.

42. Edwards M.S. Group B streptococcal conjugate vaccine: a timely concept for which the time has come. *Human Vaccines*. 2008; 4: 444-48.
43. Kasper D.L., Paoletti L.C., Wessels M.R., et al. Immune response to type III group B streptococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *J Clin Invest*. 1996; 98: 2308-14.
44. Baker C.J., Paoletti L.C., Wessels M.R., et al. Safety and immunogenicity of capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines for group B streptococcal types Ia and Ib. *J Infect Dis*. 1999; 179: 142-50.
45. Baker C.J., Paoletti L.C., Rench M.A., et al. Use of capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine for type II group B *Streptococcus* in healthy women. *J Infect Dis*. 2000; 182: 1129-38.
46. Liston T.E., Harris R.E., Foshee S., Null D.M., Jr. Relationship of neonatal pneumonia to maternal urinary and neonatal isolates of group B streptococci. *South Med J*. 1979; 72: 1410-2.
47. Wood E.G., Dillon H.C., Jr. A prospective study of group B streptococcal bacteriuria in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1981; 140: 515-20.
48. Persson K., Bjerre B., Elfstrom L., Polberger S., Forsgren A. Group B streptococci at delivery: high count in urine increases risk for neonatal colonization. *Scand J Infect Dis*. 1986; 18: 525-31.
49. Moller M., Thomsen A.C., Borch K., Dinesen K., Zdravkovic M. Rupture of fetal membranes and premature delivery associated with group B streptococci in urine of pregnant women. *Lancet*. 1984; 2 (8394): 69-70.
50. McKenna D.S., Matson S., Northern I. Maternal group B streptococcal (GBS) genital tract colonization at term in women who have asymptomatic GBS bacteriuria. *Infectious diseases in Obstet Gynecol*. 2003; 11(4): 203-7.
51. Bland M.L., Vermillion S.T., Soper D.E. Late third-trimester treatment of rectovaginal group B streptococci with benzathine penicillin G. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 183: 372-6.

52. Hall R.T., Barnes W., Krishnan L., Harris D.J., Rhodes P.G., Fayez J., et al. Antibiotic treatment of parturient women colonized with group B streptococci. *Am J Obstet Gynecol.* 1976; 124: 630-4.
53. Gardner S.E., Yow M.D., Leeds L.J., Thompson P.K., Mason E.O., Jr Clark D.J. Failure of penicillin to eradicate group B streptococcal colonization in the pregnant woman. A couple study. *Am J Obstet Gynecol.* 1979; 135: 1062-5.
54. Edwards R.K., Clark P., Duff P. Intrapartum antibiotic prophylaxis 2: positive predictive value of antenatal group B streptococci cultures and antibiotic susceptibility of clinical isolates. *Obstet Gynecol.* 2002; 100: 540-4.
55. Centelles-Serrano M.J., Perez-Moreno M.O., Llovet-Lombarte M.I., Cortell-Ortola M., Jardi-Baiges A.M., Buj-Gonzalez J.I. Effectiveness of systematic investigation for group B Streptococcus in urine samples to identify colonized pregnant women. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009; 27: 394-8.
56. Arya A., Cryan B., O'Sullivan K. et al. Self-collected versus health professional-collected genital swabs to identify the prevalence of group B Streptococcus: a comparison of patient preference and efficacy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008; 139(1): 43-5.
57. Baker C.J., Edwards M.S., Kasper D.L. Role of antibody to native type III polysaccharide of group B Streptococcus in infant infection. *Pediatrics.* 1981; 68(4): 544-9.
58. Boyer K.M., Gadzala C.A., Burd L.I. et al. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. I. Epidemiologic rationale. *J Infect Dis.* 1983; 148(5): 795-801.
59. Oddie S., Embleton N.D. Risk factors for early onset neonatal group B streptococcal sepsis: case-control study. *BMJ.* 2002; 325(7359): 308.
60. Regan J.A., Klebanoff M.A., Nugent R.P. The epidemiology of group B streptococcal colonization in pregnancy. *Vaginal Infections and Prematurity Study Group.* *Obstet Gynecol.* 1991; 77(4): 604-10.

