

## Лабораторная диагностика бактериальных инфекций мочевого тракта

Б.Ф. Шуляк, научный отдел ООО «ГЕМ» (г. Москва)

### Введение

Инфекции мочевыводящих путей (ИМП) широко распространены среди населения. Например, в Западной Европе их ежегодно диагностируют в среднем у 4 % населения [12]. У женщин их регистрируют в 30 раз чаще, чем у мужчин, причем инцидентность ИМП у них с возрастом увеличивается, достигая у девочек школьного возраста 1 %, возрастая к 30-ти годам до 20 % и достигая максимального уровня после 60 лет. Среди мужчин к ИМП наиболее предрасположены мальчики до 5 лет и пожилые люди, но даже у последних инцидентность поражения мочевыводящих путей не превышает 5 % .Особую группу риска составляют госпитализированные больные с урологической патологией. Они возникают практически всегда у пациентов с мочевыми катетерами [2].

В одних случаях ИМП протекают бессимптомно, в других принимают разные клинические формы, исход которых во многом определяется своевременностью выявления, точностью идентификации и оценки чувствительности этиологического агента к антимикробным препаратам. Их симптоматика варьирует в зависимости от локализации возбудителя в нижних (уретрит и цистит) или верхних (пиелонефрит) отделах мочевого тракта. При уретрите обычно отмечают дизурию, поллакиурию и частые позывы к мочеиспусканию; при цистите — боль и напряженность в подлобковой области, учащенное мочеиспускание, транзиторную гематурию, изменение запаха мочи; при остром пиелонефрите — боль в поясничной области, положительный синдром Пастернацкого, повышение температуры тела, озноб, гематурию, лейкоцитурию, в ряде случаев протеинурию, а также комплекс неспецифических нарушений (тошноту, рвоту, диарею или запор) [2].

При неблагоприятном течении ИМП распространяются по мочевому тракту и вызывают тяжелые поражения. Чаще симптомы ИМП исчезают спонтанно или в результате проводимого лечения. Однако не следует забывать, что ИМП — основной фактор, обуславливающий проникновение патогенных или условно-патогенных бактерий в кровоток, с чем сопряжены тяжелые системные осложнения (бактериемия, уросепсис, септический шок и др.) [2].

### Этиология ИМП

С удивительной закономерностью по всему миру у различных половозрастных групп населения при наиболее тяжело протекающих ИМП наиболее часто изолируют из мочи *E. coli* и *S. saprophyticus*, относимые, согласно рекомендациям Европейской конфедерации лабораторной медицины [3] к первичным возбудителям ИМП человека, т.к. они способны самостоятельно вызывать поражения нормального мочевого тракта.

Многие бактерии, ассоциированные с ИМП, проявляют патогенные свойства преимущественно на фоне других инфекций, ослабления иммунитета, инвазивных диагностических и лечебных процедур. К числу таких условно-патогенных видов, обозначаемых в упомянутых выше рекомендациях как вторичные, относятся клебсиеллы, ацинетобактеры, энтеробактеры, протеи, морганеллы, серратии, псевдомонады, стрептококки группы В, энтерококки, диплококки [3; 10]. Обе группы микроорганизмов относят к типичным возбудителям ИМП [2]. Помимо них при бактериологическом исследовании мочи в ряде случаев выявляют нетипичных

возбудителей, которые обычно ассоциированы с инфекциями других органов и тканей, а мочевого тракт поражают спорадически. Не редко обнаружение в моче условно-патогенных или сапрофитных (коринебактерий, лактобацилл и др.) микроорганизмов обусловлено не ИМП, а случайной контаминацией проб мочи. Поэтому такая находка должна каждый раз внимательно изучаться, перепроверяться и анализироваться, чтобы не стать причиной диагностической ошибки.

### Клиническое значение бактериурии

Обнаружение в моче микроорганизмов не всегда позволяет установить этиологию болезни. Чтобы иметь для этого основания, необходимо в первую очередь подтвердить постоянное присутствие агента в мочевом тракте пациента в течение периода наблюдения. Это достигается посредством его регулярного обнаружения в повторно взятых пробах мочи или в образцах, полученных катетеризацией или пункцией мочевого пузыря, что значительно снижает вероятность случайной контаминации.

