



МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФГУ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ДЕРМАТОВЕНЕРОЛОГИИ»

## СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГОНОРЕИ

Сборник стандартных операционных процедур  
(СОП № 003 / 04 ГОН,  
СОП № 004 / 04 ГОН,  
СОП № 005 / 04 ГОН)

Москва, 2008 г.

**СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ  
ПО ПРОВЕДЕНИЮ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ  
ВОЗБУДИТЕЛЯ ГОНОРЕИ**

Сборник стандартных операционных процедур  
(СОП № 003 / 04 ГОН,  
СОП № 004 / 04 ГОН,  
СОП № 005 / 04 ГОН)

УДК 616.973-07:615.071(083.131)  
ББК 55.812+51.949.11  
С76

**Стандартные операционные процедуры по проведению видовой идентификации  
С76 возбудителя гонореи.** – М.: ООО «ДЭКС-ПРЕСС», 2008. – 28 с.  
ISBN 978-5-9517-0038-4

Сборник стандартных операционных процедур впервые разработан в рамках выполнения Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера», утвержденной Постановлением Правительства Российской Федерации от 13 ноября 2001 года № 790, и реализации мероприятий в рамках подпрограммы «О мерах по предупреждению дальнейшего распространения заболеваний, передаваемых половым путем». Четвертая, переработанная и дополненная редакция стандартных операционных процедур подготовлена в рамках подпрограммы «Инфекции, передаваемые половым путем» Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями (2007–2011 гг.)», утвержденной Постановлением Правительства Российской Федерации от 10 мая 2007 года № 280.

Сборник стандартных операционных процедур подготовлен под руководством директора ФГУ «ГНЦД Минздравсоцразвития» академика РАМН, профессора А.А. Кубановой и коллективом авторов: д.м.н. А.А. Кубановым, д.м.н. Н.В. Фриго, н.с. С.А. Полевщиковой, к.б.н. В.С. Соломкой, к.м.н. И.Н. Лесной, к.м.н., доцентом С.В. Ротановым.

УДК 616.973-07:615.071(083.131)  
ББК 55.812+51.949.11

**СТАНДАРТНЫЕ ОПЕРАЦИОННЫЕ ПРОЦЕДУРЫ  
ПО ПРОВЕДЕНИЮ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ  
ВОЗБУДИТЕЛЯ ГОНОРЕИ**

Формат 60×90/8. Усл. печ. л. 3,5. Тираж 500 экз. Заказ № 368-11.

Издатель ООО «ДЭКС-Пресс», 125167 Москва, 4-я ул. 8 Марта, д. ба.

ISBN 978-5-9517-0038-4

© ФГУ «ГНЦД Минздравсоцразвития», 2008  
© Оформление ООО «Дэкс-Пресс», 2008

## СОДЕРЖАНИЕ

I.	ВВЕДЕНИЕ .....	4
II.	ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ОХРАНА ТРУДА.....	4
III.	ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ПЕРСОНАЛА .....	5
IV.	ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ.....	5
V.	БАКТЕРИОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ГОНОРЕИ. СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП № 003/04 ГОН) .....	7
VI.	БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ (КУЛЬТУРАЛЬНЫЙ) МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГОНОРЕИ.СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП № 004/04 ГОН).....	11
VII.	МЕТОДЫ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГОНОРЕИ. СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП № 005/04 ГОН) .....	17
VIII.	ПРИЛОЖЕНИЯ .....	24

## I. ВВЕДЕНИЕ

На фоне широкого применения антимикробных препаратов в последние годы наблюдается тенденция к асимптомному течению гонококковой инфекции, что приводит к позднему ее выявлению, развитию осложнений, имеющих непосредственное отношение к репродуктивной способности человека, а также к затруднениям в лабораторной диагностике.

Диагностика гонореи, как у мужчин, так и у женщин, заключается в проведении бактериоскопии и последующем культуральном исследовании с идентификацией возбудителя по биохимическим свойствам. Однако диагностические возможности этих методов исследования различаются. Чувствительность и специфичность метода окрашивания по Граму при исследовании уретральных образцов, полученных от подростков и взрослых мужчин с клиническими признаками заболевания, превышает 95%. Чувствительность этого же метода при исследовании цервикальных образцов, полученных от взрослых женщин, составляет 45–65%, а специфичность превышает 90%. Не рекомендуется использовать метод окрашивания по Граму при анализе образцов, полученных из других анатомических участков, поскольку достоверность получаемых при этом результатов невысока.

Культивирование микроорганизмов, выделенных из проб биологического материала, на наличие гонококка является в руках врача-лаборанта важным и полезным диагностическим инструментом (чувствительность метода составляет 80–90%). Особенно важно применение этого метода при исследовании патологического материала, полученного из цервикального канала, экстрагенитальных очагов инфекции и при диагностике гонореи у детей.

Завершающим этапом при диагностике гонореи является видовая идентификация возбудителя по биохимическим свойствам.

В ФГУ «ГНЦД Минздравсоцразвития» с 2004 года проводится работа по выполнению мероприятий Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с заболеваниями социального характера» подпрограммы «О мерах по предупреждению дальнейшего распространения заболеваний, передаваемых половым путем», а с 2007 года начала работать новая Федеральная целевая программа «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями (2007–2011 гг.)». Одной из важнейших задач Программы является осуществление мониторинга резистентности *N.gonorrhoeae* к антимикробным препаратам, проводимого в лабораториях двух уровней: ФГУ «ГНЦД Минздравсоцразвития» и региональных лабораториях лечебно-профилактических учреждений дерматовенерологического профиля. Выполнение данной задачи предполагает качественное проведение всех лабораторных исследований, направленных на обнаружение возбудителя гонореи, его выделение в культуре и определение параметров антибиотикорезистентности. В этой связи целью издания данного сборника серии ГОН (диагностика возбудителя гонореи) является обеспечение лабораторных работников, осуществляющих диагностику ИППП, методическими материалами, стандартизирующими проведение исследований, направленных на повышение качества диагностики гонококковой инфекции.

## II. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ОХРАНА ТРУДА

Соблюдение правил техники безопасности и санитарно-противоэпидемического режима на рабочем месте является неукоснительным требованием для выполнения всем допущенным к работе персоналом любого функционального подразделения клинко-диагностических лабораторий, участвующих в выполнении мониторинга резистентности *N.gonorrhoeae* к антимикробным препаратам.

Ответственность за организацию и надзор за соблюдением безопасных условий труда в лабораторном подразделении возлагается в соответствии с приказом по учреждению на руководителя подразделения или выделенное ответственное лицо.

Правила техники безопасности по каждому виду работ разрабатываются заведующим подразделением совместно с ответственным сотрудником, прошедшим специальную подготовку по указанным вопросам. Инструкции по технике безопасности по каждому виду работ после согласования с комиссией местного профсоюзного комитета утверждает руководитель учреждения.

Комплект документов регулярно пересматривается в плановом порядке (1 раз в 5 лет) или внепланово в связи с возникновением внештатной ситуации, а также в связи с внедрением новых методов исследования и приобретением нового оборудования.

Каждый сотрудник получает первичный инструктаж по технике безопасности при приеме на работу или возвращении к данному виду деятельности после длительного перерыва, о чем делается запись по установленной форме в «Журнале проведения инструктажа по технике безопасности».

Повторный плановый инструктаж проводится ежегодно, а внеплановый – при возникновении аварийных ситуаций или по распоряжению администрации учреждения. О прохождении инструктажа и допуске к самостоятельной работе делается отметка под роспись в соответствующем журнале. По согласованию с администрацией учреждения проверка знаний по технике безопасности может контролироваться путем собеседования, экзамена, анкетирования, инспектирования в процессе работы.

### **III. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ ПЕРСОНАЛА**

Сотрудники лаборатории несут ответственность за выполнение ими правил техники безопасности и соблюдение санитарно-эпидемиологического и противопожарного режимов на рабочем месте.

Сотрудникам лаборатории запрещается без разрешения администрации учреждения выносить за пределы рабочей зоны образцы биологических материалов, штаммов и рабочую документацию подразделения.

Сотрудники лабораторий лечебно-профилактических учреждений дерматовенерологического профиля, осуществляющие исследование клинических образцов *N.gonorrhoeae*, несут персональную ответственность за прием правильно маркированного биологического материала на стеклах, полноту, правильность и своевременность проведения комплекса исследований, ведение записей в журналах лаборатории, своевременное заполнение микробиологических паспортов с результатами исследований и отправление их в ФГУ «ГНЦД Росмедтехнологий».

### **IV. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ**

В лаборатории, осуществляющей бактериоскопическую и бактериологическую диагностику гонореи, разрешается использование только сертифицированного и зарегистрированного в Российской Федерации лабораторного оборудования, диагностических наборов, питательных сред и комплектующих расходных материалов.