61. Schuchat A., Deaver-Robinson K., Plikaytis B.D. et al. Multistate case-control study of maternal risk factors for neonatal group B streptococcal disease. The Active Surveillance Study Group. *Pediatr Infect Dis J.* 1994; 13(7): 623-9.
62. Schuchat A., Oxtoby M., Cochi S. et al. Population-based risk factors for neonatal group B streptococcal disease: results of a cohort study in metropolitan Atlanta. *J Infect Dis.* 1990; 162(3): 672-7.
63. Schuchat A., Zywicki S.S., Dinsmoor M.J. et al. Risk factors and opportunities for prevention of early-onset neonatal sepsis: a multicenter case-control study. *Pediatrics.* 2000; 105 (1 Pt 1): 21-6.
64. Tucker J.M., Goldenberg R.L., Davis R.O. et al. Etiologies of preterm birth in an indigent population: is prevention a logical expectation? *Obstet Gynecol.* 1991; 77(3): 343-47.
65. Zaleznik D.F., Rench M.A., Hillier S. et al. Invasive disease due to group B *Streptococcus* in pregnant women and neonates from diverse population groups. *Clin Infect Dis.* 2000; 30(2): 276-81.
66. Carstensen H., Christensen K.K., Grennert L. et al. Early-onset neonatal group B streptococcal septicaemia in siblings. *J Infect.* 1988; 17(3): 201-4.
67. Christensen K.K., Dahlander K., Linden V. et al. Obstetrical care in future pregnancies after fetal loss in group B streptococcal septicemia. A prevention program based on bacteriological and immunological follow-up. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1981; 12(3): 143-50.
68. Faxelius G., Bremme K., Kvist-Christensen K. et al. Neonatal septicemia due to group B streptococci – perinatal risk factors and outcome of subsequent pregnancies. *J Perinat Med.* 1988; 16(5-6): 423-30.
69. Schrag S.J., Zell E.R., Lynfield R. et al. A population-based comparison of strategies to prevent early-onset group B streptococcal disease in neonates. *N Engl J Med.* 2002; 347(4): 233-9.
70. Hakansson S., Axemo P., Bremme K. et al. Group B streptococcal carriage in Sweden: a national study on risk factors for mother and infant colonisation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2008; 87(1): 50-8.

71. Randis T.M., Polin R.A. Early-onset group B Streptococcal sepsis: new recommendations from the Centres for Disease Control and Prevention. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2012; 97(4):F291-4.
72. Verani J.R., McGee L., Schrag S.J.; Division of Bacterial Diseases, National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease – revised guidelines from CDC, 2010. MMWR Recomm Rep. 2010; 59(RR-10): 1-36.
73. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 20 декабря 2012г. № 1183н Об утверждении номенклатуры должностей медицинских работников и фармацевтических работников.
74. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 7 июля 2009г. № 415. Квалификационные требования к специалистам с высшим и послевузовским медицинским и фармацевтическим образованием в сфере здравоохранения.
75. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 июля 2010 г. N 541н. Единый квалификационный справочник должностей руководителей, специалистов и служащих, раздел Квалификационные характеристики должностей работников в сфере здравоохранения.
76. ГОСТ Р ИСО 22870-2009. Национальный стандарт Российской Федерации. Исследования по месту лечения. Требования к качеству и компетентности.
77. ГОСТ Р ИСО 15189 – 2009. Национальный стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
78. ГОСТ Р 52905 – 2007. Национальный стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Требования безопасности.
79. СП 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней"

80. Методические указания МУК 1.3.2569-09. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности.
81. ГОСТ Р 52905-2007. Национальный стандарт Российской Федерации. Требования безопасности.
82. Федеральный закон от 4 мая 2011 г. N 99-ФЗ. О лицензировании отдельных видов деятельности.
83. Санитарные правила и нормы 2.1.7.2790-10. Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами.
84. Методические указания 4.2.2039-05. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. (Утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 23.12.2005).
85. ГОСТ Р 53079.4-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа.
86. Акушерство: Национальное руководство / ред. Г. М. Савельева, Г. Т. Сухих, В. Н. Серов, В. Е. Радзинский. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: ГЭОТАР - Медиа, 2015. – 1088.
87. Федеральные клинические рекомендации. Бактериологический анализ мочи, Москва. 2014.
88. Philipson E.H., Palermino D.A., Robinson A. Enhanced antenatal detection of group B Streptococcus colonization. *Obstet Gynecol.* 1995; 85: 437–9.
89. Platt M.W., McLaughlin J.C., Gilson G.J., Wellhoner M.F., Nims L.J. Increased recovery of group B Streptococcus by the inclusion of rectal culturing and enrichment. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1995; 21: 65–8.
90. Baker C.J., Clark D.J., Barrett F.F. Selective broth medium for isolation of group B streptococci. *Appl Microbiol.* 1973; 26: 884–5.

91. Altaie S.S., Dryja D. Detection of group B Streptococcus. Comparison of solid and liquid culture media with and without selective antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1994; 18: 141–4.
92. de la Rosa M., Perez M., Carazo C., Pareja L., Peis J.I., Hernandez F. New Granada medium for detection and identification of group B streptococci. *J Clin Microbiol* 1992 Apr; 30: 1019–21.
93. Rosa-Fraile M., Rodriguez-Granger J., Haidour-Benamin A., Cuerva J., Sampedro A. Granadaene: proposed structure of the group B Streptococcus polyenic pigment. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 6367–70.
94. Church D.L., Baxter H., Lloyd T., Miller B., Elsayed S. Evaluation of StrepB carrot broth versus Lim broth for detection of group B Streptococcus colonization status of near-term pregnant women. *J Clin Microbiol.* 2008; 46: 2780–2.
95. Martinho F., Prieto E., Pinto D., et al. Evaluation of liquid biphasic Granada medium and instant liquid biphasic Granada medium for group B Streptococcus detection. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008; 26: 69–71.
96. Adler A., Block C., Engelstein D., Hochner-Celnikier D., Drai-Hassid R., Moses A.E. Culture-based methods for detection and identification of Streptococcus agalactiae in pregnant women—what are we missing? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2008; 27: 241–3.
97. Smith D., Perry J., Laine L., Galloway A., Gould F.K. Comparison of BD GeneOhm real-time polymerase chain reaction with chromogenic and conventional culture methods for detection of group B Streptococcus in clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008; 61: 369–72.
98. Carvalho M.D., Facklam R., Jackson D., Beall B., McGee L. Evaluation of three commercial broth media for pigment detection and identification of group B streptococci (GBS), Streptococcus agalactiae. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 4161–3.
99. Visser V.E., Hall R.T. Lumbar puncture in the evaluation of suspected neonatal sepsis. *J Pediatr.* 1980; 96: 1063–7.