#### ***Перечень необходимого оборудования***

1. Низкотемпературная морозильная камера – 1 шт.
2. Холодильник бытовой с камерой охлаждения до +4 – +8°C и морозильной камерой на –18 – – 24°C – 2 шт.
3. Ламинарный шкаф с вертикальным потоком воздуха.
4. Микроскоп бинокулярный.
5. Термостат электрический суховоздушный.
6. Инкубатор CO<sub>2</sub>.

7. Прибор для окрашивания мазков по Граму.
8. Прибор для учета реакции на панелях идентификационной системы «BBL Crystal AutoRider».
9. Стерилизатор паровой.
10. Планшеты лабораторные для размещения препаратов.
11. Пластиковые контейнеры для транспортировки биологических материалов (различного объема) без термоизоляции.
12. Пластиковые контейнеры различного объема для сбора и дезинфекционной обработки расходных материалов, ветоши.
13. Рабочий стол для фиксирования и окраски препаратов.
14. Спиртовая или газовая горелка.
15. Песочные часы на 1 и 3 минуты.
16. Стол для микроскопирования.
17. Стол для приема, сортировки биологического материала.
18. Стол для регистрации результатов исследования.
19. Штативы для пробирок.
20. Эксикаторы емкостью 3 и 5 литров.

#### *Перечень необходимых расходных материалов*

1. Транспортная среда, Amies, Испания.
2. 1% раствор метиленового синего.
3. Набор красителей для окраски по Граму.
4. Шоколадный агар (производства Becton Dickinson, USA).
5. Гемоглобин бычий (производства Becton Dickinson, USA).
6. Питательный агар GC Medium Base Agar (производства Becton Dickinson, USA).
7. Ростовые добавки (Isovitalex, производства Becton Dickinson, USA; Polyvitex, производства BioMerieux).
8. Селективная добавка (VCAT, производства Becton Dickinson, USA).
9. Газогенерирующий пакет – CO<sub>2</sub>.
10. Идентификационная система (набор) BBL Crystal Identification Systems Neisseria/ Haemophilus ID, производства Becton Dickinson, USA.
11. Реактив «Оксидаза» (на стандартных бумажных дисках или реагент Ковача).
12. Стандарт мутности № 3, соответствует 0,5 единицы бариевого стандарта МакФарланда.
13. Дезинфицирующие растворы.
14. Журналы для регистрации биологических материалов и результатов их исследования в лаборатории.
15. Медицинские перчатки.
16. Микробиологическая платиновая петля.
17. Набор колб, мерных цилиндров различного объема.
18. Пастеровские пипетки.
14. Стерильные палочки с ватными тампонами (нельзя применять тампоны из полиэстера, так как могут возникать проблемы при учете результатов с помощью авторидера).
15. Стерильный физиологический раствор хлорида натрия.
16. Чашки Петри.
17. Этиловый спирт 96°.
18. Набор красителей для прибора окраски по Граму
19. Диски с нитроцифином.

## V. БАКТЕРИОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ГОНОРЕИ. СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП № 003/04 ГОН)

### ВВЕДЕНИЕ

Цель выполнения процедуры состоит в качественном и стандартизованном проведении исследования клинико-морфологических признаков воспалительной реакции в исследуемом материале больных с подозрением на наличие гонококковой инфекции, поиске и обнаружении внутриклеточного расположения грамотрицательных диплококков в полиморфноядерных нейтрофилах или расположения их на клетках плоского эпителия.

### ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

- **Бактериоскопия** – микроскопическое исследование нативного или окрашенного препарата, приготовленного из биологического материала, полученного из очага инфекции и нанесенного на предметное стекло.
- **Биологические материалы** – материалы, полученные от человека или животного, содержащие, потенциально содержащие или не содержащие патологические биологические агенты: отделяемое или соскоб из очагов инфекции (уретра, простата, цервикальный канал, влагалище, секрет бартолиниевых желез, прямая кишка, рото- и носоглотка, конъюнктив глаза).
- **Патологические биологические агенты (ПБА)** – возбудители инфекционных заболеваний человека или животного (простейшие, бактерии, вирусы, грибы и др.).
- **Фиксирование** – обработка биологического материала, нанесенного на предметное стекло, с целью закрепления для последующего окрашивания.
- **Окрашивание** – обработка биологического материала химическими реагентами для последующего изучения морфологических и тинкториальных свойств микроорганизма, его взаимоотношения с клеточными элементами.
- **Тинкториальные свойства микроорганизмов** – отношение микроорганизма к окраске по Граму.

### ПРОЦЕДУРА

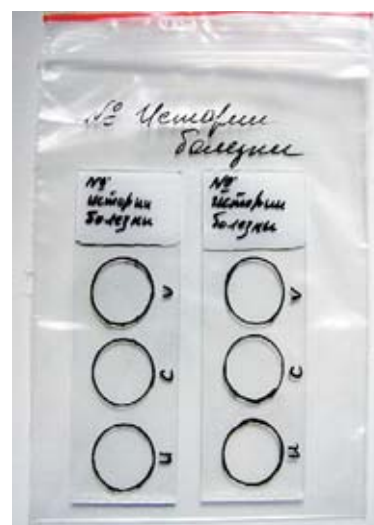
#### *Прием биологического материала в лаборатории.*

Образцы с биологическим материалом доставляют из смотровых кабинетов в лабораторию (рис. 1).

Предоставляют по два предметных стекла с нанесенным биологическим материалом, при этом стекла от каждого пациента должны быть размещены в индивидуальной транспортной упаковке, внутри пластиковых контейнеров для транспортировки. Одновременно в лабораторию предоставляют заполненную форму «Карта-вкладыш в медицинскую карту больного венерическим заболеванием (форма № 065/у)» (Приложение 1).

Для сортировки и разбора биологического материала в лаборатории выделяют специальный столик. Стекла с биологическим материалом, нанесенным на стекла, в индивидуальной транспортной упаковке выкладывают на лоток.

Лаборант тщательно сверяет количество образцов биологического материала с направлениями на исследование и картами-вкладышами (форма № 065/у). При этом проверяется первичная маркировка на стеклах, соответствие



**Рисунок 1.** Маркировка биологического материала для бактериоскопического метода исследования



фамилий или кодовых обозначений, номеров историй болезни и видов лабораторных исследований с указаниями сопроводительной документации.

*При обнаружении отсутствия маркировки и других нарушений, не позволяющих однозначно трактовать индивидуальную принадлежность биологических материалов, лаборант сообщает о невозможности проведения исследования лабораторному работнику, отвечающему за проведение данного исследования, и заведующему лабораторией. Такой образец в обязательном порядке задерживается в лаборатории для разбирательства и принятия окончательного решения.*

Получение биологического материала проводится в соответствии с графиком доставки материала.

### ***Регистрация и маркировка биологического материала***

В лаборатории проводится маркировка поступивших материалов путём нанесения очередного номера на оба поступивших стекла и бланк направления в соответствии с нумерацией в журнале регистрации результатов исследования.

### ***Фиксация биологического материала***

На столе для фиксации и окраски препаратов лаборант размещает стекла и пипеткой наносит на поверхность биологического материала по 0,7 мл 96% этилового спирта на каждое стекло, экспозиция – 3 минуты.

### ***Окрашивание и высушивание препаратов***

Один из двух предоставленных препаратов предназначен для окрашивания 1% раствором метиленового синего с целью выявления клеточных элементов, изучения морфологии и расположения диплококков, второй препарат предназначен для окрашивания по Граму с целью изучения тинкториальных свойств обнаруженного возбудителя. Окраска по Граму является дифференциально-диагностической.

### ***Окрашивание 1% раствором метиленового синего***

После испарения этилового спирта и высыхания препарата пипеткой наносят на поверхность стекла 0,8 мл 1% водного раствора метиленового синего на 1 минуту.

По истечении времени окрашивания препарат промывают под струей водопроводной воды и высушивают на воздухе.

### ***Окрашивание по Граму***

Принцип метода основан на свойстве гонококка при кратковременном выдерживании в обесцвечивающем растворе (деколоризере – смеси этилового спирта с ацетоном) отдавать основной фиолетовый краситель (кристалл-виолет) и докрасиваться в дальнейшем дополнительно красным красителем (сафранином).