100. Hristeva L., Booy R., Bowler I., Wilkinson A.R. Prospective surveillance of neonatal meningitis. *Arch Dis Child*. 1993; 69 (1): 14–8.
101. Wiswell T.E., Baumgart S., Gannon C.M., Spitzer A.R. No lumbar puncture in the evaluation for early neonatal sepsis: will meningitis be missed? *Pediatrics*. 1995; 95: 803–6.
102. Stoll B., Hansen N., Fanaroff A., et al. To tap or not to tap: high likelihood of meningitis without sepsis among very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2004; 113: 1181–6.
103. Ansong A., Smith P.B., Benjamin D., Clark R., Li J., Cotten C.M., et al. Group B streptococcal meningitis: cerebrospinal fluid parameters in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *Early Hum Dev*. 2009; 85(10): 5–7.
104. Методики клинических лабораторных исследований. Том III. Справочное пособие. Под ред. Меньшикова В. В.-Изд. «Лабора», 2009: 880.
105. Bergeron M. G., Danding K.E. , Menard C., Picard F.J., Gagnon M., Bernier M. et al. Rapid detection of group B streptococci in pregnant women at delivery. *N Engl J Med*. 2000; 343:175-9.
106. Методические указания для работы на приборах серии flex компании Bruker Daltonics. Прямое белковое профелирование. – Москва. – 2010. – с.45.
107. Lanotte P., Perivier M., Haguenoer E., Mereghetti L., Burucoa C., Claverol S., et al. Proteomic biomarkers associated with *Streptococcus agalactiae* invasive genogroups. *PLoS One*. 2013; 8: e54393.
108. Yancey M.K., Duff P. An analysis of the cost-effectiveness of selected protocols for the prevention of neonatal group B streptococcal infection. *Obstet Gynecol*. 1994; 83: 367-71.
109. Matsui H., Kimura J., Higashide M., Takeuchi Y., Okue K., et al. Immunochromatographic detection of the group B streptococcus antigen from enrichment cultures. *Clin Vaccine Immunol*. 2013; 20(9): 1381-7.
110. Поликарпова С.В., Лукина Н.Н., Тимофеева О.Г., Балина В.В., Мехси Н.Т., Жилина С.В., Пивкина Н.В., Бондаренко Н.А. Пути оптимизации диагностики инфекций, вызванных стрептококками группы В (СГВ) в

- акушерском стационаре. Материалы XVII Всероссийского научно-образовательного форума «Мать и дитя». 27-30 сентября 2016г. Москва: 88.
111. Food and Drug Administration (US). FDA safety alert: risks of devices for direct detection of group B streptococcal antigen. Rockville (MD): Dept. of Health and Human Services (US); 1997.
112. Daniels J., Gray J., Pattison H., Roberts T., Edwards E., Milner P., et. al. Rapid testing for group B streptococcus during labour: a test accuracy study with evaluation of acceptability and cost-effectiveness. Health Technology Assessment. 2009; 13 (42): 1-154
113. El Helali N., Nguyen J.C., Ly A., Giovangrandi Y., Trinquart L. Diagnostic accuracy of a rapid real-time polymerase chain reaction assay for universal intrapartum group B Streptococcus screening. Clin Infect Dis. 2009; 49: 417–23.
114. EUCAST v.5.0 (European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing).
115. Клинические Рекомендации по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (версия 2015-02).
116. ГОСТ ИСО/МЭК 17025. Национальный стандарт Российской Федерации. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.
117. ГОСТ Р 53079.1-2008. Национальный стандарт Российской Федерации. Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 1. Правила описания методов исследования.
118. 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.
119. 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.

120. Приказ № 220 Минздрава РФ "Об утверждении отраслевого стандарта "Правила проведения внутрилабораторного контроля качества количественных методов клинических лабораторных исследований с использованием контрольных материалов (ОСТ 91500.13.0001-2003)" от 26.05.2003 г.