### ***Методика окраски состоит из нескольких этапов:***

- на фиксированный высушенный мазок пипеткой наносят 0,8 мл водного раствора кристаллвиолета на 1 минуту;
- по истечении этого времени препарат промывают водопроводной водой;
- на промытый препарат наносят раствор Люголя, при этом время экспозиции в значительной мере зависит от толщины препарата; ориентиром для окончания обработки является изменение окраски препарата из фиолетовой на темно-коричневую (около 30 секунд); препарат вновь промывают водопроводной водой;
- приступают к обработке обесцвечивающим раствором, представляющим собой смесь равных объемов этилового спирта с ацетоном, от 30 секунд до 1 минуты. Время обесцвечива-

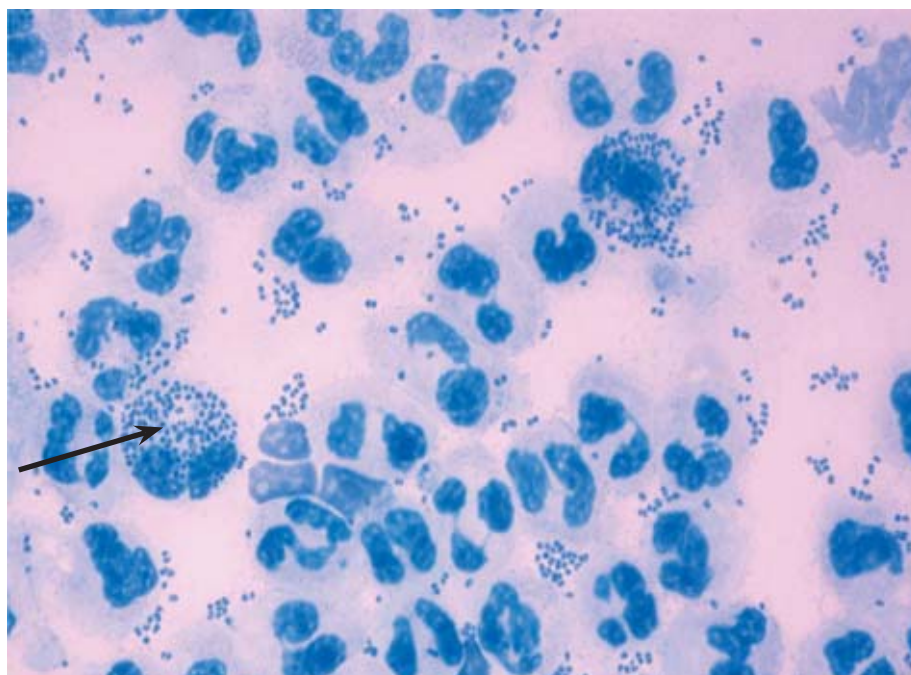
ния зависит также от толщины препарата: обесцвечивание считается достаточным, когда наиболее тонкие участки препарата остаются окрашенными в серо-голубой цвет;

- препарат вновь промывают водопроводной водой;
- на поверхность стекла наносят 0,8 мл водного раствора сафранина на 1 минуту;
- излишек краски смывают с поверхности препарата водопроводной водой;
- препарат высушивают на воздухе.

### **Микроскопия окрашенного препарата**

Изучение окрашенных препаратов проводят в светооптическом микроскопе при увеличении 10×100 (иммерсия).

Препарат, окрашенный 1% метиленовым синим, синего цвета. Ядра эпителиальных клеток и полиморфноядерных нейтрофилов окрашены в синий цвет, цитоплазма – в голубой цвет разной интенсивности.\* Диплококки – темно-синего цвета, своей интенсивной окраской они выделяются на фоне окрашенных форменных элементов. К отличительным признакам диплококков относят бобовидную форму и парное расположение: снаружи кокки имеют выпуклую поверхность, вогнутой стороной они обращены друг к другу. Расположение диплококков напоминает форму кофейного зерна (рис. 2).

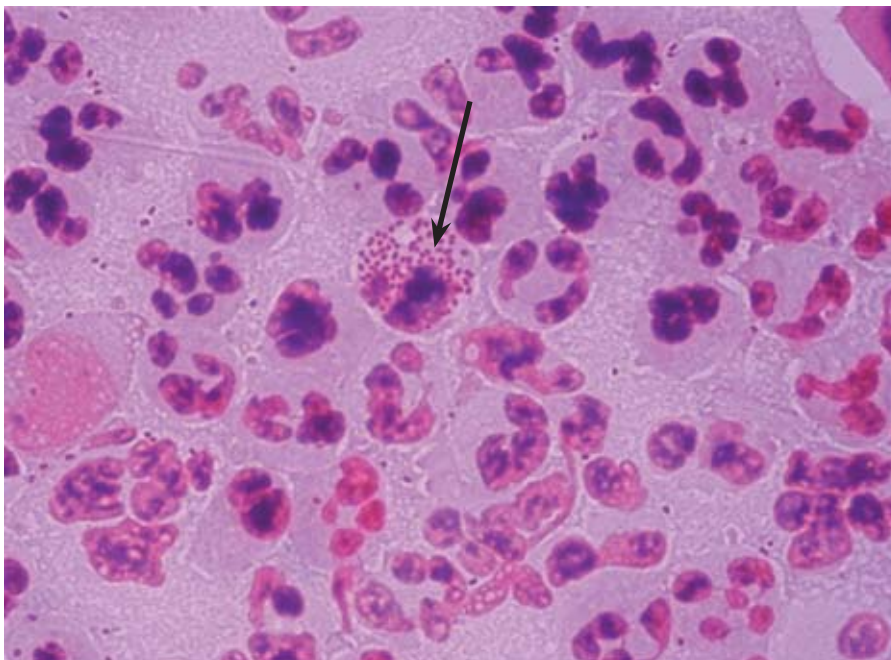


**Рисунок 2.** Диплококк, морфологически сходный с *N.gonorrhoeae* в препарате биологического материала, окраска 1% метилового синего (окуляр – 20, объектив – 100, иммерсионный)

Дифференциальным признаком гонококка является отношение к форменным элементам препарата: гонококки расположены внутриклеточно по отношению к лейкоцитам и поверхностно по отношению к клеткам плоского эпителия. Внутриклеточно каждая пара диплококков по отношению к соседней располагается под углом. Учитывают также и характерное расположение гонококков на клетках плоского эпителия: рядами, с расположением диплококков под углом или перпендикулярно друг к другу внутри ряда.

\* Микроскопия окрашенных препаратов – это этап диагностики гонореи, когда еще не может быть осуществлена точная видовая идентификация возбудителя, поэтому на данном этапе диагностики говорят не о гонококках, а о диплококках, морфологически сходных с *N.gonorrhoeae*.

В правильно окрашенном по Граму препарате ядра клеточных элементов окрашены полностью или частично в фиолетовый цвет, в то время как гонококки, расположенные в лейкоцитах и на эпителиальных клетках, имеют оранжево-красный цвет (рис. 3).



**Рисунок 3.** Диплококк, морфологически сходный с *N.gonorrhoeae* в препарате биологического материала, окраска по Граму.  
(Окуляр – 20, объектив – 100, иммерсионный)

#### *Учет и предоставление результатов*

При идентификации гонококков учитывают три их основных признака: морфологию (форма диплококков), характерное расположение (внутри нейтрофила и на эпителиальных клетках) и тинкториальные свойства (грамотрицательный диплококк). Положительный ответ выдают при наличии всех вышеуказанных признаков.

#### *Форма результата бактериоскопического исследования*

По результатам бактериоскопии формулируется одно из двух заключений:

- **обнаружены** грамотрицательные внутриклеточные и/или внеклеточные диплококки, морфологически сходные с гонококком;
- отрицательные внутриклеточные и/или внеклеточные диплококки, морфологически сходные с гонококком, **не обнаружены**.

В случае положительного ответа окрашенные препараты сохраняют для контроля в течение трех месяцев.

Результаты исследования штаммов гонококка, которые отобраны для включения в мониторинг антибиотикорезистентности и планируются к отправке в ФГУ «ГНЦД Минздравсоцразвития», заносят в «Микробиологический паспорт выделенного штамма возбудителя гонореи» (Приложение № 2). При этом соблюдается этапность внесения результатов исследования выделенного штамма:

- в лабораториях лечебно-профилактических учреждений дерматовенерологического профиля заполняют (Приложение 2);
- в ФГУ «ГНЦД Минздравсоцразвития» – (Приложения 3, 4).

## ИСТОЧНИКИ ОШИБОК

Качественное выполнение бактериоскопического метода исследования зависит от многих факторов, к которым относятся:

1. Техника приготовления препарата.
2. Качество применяемых красителей.
3. Качество окраски препарата (особое значение имеет степень подготовленности персонала для проведения окраски по Граму).
4. Квалификация специалиста, осуществляющего микроскопию препарата.