Приложение 1

Материально-техническое оснащение, необходимое для выполнения исследования

Наименование медицинских изделий, оборудования, мебели	Наименование реактивов и расходных материалов
Ламинарный бокс 2 класса биологической безопасности, оснащенный HEPA-фильтром	Контейнер стерильный с завинчивающейся 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
Автоклав для стерилизации питательных сред или автоматическая средоварочная машина	Петли микробиологические диаметром 1 и 10 мкл (стерильные или многоразовые)
Автоклав для утилизации отработанного материала	Шпатели Дригальского стерильные
Сухожаровой шкаф	Стекла предметные
Холодильник для хранения готовых питательных сред, биологических субстратов и реагентов	Пипетки пластиковые пастеровские стерильные
Спиртовые, газовые горелки или стерилизаторы микробиологических петель	Микропробирка, стерильная
Дистилятор	Стерильный ватный тампон
Электрическая плита	Наконечники для дозаторов полуавтоматических
Бактерицидные лампы или облучатель-рециркулятор	Пакеты для автоклавирования
Стол лабораторный химический	Набор реагентов для окраски мазков по Граму
Стандарт мутности по МакФарланду или прибор (спектрофотометр) для определения мутности суспензии микроорганизмов	Иммерсионное масло
Дозаторы переменного объема полуавтоматические	Питательная среда основа кровяного агара для неселективного культивирования прихотливых бактерий
Контейнеры для сброса отходов	Кровь (баранья, крупного рогатого скота, лошадиная) дефибринированная для питательных сред, стерильная
Емкости с дезинфицирующим раствором	Реагенты для определения уреазной, каталазной и оксидазной активности
Спирт этиловый 95 град	Хромогенный агар для селективного выделения стрептококков группы В
Перчатки нестерильные	Флакон с питательной средой для посева стерильного биоматериала (кровь, спинномозговая жидкость и т.д.)
Маска трехслойная одноразовая	Питательная среда Мюллера-Хинтона для постановки антибиотикочувствительности
Клип-берет одноразовый лабораторный	Дифференциально-диагностические латексы для проведения идентификации стрептококков (латекс-агглютинация)
Карандаши восковые, алмазные карандаши, водостойкие фломастеры	Диски с антибактериальными препаратами: пенициллин, клиндамицин, эритромицин, ванкомицин
Линейка, штангенциркуль для учета результатов определения чувствительности диско-диффузионным методом	Дифференциально-диагностические диски (оптохин, бацитрацин, оксидаза и т.д.)
	Контрольный штамм <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 для проведения контроля качества
	Контрольный штамм <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 для проведения контроля качества
	Контрольный штамм <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619 для проведения контроля качества

Дополнительное оснащение

Наименование медицинских изделий, оборудования, мебели	Наименование реактивов и расходных материалов
Автоматизированное рабочее место (сканер штрих кодов, компьютер с ЛИС, принтер)	Готовые питательные среды в чашках Петри (кровяной агар, хромогенный агар для культивирования стрептококков группы В)
Анализатор для гемокультивирования	Пробирка с транспортной средой Lim бульон
Анализатор для идентификации по биохимическим свойствам или белковому спектру и/или определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам	Иммунохроматографический тест для экспресс диагностики стрептококков группы В
Анализатор для проведения полимеразно-цепной реакции в режиме «реального времени»	Картридж Xpert GBS для экспресс- диагностики стрептококка группы В
Анализатор Gene Xpert для экспресс- диагностики стрептококка группы В	Тест-панель для идентификации и определения антибиотикочувствительности одного штамма микроорганизма на анализаторе
Автоматический прибор для учета результатов определения чувствительности диско-диффузионным методом	Дополнительные реагенты для инокуляции суспензии культур микроорганизмов на тест- панель
Инкубатор для микроаэрофильного культивирования (инкубатор CO ₂) или анаэроб-контейнер или газогенерирующие пакеты или эксикатор	Реактивы для проведения биохимической идентификации микроорганизмов на тест – панель
Низкотемпературный холодильник	Реактив матрица для белковой экстракции
Вортекс	Градиентные полоски E-test для определения чувствительности к антибиотикам
	Криопробирки или питательная среда триптиказо-соевый бульон для заморозки культур бактерий

Идентификация *Streptococcus agalactiae*Фенотипическая характеристика β -гемолитических стрептококков

Вид	Серологическая группа	Размер колоний при 24 часовой инкубации	Бацитроцин	PYR - тест	САМР - тест	Тест Фогес-Проскауэра (VP)	Гидролиз гишурата	Трегалоза	Сорбитол
<i>S. pyogenes</i>	A	> 0,5 мм	+	+	— ²	—	—	+	—
<i>S. agalactiae</i>	B	> 0,5 мм	—	—	+	—	+	Вариаб.	—
<i>S. dysgalactiae</i> подвид <i>equisimilis</i>	A, B, C, L	> 0,5 мм	—	—	—	—	—	-	
<i>S. equi</i> подвид <i>zooepidemicus</i>	C	> 0,5 мм	—	—	—	—	—	+	+
Группа <i>S. anginosus</i> *	A, C, G, F, нетипируемые	< 0,5 мм	—	—	—	+	—	+	—

Постановка САМР-теста

S. agalactiae продуцирует внеклеточный белок (САМР – фактор), который, действуя совместно со стафилококковым бета-лизином, обуславливает лизис эритроцитов. Применяют тест для дифференциации негемолитических или слабогемолитических штаммов СГВ. На поверхность кровяного агара наносят толщиной не более 3 мм через центр чашки сплошной линией суточную бульонную культуру контрольного штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Спустя несколько минут на эту же чашку отступя на 2 мм от нее перпендикулярными штрихами сеют до 4 тестируемых суточных культур СГВ. После 15-18-часовой инкубации при 35°C учитывают результаты. Большинство штаммов *S. agalactiae* индуцирует образование расширенных зон гемолиза в виде «бабочки» вблизи зоны роста *S. aureus*.

Постановка реакции латекс – агглютинации

При постановке теста окрашенные латексные частицы, на которых адсорбированы группо- и типоспецифические антитела вступают в реакцию агглютинации с антигеном клеточной стенки СГВ. В результате выполнения теста образуется четкая читаемая структура зернистой агглютинации. Тест проводят на предметном стекле или агглютинационных пластинах с лунками в соответствии с рекомендацией производителя.

Приложение 3.

Проведение масс-спектрометрической идентификации *S. agalactiae*

Стерильной пластиковой петлей (иглой) снять с поверхности агаровой среды 1-2 изолированные колонии суточной культуры СГВ и поместить на две ячейки стальной мишени масс-спектрометра (двукратное (дублированное) нанесение).

1. Сверху нанести 1 мкл матрицы.
2. Мишень поместить в масс-спектрометр и создать проект с указанием точек для идентификации и данные по образцу.

Программное обеспечение осуществляет снятие и обработку масс-спектра микроорганизма, сравнение с базой данных, выведение результата идентификации в виде таблицы и расчет коэффициента достоверности (score). Достоверными считаются результаты, при score >1,7. Уровень достоверности идентификации выше 2,0 свидетельствует о точной видовой идентификации, уровень достоверности от 1,7 до 2,0 – о точной идентификации до рода, отрицательными считались результаты с score < 1,7.

Приготовление рабочего раствора матрицы

1. Приготовить основной органический растворитель, смешав 20 мл 50% ацетонитрила с 20 мл 2,5% трифторуксусной кислоты.
2. Поместить несколько кристаллов α -циано-4-гидроксикоричной кислоты в микроцентрифужную пробирку и смешать с 200-500 мкл основного органического растворителя (из расчета 10 мг кристаллов матрицы и 1 мл основного органического растворителя).
3. Перемешать 2-3 минуты на вортексе до полного растворения.

Полученный раствор матрицы и основной органический растворитель можно хранить при комнатной температуре 1-2 недели.

Приложение 4.