## VI. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЙ (КУЛЬТУРАЛЬНЫЙ) МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГОНОРЕИ. СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП № 004/04 ГОН)

### ВВЕДЕНИЕ

Цель выполнения процедуры состоит в качественном и стандартном проведении культурального метода исследования при лабораторной диагностике гонококковой инфекции: посеве биологического материала, взятого от больного на питательную среду промышленного или зарубежного производства, и получении роста чистой культуры гонококка, подтверждении морфологических свойств гонококка при последующем микроскопическом исследовании и установлении принадлежности микроорганизма к роду *Neisseria* при проведении теста на оксидазную активность.

### ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

- **Биологические материалы** – материалы, полученные от человека или животного, содержащие, потенциально содержащие или не содержащие патологические биологические агенты: отделяемое и соскоб из очагов инфекции (уретра, простата, цервикальный канал, влагалище, секрет бартолиновых желез, прямой кишки, рото- и носоглотка, конъюнктивы глаз).
- **Патологические биологические агенты (ПБА)** – возбудители инфекционных заболеваний человека или животного (простейшие, бактерии, вирусы, грибы и др.).
- **Культуральный метод** – посев биологического материала на питательные среды с целью обнаружения и выделения возбудителя в чистой культуре, масса которой увеличивается в процессе роста.
- **Питательная среда** – субстрат, содержащий все необходимые компоненты для обеспечения роста и размножения исследуемого микроорганизма.
- **Селективная питательная среда** – питательная среда, содержащая определенные добавки (антибиотики, антибактериальные вещества), ограничивающие рост и размножение сапрофитных бактерий и грибов и дающие преимущественные возможности для роста группы изучаемых микроорганизмов.
- **Неселективная питательная среда** – питательная среда для выделения микроорганизмов, не содержащая ингибиторов роста сапрофитных микроорганизмов.
- **Транспортная среда** – среда, предназначенная для сохранения жизнедеятельности микроорганизмов.
- **Оксидазная активность** – биологическое свойство микроорганизма вырабатывать фермент цитохромоксидазу.
- **Чистая культура** – скопление микробных клеток одного вида, выращенных на плотной или жидкой питательных средах.



## ПРОЦЕДУРА

### *Приготовление питательных сред*

#### *Приготовление основы питательной среды «GC Medium Agar Base»*

В соответствии с инструкцией по приготовлению «GC Medium Agar Base» навеску препарата растворяют в определенном объеме деионизированной воды при подогревании на водяной бане до температуры +100°C. После полного растворения питательную среду разливают по колбам для стерилизации (15 минут в паровом автоклаве при 121°C).

#### *Приготовление неселективной питательной среды на основе «GC Medium Agar Base»*

Питательную среду после стерилизации охлаждают до температуры 45–50°C.

В основу питательной среды на каждые 100,0 мл вносят предварительно разведенные концентраты ростовой добавки («Isovitalex» или «Polyvitex» – по 2,0 мл) и гемоглобина бычьего – по 100 мл. Полученную питательную среду разливают в стерильные пластиковые чашки Петри диаметром 60–90 мм.

#### *Приготовление селективной питательной среды на основе «GC Medium Agar Base»*

Питательную среду после стерилизации охлаждают до температуры 45–50°C.

В основу питательной среды на каждые 100,0 мл вносят предварительно разведенные концентраты ростовой («Isovitalex» или «Polyvitex» – по 1,0 мл) и селективной («VCAT» – по 1,0 мл) добавок, гемоглобина бычьего – по 100 мл. Полученную питательную среду разливают в стерильные пластиковые чашки Петри диаметром 60–90 мм.

#### *Приготовление обогащенной питательной среды на основе*

*«Питательной среды для выделения гонококка, сухой», производства ФГУП «НПО «Микроген»*

Во флаконы с лиофилизированной основой добавляют необходимое количество стерильной деионизированной воды, выдерживают для набухания и подогревают на водяной бане до растворения.

Лиофилизированную обогащающую добавку также растворяют в стерильной деионизированной воде (но без подогревания) и добавляют к остуженной до +50°C основе среды, тщательно перемешивая.

#### *Приготовление селективной питательной среды на основе*

*«Питательной среды для выделения гонококка, сухой», производства ФГУП «НПО «Микроген»*

Для получения селективной среды к полученной питательной среде добавляют 1,0 мл селективной добавки («VCAT»).

Полученную питательную среду разливают в стерильные пластиковые чашки Петри диаметром 60–90 мм.

### *Приготовление криосреды*

Навеску триптиказо-соевого бульона 3 грамма растворить в 100 мл дистиллированной воды, хорошо перемешать. Полученную смесь нагреть на водяной бане до полного растворения, затем автоклавировать при 121°C 15 минут. Глицерин автоклавировать при 121°C 15 минут 3 раза.

Для приготовления криосреды необходимо смешать триптиказо-соевый бульон и глицерин в соотношении 4:1 (например, для приготовления 20 мл криосреды необходимо взять 16 мл бульона и 4 мл глицерина).

Готовую криосреду разливают в стерильных условиях в стерильные эппендорфы по 1 мл. Эппендорфы с криосредой хранятся в холодильнике (+2°C... +8°C) в течение 1 месяца.

Следует заморозить культуру гонококка в криосреде при температуре –20° –40° –80°C.

### ***Контроль качества приготовленной среды***

После застывания агара чашки, которые будут использованы на следующий день, помещают в термостат с температурой +37°C на 24 часа, при этом происходит удаление конденсата на крышке чашек и одновременно производится контроль стерильности питательной среды.

Остальные чашки с питательной средой маркируют, отмечая наименование среды и дату приготовления, и до использования их сохраняют в герметичных пластиковых пакетах в бытовом холодильнике при +4°C до двух недель.

Перед началом использования каждой вновь приготовленной партии чашек контролируется качество питательной среды с применением референс-штамма *N.gonorrhoeae* ATCC 49226.

### ***Получение образцов биологического материала в лаборатории***

Образцы биологического материала доставляются из смотровых кабинетов в лабораторию в пробирках с транспортной средой (рис. 4). Одновременно в лабораторию предоставляются «Карты-вкладыши в медицинскую карту больного венерическим заболеванием (форма № 065/у)» (Приложение 1).

Для получения биологического материала в лаборатории выделяют специальный столик для сортировки.

Лаборант тщательно сверяет количество образцов биологического материала с направлениями на исследование. При этом проверяются: первичная маркировка на пробирках, соответствие фамилий или кодовых обозначений, номеров историй болезни и видов лабораторных исследований с указаниями сопроводительной документации и картами-вкладышами.

*При обнаружении отсутствия маркировки и других нарушений, не позволяющих однозначно трактовать индивидуальную принадлежность биологических материалов, лаборант сообщает о невозможности проведения исследования лабораторному работнику, отвечающему за проведение данного исследования, и заведующему лабораторией. Такой образец **в обязательном порядке** задерживается в лаборатории для разбирательства и принятия окончательного решения.*



**Рисунок 4.** Транспортная среда

### ***Проведение посева на питательную среду***

Полученный биологический материал необходимо сразу же нанести на питательные среды (селективную или неселективную).

Необходимое число чашек со средой достают из бытового холодильника, согревают в термостате при 37°C и переносят в ламинарный шкаф с вертикальным потоком воздуха, где проводят посев материала в стерильных условиях, с соблюдением правил асептики тампон с образцом биологического материала извлекают из пробирки с транспортной средой и производят посев на поверхность питательной среды зигзагообразными движениями тампона. После этого на крышке чашки Петри отмечают код пациента, очаг инфекции и дату посева.

### ***Инкубация***

Непосредственно сразу после посева биоматериала чашки Петри помещают в CO<sub>2</sub>-инкубатор или в эксикаторы, которые обеспечивают сохранение стабильной атмосферы повышенного содержания углекислого газа (5–10%) и влажности, обеспечиваемое за счет помещения в эксикаторы газогенерирующих пакетов CO<sub>2</sub> и влажных тампонов. Эксикаторы переносят в термостаты, где производится инкубация при температуре 35±1°C. Через 24 часа инкубации чашки Петри или эксикаторы переносят в ламинарный шкаф и проводят контрольный просмотр засеянных чашек на наличие или отсутствие роста колоний микроорганизмов.

Чашки с наличием признаков роста колоний микроорганизмов оставляют в ламинарном шкафу для дальнейшего исследования.

### ***Макроскопическое изучение колоний***

После 24 часов инкубации колонии гонококка могут достигать размеров 0,5–2,0 мм в диаметре, округлой формы, непрозрачные, выпуклые, с блестящей поверхностью. Окраска колоний: от белого до серого цвета, что в значительной мере зависит от состава используемой питательной среды.

Наиболее характерные колонии маркируются для приготовления из них препаратов для последующей микроскопии.