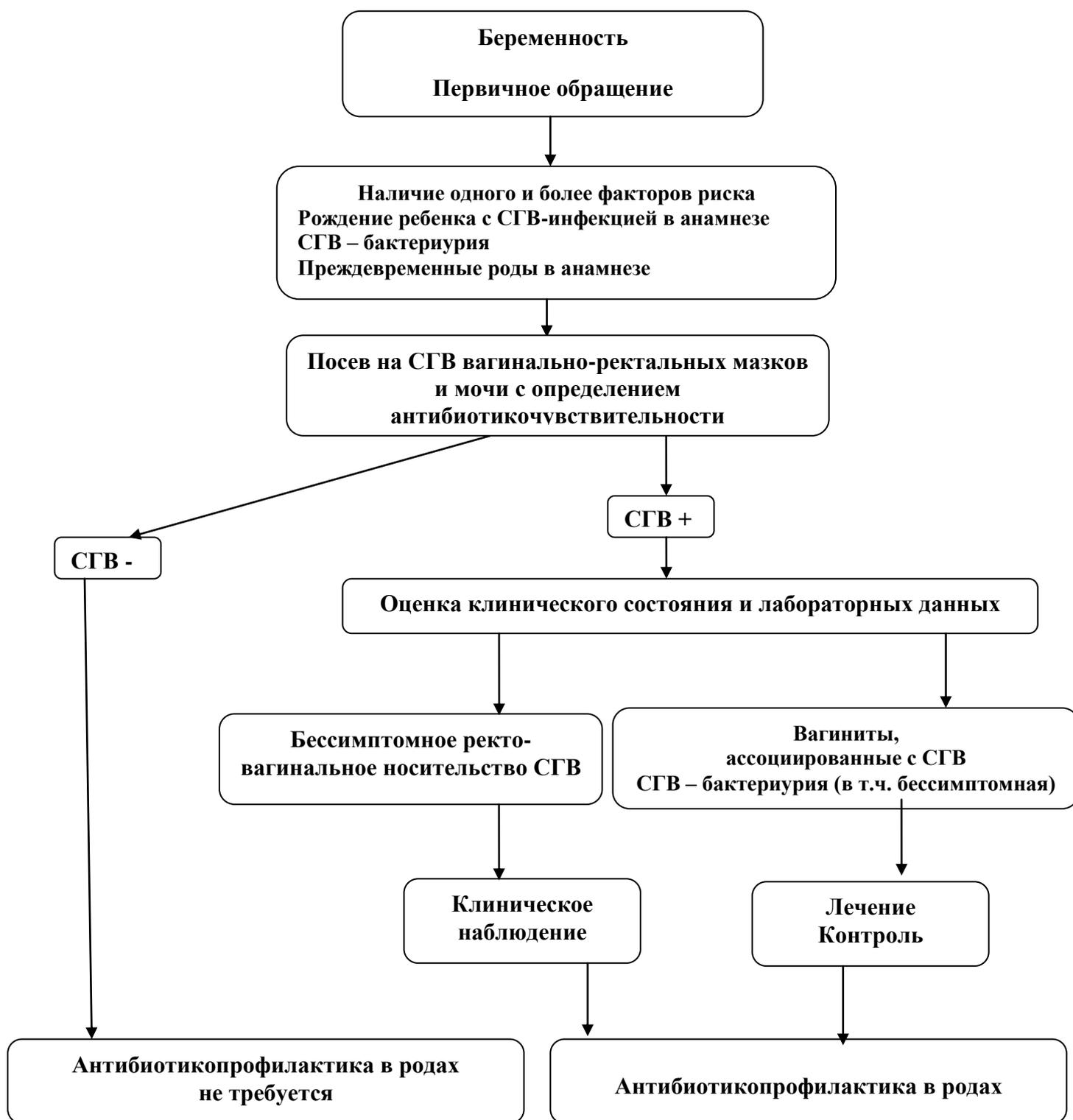
Проведение иммунохроматографического теста для прямого выявления *S. agalactiae* из биологического материала

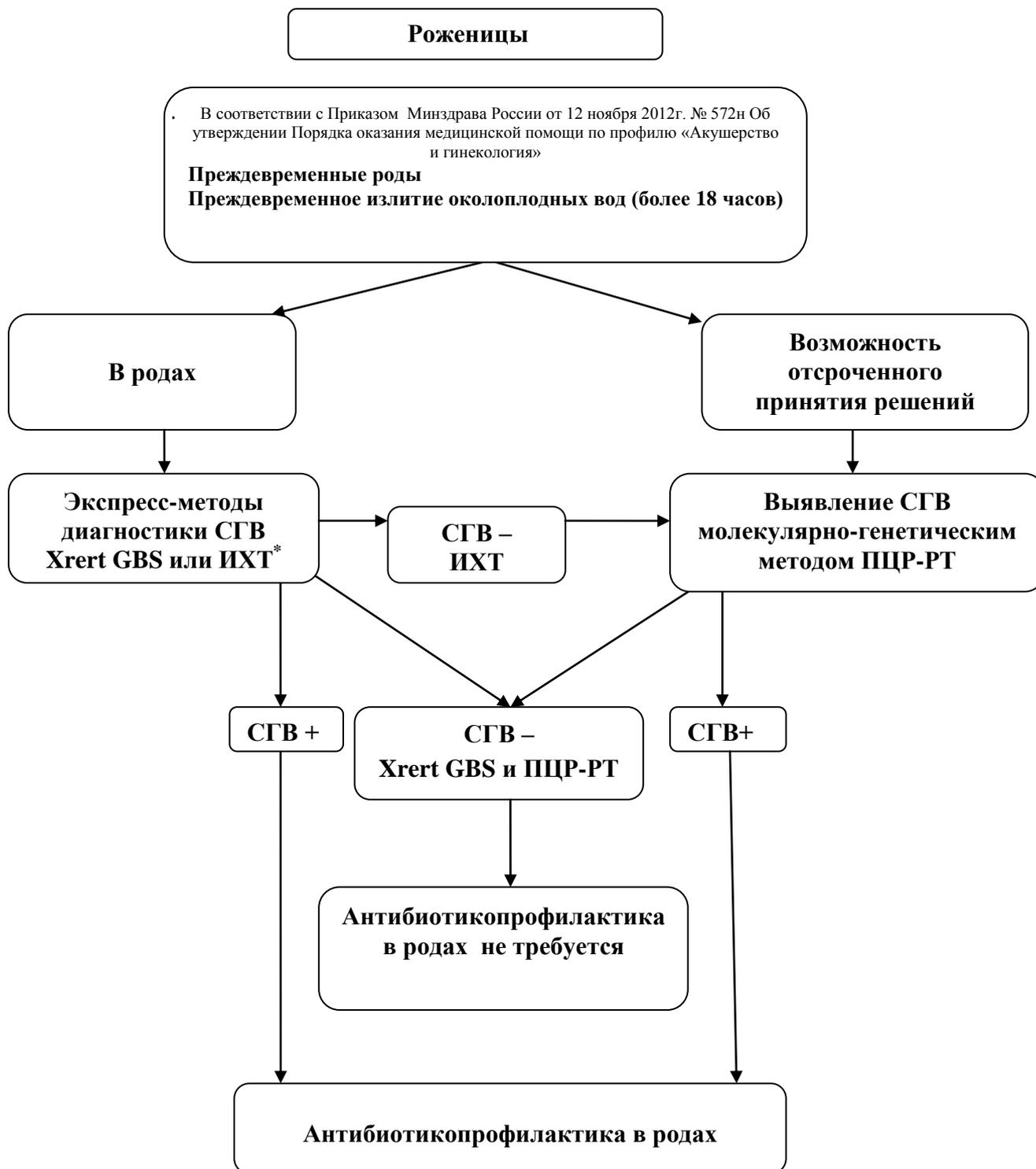
ИХТ является иммунологическим методом диагностики, основанном на обнаружении антигенов *S. agalactiae*. В настоящее время ИХТ выпускают на основе моноклональных антител к антигену СГВ, прикрепленных к частицам коллоидного золота и латексным частицам. Тест-полоски погружают в пробирку с экстрактом тестируемой пробы или при использовании кассеты пробу вносят в ее окошко в соответствии с рекомендацией производителя.

Проведение прямого выявления *S. agalactiae* в вагинально-ректальном мазке с применением картриджа Xpert GBS

Процедура работы с набором реагентов для выделения СГВ:

1. Достать из холодильника картридж Xpert GBS и реагенты. Вскрыть упаковку.
2. Достать тампон, содержащий тестируемый клинический материал, из пробирки с транспортной средой, поместить и встряхнуть в камере картриджа Xpert GBS. В случае использования анализатора Gene Xpert по месту лечения вагинально-ректальный мазок можно забрать на тампон без транспортной среды.
3. Закрыть крышку картриджа и поместить его в модуль аппарата GeneXpert Dx и просканировать штрих-код картриджа.
4. В окне Sample ID ввести информацию о пациенте и номер образца.
5. Нажать Start Test.
6. После завершения тестирования картридж извлечь из модуля прибора и поместить в контейнер для утилизации отработанного материала.





* Вследствие низкой чувствительности ИХТ и для определения дальнейшей тактики ведения новорожденного ребенка необходимо подтверждение отрицательного результата ИХТ методом ПЦР-РТ