Посевы на чашках, не давшие роста, вновь помещают в CO<sub>2</sub>-инкубатор или эксикатор для дальнейшего роста культур *N.gonorrhoeae*. Наблюдение за ростом проводится в течение еще 48 часов с промежуточным контролем через сутки.

При отсутствии признаков роста через 72 часа инкубации наблюдение прекращают.

### ***Приготовление препаратов из выросших культур микроорганизмов для микроскопии***

Из чашек с признаками роста культур стерильной бактериологической петлей снимают наиболее характерные для гонококка колонии, переносят материал на поверхность предметного стекла и круговыми движениями суспензируют в капле воды или физиологического раствора (готовят препарат для микроскопии), при этом отмечают характерный признак колоний гонококка – слизистую консистенцию бактериальной суспензии.

### ***Фиксация биологического материала***

На столе для фиксации и окраски препаратов лаборант размещает стекла с препаратами и пипеткой наносит по 0,7 мл 96 % этилового спирта на каждое стекло, экспозиция – 5 минут.

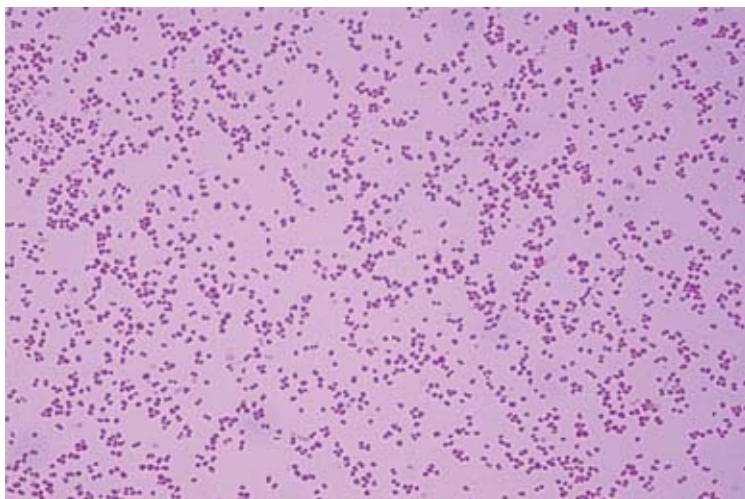
### ***Окраска по Граму***

Принцип метода основан на свойстве гонококка при выдерживании определенное время в смеси этилового спирта с ацетоном отдавать основной фиолетовый краситель (кристалл-виолет) и в дальнейшем воспринимать дополнительно красный краситель (сафранин).

Методика окраски заключается в следующем: на фиксированный высушенный мазок пипеткой наносят 0,8 мл раствора кристаллвиолета на 1 минуту, по истечении этого времени препарат промывают водопроводной водой, после чего наносят раствор Люголя на 30 секунд. Препарат вновь промывают водопроводной водой и приступают к обесцвечиванию в смеси этилового спирта с ацетоном от 30 секунд до 1 минуты, время обесцвечивания зависит от толщины препарата, обесцвечивание считается достаточным, когда наиболее тонкие участки препарата остаются окрашенными в серовато-голубоватый цвет. Препарат вновь промывают водопроводной водой. На поверхность стекла наносят 0,8 мл раствора сафранина на 1 минуту. Препарат промывают водопроводной водой и высушивают на воздухе.

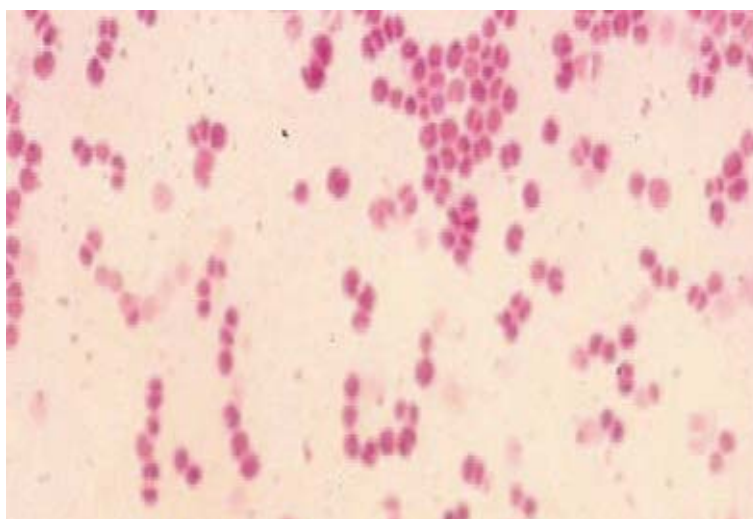
### **Микроскопия окрашенного препарата**

Изучение окрашенных препаратов проводят в светооптическом микроскопе при увеличении 20×100 (иммерсия). Наблюдают скопления грамтрицательных диплококков, имеющих более компактное расположение микроорганизмов в центре и разреженное и неравномерное их распределение по периферии (рис. 5,6).



**Рисунок 5.** Окрашенный по Граму препарат, приготовленный из 24-часовой культуры *N.gonorrhoeae* (окуляр – 10, объектив – 90, иммерсионный)

Препарат, правильно окрашенный по Граму, сохраняет фиолетовую окраску в центре скоплений с постепенным переходом в оранжево-красный цвет к периферии скоплений (рис. 6)



**Рисунок 6.** Чистая культура *N.gonorrhoeae*, окраска по Граму (окуляр – 20, объектив – 100, иммерсионный)

В культуре отмечается полиморфизм кокков как по форме, так и по величине, что зависит от возраста культуры и происходящих процессов лизиса. Интенсивность окраски кокков также зависит от фазы роста. Одновременно отмечают степень чистоты изучаемой культуры.



### Определение оксидазной активности колоний микроорганизмов (тест на продукцию цитохромоксидазы)

Принцип метода основан на том, что в присутствии цитохромоксидазы и кислорода бесцветные вещества подвергаются оксидации и образуют индофенол синий.

Испытание культур на цитохромоксидазную активность проводят с использованием чистой суточной культуры одним из методов:

- а) **прямой метод** – с использованием реагента Ковача, 1 капля которого наносится на тестируемую колонию в чашке Петри (рис. 7);

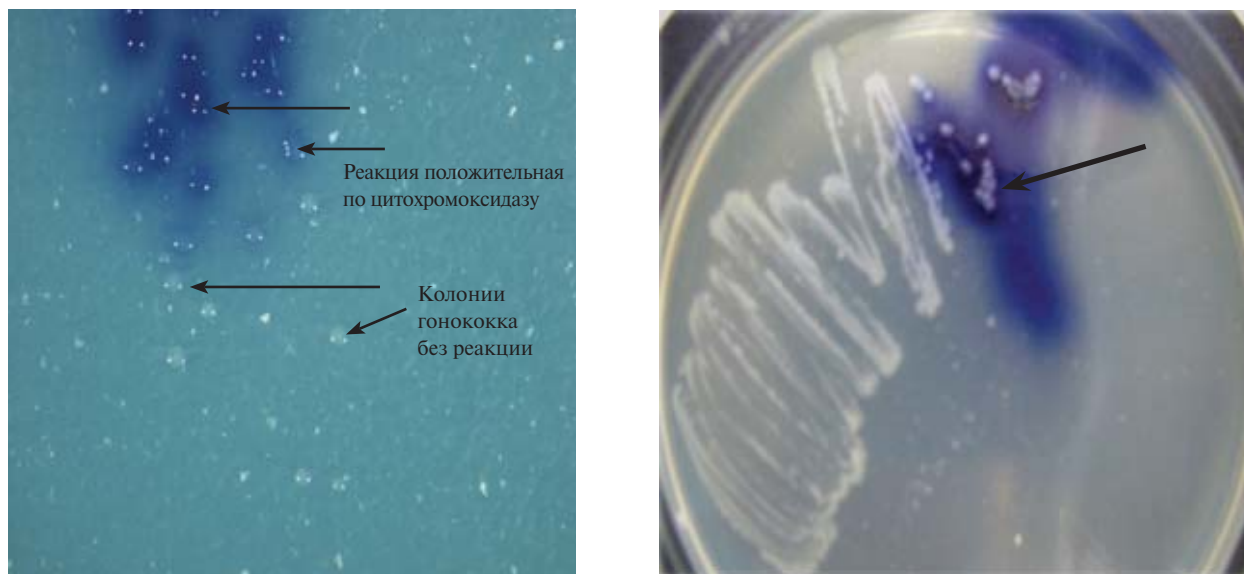


Рисунок 7. Тест на оксидазную активность с использованием реагента Ковача

- б) **непрямой метод** – с использованием бумажных дисков: платиновой петлей или стерильной стеклянной палочкой испытуемую культуру наносят на диск, предварительно слегка смоченный дистиллированной водой.

Темно-лиловое или синее окрашивание, появляющееся через 10–30 секунд, свидетельствует о положительной оксидазной реакции, отсутствие изменения цвета – об отсутствии данного фермента.

#### Внимание!

- Во избежание ложноположительных реакций не следует применять стальную или никромовую проволоку при проведении оксидазного теста, так как возможно поверхностное окисление этих металлов.
- Для учета результатов важно соблюдение временного интервала 10–30 секунд.
- Оксидазный тест, ввиду его важности для идентификации, следует проводить со всеми грамотрицательными бактериями.

#### Учет и предоставление результатов

Предварительная идентификация *N. gonorrhoeae* осуществляется на основании:

- изучения морфологических свойств гонококка (рост на селективной питательной среде через 24–48 часов, колонии размером 0,5–2,0 мм в диаметре, округлой формы, непрозрачные, выпуклые, с блестящей поверхностью; окраска колоний: от белого до серого цвета);
- положительной оксидазной пробы;

- наличия в окрашенном по Граму мазке монокультуры грамотрицательных диплококков (имеются скопления микроорганизмов с более компактным расположением их в центре и разреженным – по периферии, с сохранением фиолетовой окраски в центральной части скоплений и постепенным переходом в оранжево-красный цвет к периферии, отмечается полиморфизм культуры как по форме, так и по величине, различие по интенсивности окраски).

Подтверждающая идентификация *N. gonorrhoeae* осуществляется с помощью биохимических тестов.

Положительный ответ выдают при наличии всех вышеуказанных признаков. В случае положительного ответа окрашенные препараты сохраняют для контроля в течение трех месяцев.

Результаты исследования штаммов возбудителя гонореи, отобранных для предоставления в ФГУ «ГНЦД Минздравсоцразвития», заносят в Микробиологический паспорт выделенного штамма возбудителя ИППП (Приложение 2). При этом соблюдается этапность внесения сведений:

- для лабораторий лечебно-профилактических учреждений дерматовенерологического профиля (Приложение 2);
- для ФГУ «ГНЦД Минздравсоцразвития» (Приложение 3, 4).

## ИСТОЧНИКИ ОШИБОК

Качественное выполнение бактериологического метода исследования зависит от многих факторов:

- 1) подготовка пациента для взятия биологического материала;
- 2) правильность получения биологического материала для исследования;
- 3) использование транспортной среды;
- 4) условия приготовления и последующего хранения питательных сред;
- 5) наличие контроля качества приготовленных питательных сред;
- 6) наличие контрольных штаммов;
- 7) проведение контроля качества реагентов для постановки оксидазного теста;
- 8) качество окраски препарата по Граму;
- 9) квалификация специалиста, осуществляющего посев, культивирование и микроскопию препарата.

## VII. МЕТОДЫ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ГОНОРЕИ. СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА (СОП № 005/04 ГОН)

### ВВЕДЕНИЕ

Цель выполнения процедуры состоит в качественном и стандартном проведении видовой идентификации культур микроорганизмов при тестировании клинических изолятов в панелях BBL Crystal Identification Systems Neisseria/Haemophilus ID», последующем автоматизированном учете результатов с помощью прибора BBL Crystal Auto Rider и анализе результатов тестирования с помощью компьютерной программы BBL Crystal Mind либо API-system.

### ТЕРМИНЫ И ОБОЗНАЧЕНИЯ

- **Видовая идентификация микроорганизма** – установление конкретной таксономии микроорганизма на основе его природных биохимических свойств по ферментации, окислению, деградации и гидролизу различных субстратов, примененных в тестируемом наборе.

- **Биологические материалы** – материалы, полученные от человека или животного, содержащие, потенциально содержащие или не содержащие патологические биологические агенты: отделяемое из очагов инфекции (уретра, простата, цервикальный канал, влагалище, секрет бартолиновых желез, прямой кишки, рото- и носоглотка, конъюнктив глаза).
- **Патологические биологические агенты (ПБА)** – возбудители инфекционных заболеваний человека или животного (простейшие, бактерии, вирусы, грибы и др.).
- **Культуральный метод** – посев биологического материала на питательные среды с целью обнаружения и выделения возбудителя в чистой культуре, масса которой увеличивается в процессе роста.
- **Питательная среда** – субстрат, содержащий все необходимые компоненты для обеспечения роста и размножения исследуемого микроорганизма.

## ПРОЦЕДУРА

### *Метод видовой идентификации *N.gonorrhoeae* с использованием тест-панели BBL Crystal Identification Systems Neisseria/Haemophilus ID (N/H ID)*

**Принцип метода:** в тест-панели BBL Crystal Identification Systems Neisseria/Haemophilus ID (N/ H ID) используется комплекс микрометодов, необходимый для биохимической идентификации микроорганизмов, относящихся к таксономическому роду Neisseria и Haemophilus. Тесты, применяемые в системе, основаны на микробной утилизации и деградации специфических субстратов, обнаруживаемых различными индикаторными системами.

На крышке тест-панели содержатся 29 высушенных биохимических и ферментативных субстратов и флюоресцентный контроль.

Основание тест-панели имеет 30 реакционных лунок для внесения бактериальной взвеси.

При соединении крышки и основания тест-панели инокулирующая жидкость регидратирует субстраты и инициирует реакции ферментации.

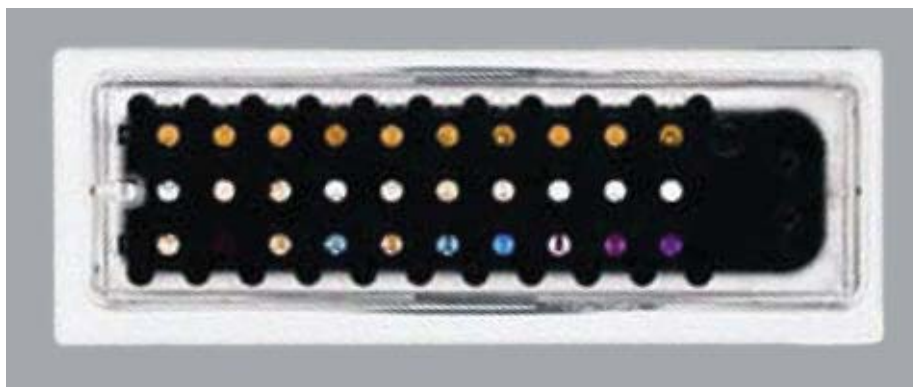
По окончании инкубации исследуют изменение цвета субстрата или присутствие в нем флюоресценции, что является результатом метаболической (гидролизной) активности микроорганизмов.

### *Приготовление суспензии микроорганизма для тестирования*

Для приготовления суспензии тестируемого микроорганизма используют чистую 24-часовую культуру, выращенную на средах, не содержащих в своем составе желчи (например, шоколадный агар, GC Medium Agar Base, колумбийский агар с 5%-кровью).

В стерильных условиях в ламинарном шкафу раскрывают упаковку крышек из набора BBL Crystal Identification Systems Neisseria/Haemophilus ID (вскрытые крышки тест-панели должны быть использованы в течение 1 часа). В пробирку с инокулирующей жидкостью кончиком стерильного ватного тампона переносят материал нескольких одинаковых по морфологическим свойствам колоний микроорганизмов, закрывают колпачок и в течение 10–15 секунд перемешивают содержимое. Концентрацию приготовленной суспензии оценивают по стандарту мутности: она должна соответствовать стандарту МакФарланда № 5. При получении недостаточной концентрации в пробирку добавляют материал дополнительных колоний микроорганизма. В случае получения более концентрированной суспензии добавляют необходимое количество стерильного 0,85% физиологического раствора. При этом по окончании процедуры удаляют излишки инокулирующей жидкости, доводят ее количество до первоначального значения – 2,3 мл.

На крышке панели отмечают код или номер изучаемого образца.



**Фотография 1.** Тест-панель

BBL Crystal Identification Systems Neisseria / Haemophilus ID (N/H ID) (США)

В специально выделенную полость основания панели переливают инокулирующую жидкость. Круговыми плавными движениями вращают основание панели, чтобы жидкость прошла весь лабиринт и заполнила все лунки. Излишек жидкости возвращают в исходную зону вращением основания панели в обратную сторону. Основание панели накрывают крышкой, совмещают маркированные концы и защелкивают панель, при этом должны быть слышны два характерных щелчка.

#### ***Контроль чистоты культуры при проведении видовой идентификации***

Небольшое количество суспензии из пробирки стерильной бактериологической петлей засевают на чашку с питательной средой. Засеянные чашки инкубируют в термостате при  $+35 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 24 часов, после чего проводится контроль чистоты культуры инокулята. Таким образом, результаты контроля становятся известны уже после завершения видовой идентификации культуры.

#### ***Инкубация тест-панелей***

Инокулированные тест-панели лицевой стороной вниз переносят в термостат с температурой  $+35\text{--}37^\circ\text{C}$  и влажностью 40–60%, время инкубации 10–12 часов.

#### ***Учет результатов тестирования***

По окончании инкубации тест-панели достают из термостата. При учете результатов панель лицевой стороной обращена вниз.

Результаты теста возможно учитывать *ad oculus* (под контролем глаз) или с помощью автоматического прибора для учета реакции на панелях идентификационной системы BBL Crystal Auto Reader.

#### ***Учет результатов *ad oculus* (под визуальным контролем)***

Учет результатов тестирования проводят с помощью прибора для просмотра панелей, BBL Crystal Panel Viewer (фотография 2), с применением карты цветных реакций и/или таблиц для интерпретации результатов. Для записи данных используют специальный блокнот для регистрации. Используя источник обычного света, учитывают колонки от F до J. Затем с источником ультрафиолетового света учитывают результаты колонок от A до E (флюоресцентные субстраты). Флюоресцентные субстраты признают позитивными в том случае, если интенсивность выше, чем в лунках с отрицательным контролем – 4A.

### ***Подсчет профильного номера***

Каждый положительный результат теста имеет значение 4, 2 или 1 балл, любой отрицательный – 0 баллов.



**Фотография 2.** BBL Crystal PanelViewer (США) и комплект цветных карт

Положительные результаты, выраженные в баллах, записывают в каждой ячейке таблицы, затем суммируют данные в вертикальных рядах, получают 10-значный профильный номер, который отражает результат идентификации микроорганизма. По этому профильному номеру с помощью компьютерной программы или вручную по каталогу BBL Crystal N/H ID находят таксономическое название изолята. Например, профильный номер *N.gonorrhoeae* 1752400000.

### ***Учет результатов с помощью автоматического ридера BBL Crystal Auto Reader***

Включают прибор автоматический ридер BBL Crystal Auto Reader (фотография 3), выжидают необходимое время для прохождения цикла прогрева лампы, вводят данные о маркировке исследуемой тест-панели:

- вводный номер;
- идентификационный номер пациента и имя пациента;
- тип примененной панели (BBL Crystal Identificacion Systems Neisseria/Haemophilus ID);
- результаты дополнительных офлайн-тестов: оксидаза, индол и др.). Проводят сканирование инкубированной панели. Результаты сканирования и последующей компьютерной интерпретации полученных результатов высвечиваются на панели прибора.

### ***Контроль качества работы прибора***

Для оценки контроля качества работы прибора рекомендуется 1 раз в две недели проводить контрольное сканирование референс-панели, поставляемой в комплекте данного прибора.

При правильном сканировании референс-панели (надпись «passed») можно продолжать работу с прибором, при нарушении проведения сканирования (надпись «failed») следует обратиться за сервисной поддержкой в инженерную службу.

### ***Предоставление результатов***

При несоответствии 10-значного профильного номера, являющегося цифровым кодом полученных результатов критериям, заложенным в исследовательской программе, компьютер выдает заключение о сомнении в надлежащей чистоте исследуемой культуры.





**Фотография 3.** BBL Crystal AutoRider (США)

Результаты видовой идентификации исследуемого микроорганизма заносят в Микробиологический паспорт выделенного штамма возбудителя гонореи (Приложение 3).

#### ***Метод видовой идентификации *N. gonorrhoeae* с использованием Rapid NH System (USA)***

Принцип метода основан на применении комплекса микрометодик, необходимых для идентификации микроорганизмов; в каждую лунку панели внесены дегидратированные субстраты и хромогены. При метаболической утилизации этих субстратов исследуемым микроорганизмом происходит изменение окраски соответствующего хромогена.

#### ***Приготовление суспензии микроорганизма для тестирования***

Для приготовления суспензии используют чистую суточную культуру исследуемого микроорганизма. Перед началом процедуры видовой идентификации предварительно проводят контрольное исследование чистоты культуры путем микроскопии окрашенного по Граму препарата, приготовленного из материала типичных колоний.

Суспензию культуры готовят в стерильных условиях ламинарного шкафа: в пробирку с инокулирующим раствором (стерильным изотоническим раствором хлорида натрия) кончиком стерильного ватного тампона переносят материал нескольких одинаковых по морфологическим свойствам колоний микроорганизмов, закрывают стерильной пробкой и в течение 10–15 секунд перемешивают содержимое. Концентрацию приготовленной суспензии оценивают по стандарту мутности: она должна соответствовать стандарту МакФарланда № 5. При получении недостаточной концентрации в пробирку добавляют материал дополнительных колоний микроорганизма. В случае получения более концентрированной суспензии добавляют необходимое количество стерильного 0,85% физиологического раствора. Далее производится внесение суспензии культуры в тест-панель, инкубация.

На панели тест-системы отмечают код или номер изучаемого образца.

В каждую лунку тест-панели вносят равное количество приготовленной взвеси микроорганизма, накрывают адгезивной пленкой, помещают в термостат при температуре  $+35,0 \pm 1^\circ\text{C}$  и инкубируют в течение 10–12 часов.

#### ***Контроль чистоты культуры***

Стерильной бактериологической петлей берут образец приготовленной суспензии из пробирки и засевают на чашку с питательной средой. Засеянные чашки инкубируют в термостате

при  $+35,0 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 24–48 часов, после чего проводится контроль чистоты культуры инокулята. Таким образом, результаты контроля становятся известны уже после завершения видовой идентификации культуры.

### Учет результатов тестирования

По окончании инкубации панель вынимают из термостата.

При регистрации результатов исследования отмечают совпадение или отличие цвета субстрата в каждой лунке панели с обозначениями, имеющимися в стандартном бланке регистрации результатов. При совпадении цвета каждой отдельной лунки с указаниями цвета в ячейке бланка в соответствующую графу заносят цифровую пометку (в соответствии с цифровым кодом этой ячейки 1, 2 или 4 балла) (таблица 1).

После первичной регистрации результатов в лунки 8, 9 и 10 добавляют по 2 капли указанных реагентов и вновь оценивают результат реакции.

Таблица 1

Бланк учета результатов видовой идентификации микроорганизма в тест-системе Rapid NH Sistem (USA)

Реагент	Не добавляют											Nitrate A&B	Spo t indol	Nitrite A&B
	желтый			желтый или желтовато-оранжевый			розовый	желтый	красный	красный с фиолетовым оттенком	красный или оранжевый	коричневый или черный	бесцветный или оломенного цвета	
№ лунки	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	9	10	8	
Изучаемый тест	PRO	GGT	ONPG	GLU	SUC	EST	RES	PO <sub>4</sub>	OR-N	URE	NO <sub>3</sub>	IND	NO <sub>2</sub>	
Код ячейки в баллах	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4		
Результат теста*	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Суммарный код теста*	1			1			0			0				

\* Ячейки заполняют в процессе регистрации результатов исследования.

В заключение процесса регистрации результатов отдельных лунок данные, внесенные в бланк, соотносятся между собою, при этом проводится формирование суммарного кода.

Используя цифровое выражение полученного суммарного кода, в каталоге кодов Rapid NH Sistem находят таксономическое наименование идентифицируемого микроорганизма. Например, суммарный код 1100 соответствует *N.gonorrhoeae*.

### Предоставление результатов идентификации

При получении суммарного кода, не соответствующего ни одному из приведенных в каталоге, исследование видовой идентификации следует повторить полностью, при этом особое внимание обратить на контроль чистоты выделенной культуры.

Результаты видовой идентификации исследуемого микроорганизма заносят в Микробиологический паспорт выделенного штамма возбудителя ИППП для предоставления

в ФГУ «ГНЦД Минздравсоцразвития» (Приложение 2 и Приложение 3) для ФГУ «ГНЦД Минздравсоцразвития РФ».

#### **Форма результата бактериологического исследования**

*N.gonorrhoeae* обнаружена

*N.gonorrhoeae* не обнаружена

### **ИСТОЧНИКИ ОШИБОК**

Качественное выполнение процедуры видовой идентификации возбудителя гонореи зависит от многих факторов:

- 1) адекватных условий хранения применяемых тест-панелей (BBL Crystal Identification Systems Neisseria/Haemophilus ID или Rapid NH Sistem);
- 2) регулярности и правильности проведения калибровки и внутрिलाбораторного контроля работы прибора BBL Crystal AutoRider (в соответствии с инструкцией по работе на приборе);
- 3) правильности проведения предварительного контроля чистоты культуры с применением окраски по Граму;
- 4) квалификации специалиста, осуществляющего исследование видовой идентификации микроорганизмов.

### **ПРОВЕДЕНИЕ ВНУТРИЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ИССЛЕДОВАНИЙ**

Для обеспечения качества работ по видовой идентификации микроорганизмов в соответствии с требованиями GLP необходимо планировать и регулярно проводить контрольные исследования.

Одной из форм внутрिलाбораторного контроля является определение видовой идентификации уже известных стандартных штаммов возбудителя, например референс-штамма *N.gonorrhoeae* ATCC 49226.



**Карта-вкладыш в медицинскую карту больного  
венерическим заболеванием (форма № 065/у)**

(код и наименование подразделения медицинского учреждения, в котором заполнена карта-вкладыш)

**Паспортные данные и данные анамнеза пациента**

1. Кодовый номер пациента: \_\_\_\_\_
2. Гражданство России: да / нет / неизвестно
3. Пол: муж. / жен. \_\_\_\_\_
4. Дата рождения / \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_/
5. Место постоянного жительства \_\_\_\_\_
6. Профессиональные вредности \_\_\_\_\_
7. Причина обращения (активный визит, по контакту, профосмотр, другое): \_\_\_\_\_
8. Курение: нет/да \_\_\_\_\_
9. Наркотики: нет/да \_\_\_\_\_
10. Алкоголь нет/умеренно/да
11. ВИЧ-статус пациента: неизвестно / отрицательный / положительный
12. Частота половых контактов: редко /1–3 раза в неделю / часто
13. Половой партнер: непостоянный / постоянный
14. ИППП в прошлом: неизвестно / нет / да; если да, то когда \_\_\_\_\_
15. Лечение ИППП в прошлом: самолечение / у венеролога / у другого специалиста
17. Продолжительность лечения антибиотиками \_\_\_\_\_ дней; полный / прерванный курс
18. Предполагаемое место и дата заражения ИППП: \_\_\_\_\_
19. Миграция за последние 6 месяцев: \_\_\_\_\_
20. \_\_\_\_\_

*ФИО, должность, подпись и личная печать врача, заполнившего карту-вкладыш*

« \_\_\_ » \_\_\_\_\_ г.

## Микробиологический паспорт выделенного штамма возбудителя гонореи

<i>N.gonorrhoeae</i> (таксономическая характеристика возбудителя)	Единый код штамма _____ (не заполняется)
--	--

### Паспортные данные и данные анамнеза пациента

1. Кодовый номер пациента: \_\_\_\_ 2. Пол:  муж.;  жен. 3. Возраст (полных лет) \_\_\_\_\_;
4. Расовая принадлежность:  европеоидная (балтийская, средневропейская, кавказско-балканская) – (подчеркнуть);  монголоидная;  негроидная;
5. Место жительства:  житель данного субъекта РФ;  житель другого субъекта РФ: \_\_\_\_\_; житель СНГ: \_\_\_\_\_;  житель дальнего зарубежья: \_\_\_\_\_;  бомж
6. Миграция внутренняя (Россия) за последние 6 месяцев (куда, сколько раз) \_\_\_\_\_
7. Миграция внешняя (СНГ, страны Балтии, дальнее зарубежье) за последние 6 месяцев (куда, сколько раз) \_\_\_\_\_
8. Семейное положение:  не женат/не замужем;  женат/замужем/гражданский брак;  родственник
9. Образование:  неполное среднее;  среднее;  среднее специальное;  неполное высшее;  высшее
10. Род занятий:  рабочий;  служащий;  учащийся,  не работает;  пенсионер;  домохозяйка,  другое \_\_\_\_\_
11. Относится к группе риска:  по злоупотреблению алкоголем;  по употреблению наркотических веществ;  по частой смене половых партнеров;  как занятый в профессиональной проституции;  как социально неадаптированный: бомж, беспризорный, психически больной (*подчеркнуть*)
12. Число сексуальных партнеров за последний год: \_\_\_\_\_, из них постоянных \_\_\_\_\_
13. Частота использования презерватива:  всегда;  часто,  иногда;  никогда;
14. Сексуальная ориентация:  гетеросексуальная;  гомосексуальная;  бисексуальная
15. Обстоятельство выявления:  активный визит;  по контакту,  проф.осмотр,  другое \_\_\_\_\_
16. Тестирование на ВИЧ:  положительный,  отрицательный,  неизвестно
17. Сопутствующие инфекции:  сифилис;  трихомониаз;  хламидиоз;  гепатиты В/С;  туберкулез;  др. \_\_\_\_\_
18. ИППП в прошлом:  да,  нет,  неизвестно; если «да», то когда \_\_\_\_\_ диагноз \_\_\_\_\_
19. Лечение ИППП в прошлом:  самолечение,  у венеролога,  у другого специалиста: \_\_\_\_\_
20. Прием антибактериальных препаратов за последние 6 месяцев:  да,  нет,  неизвестно; если «да», то: по назначению врача: сколько раз \_\_\_\_\_; название препаратов/ дозировка /длительность приема (дни) \_\_\_\_\_  
самостоятельно: сколько раз \_\_\_\_\_; причина \_\_\_\_\_ название препаратов/ дозировка /длительность приема (дни) \_\_\_\_\_
21. Возможная причина заражения:  от постоянного полового партнера;  случайная половая связь;  изнасилование;  бытовой путь
22. Предполагаемая длительность инкубационного периода:  количество дней,  неизвестно
23. Характер течения заболевания:  с симптомами,  бессимптомное течение
24. Препараты, применявшиеся для лечения настоящего заболевания: сколько раз \_\_\_\_\_; название препарата \_\_\_\_\_; курсовая доза \_\_\_\_\_
25. Результаты проведенного лечения:  выздоровление;  неудача;  неизвестно.

\_\_\_\_\_  
 ФИО, должность, подпись и личная печать врача, заполнившего карту-вкладыш

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ Г.

## ЗАБОР ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

26. Вид исследования: \_\_\_\_\_

27. Дата забора материала: \_\_\_\_\_

28. Место забора материала: U, C, V, R, другое \_\_\_\_\_

29. Условия получения материала: соскоб / свободные выделения \_\_\_\_\_

30. \_\_\_\_\_

*ФИО, должность и подпись медицинского работника, осуществившего забор материала*

### *Микробиологическое исследование*

31. Результаты  
бактериоскопии: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

32. Результаты  
культуральной  
диагностики: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

33. Дата выделения чистой культуры \_\_\_\_\_

34. Фамилия и подпись лица, выделившего чистую культуру \_\_\_\_\_

35. Условия транспортировки штамма в лабораторию ФГУ «ГНЦД Минздравсоцразвития»:  
замороженный/ транспортная среда / другое \_\_\_\_\_

36. Название питательной среды \_\_\_\_\_

37. Дата \_\_\_\_\_ и время отправки штамма \_\_\_\_\_

38. Партия штаммов № \_\_\_\_\_ № накладной \_\_\_\_\_

39. Фамилия и подпись лица, отправившего партию \_\_\_\_\_

**ФГУ «ГНЦД МИНЗДРАВСОЦРАЗВИТИЯ»**

Путь доставки штамма: ж/д-авто – другое: \_\_\_\_\_

Фамилия и подпись лица, принявшего партию \_\_\_\_\_

Дата \_\_\_\_\_ и время доставки штамма \_\_\_\_\_ ч. мин. \_\_\_\_\_

Партия штаммов № \_\_\_\_\_ № накладной \_\_\_\_\_

Морфология доставленного штамма:

сохранный / дефектный (размороженный) / другое: \_\_\_\_\_

Штамм хранился при температуре: \_\_\_\_\_

Для хранения использовалась питательная среда: \_\_\_\_\_

*Микробиологическое исследование*

Результаты  
бактериоскопии: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Результаты  
культуральной  
диагностики: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Результаты изучения чувствительности штамма к антибактериальным препаратам методом серийных разведений в агаре (МПК, мкг/мл)**

Штамм	Название антибактериального препарата					
	пеницилин	тетрациклин	ципрофлоксацин	спектиномицин	цефтриаксон	азитромицин
Исследуемый штамм						
Контрольный штамм						

**Результаты серо- и генотипирования штамма**

penA	ponA	bla	rpsJ	tetM	gyrA	parC	norM	mtrR	rrs	ermB	ermF	met	Rrl (23S)

por	tbpB	Серовар	Серотип	ST

**Заключение специалиста ФГУ «ГНЦД Минздравсоцразвития»  
о штамме *N.gonorrhoeae***

---



---



---



---



---



---



---



---



---



---