Важнейшим критерием отнесения выявленной инфекции к «истинной» ИМП служит высокая концентрация (титр) агента в моче. Е.Х. Касс в 1960 г. установил, что в бессимптомный период развития пиелонефрита у 95 % женщин титр возбудителя в моче превышает  $10^5$  КОЕ<sup>1</sup>/мл [8]. Пользуясь этим индикатором, получившим название «критерия Касса», урологи на протяжении полувека классифицируют бактериурию на «истинную» и «случайную», порой забывая, что данный параметр был определен только для одной группы пациентов (женщин) с определенной патологией (острый пиелонефрит). Более глубокое изучение данного вопроса показало, что такой диагностический уровень бактериурии часто является завышенным, т.е. служит причиной недовыявления большого числа ИМП. По мнению специалистов Европейской конфедерации лабораторной медицины [3] диагностический титр первичных возбудителей ИМП, обнаруженных в собранной при естественном мочеиспускании пробе мочи, должен быть не менее  $10^3$  КОЕ/мл, а других бактерий —  $\geq 10^4$  КОЕ/мл (для женщин) и  $\geq 10^3$  КОЕ/мл (для мужчин). Рекомендуется интерпретировать клиническую значимость титра бактерий мочи не формально, а с учетом клинического состояния пациента, способа получения пробы мочи, патогенных свойств изолятов (их принадлежности к первичным и вторичным уропатогенным агентам, метода определения титра бактерий).

Количественными критериями постановки диагноза на ИМП служат:

- при изоляции монокультуры первичных возбудителей ИМП — титр  $\geq 10^3$  КОЕ/мл;
- при изоляции монокультур других бактерий — титр  $\geq 10^4$  КОЕ/мл;
- при изоляции смешанной культуры двух бактерий — титр  $\geq 10^5$  КОЕ/мл.

У большинства пациентов заболевание мочевого тракта вызывает один возбудитель, реже 2, но когда при бактериологическом анализе диагностируют смешанную инфекцию, вызванную 3 и большим количеством микроорганизмов, то чаще всего это обусловлено случайной контаминацией тестируемых проб или их посевов на питательные среды.

Не следует также забывать о том, что на ранних стадиях ИМП, при высоком уровне диуреза, недержании мочи, проведении бактериологического анализа после начала применения антимикробных препаратов, а также низком рН мочи результаты оценки интенсивности бактериурии могут оказаться заниженными. В то же время следует иметь в виду, что моча представляет собой субстрат, в котором многие

---

<sup>1</sup> КОЕ — колониеобразующие единицы, т.е. число живых микробных клеток, способных образовать самостоятельную колонию в посевах на питательной среде.

бактерии быстро размножаются при соответствующей их физиологическим потребностям температуре. Поэтому большое влияние на титр бактерий в моче оказывают способы ее сбора, хранения и транспортировки: их стандартизация служит необходимым условием избежания диагностических ошибок.

### **Сбор мочи**

Наиболее достоверные результаты получают при сборе первой утренней мочи после тщательного туалета половых органов [1]. Первая ее порция в наибольшей степени контаминирована обычной микрофлорой уретры пациента. Поэтому при подозрении на инфекцию дистального отдела мочевого тракта предпочтительнее собирать среднюю порцию мочи, а при симптомах поражений почек и мочевого пузыря — последнюю. Для отбора проб пользуются также катетером или проводят пункцию мочевого пузыря, если оправдан риск травмирования тканей при таких процедурах.

Мочу для бактериологического анализа собирают в стерильные контейнеры. Наиболее удобны специальные контейнеры (рис. 1), в крышке которых имеется 2 закрывающихся отверстия: одно для вакуумной пробирки (в нее можно легко и быстро собрать часть пробы), а второе для дипслайда/дипстрика.

### **Транспортировка мочи в лабораторию**

Важность информации о титре потенциально опасных бактерий в моче диктует необходимость быстрой (в течение не более 2 ч) ее доставки в лабораторию. При отсутствии такой возможности пробы хранят в холодильнике до 12 ч. Замораживания мочи следует избегать, поскольку оно ведет к гибели большого количества бактериальных клеток, что в конечном итоге может стать причиной не только неправильного определения их титра, но и невозможности изоляции патогенных бактерий на питательных средах.

Однако упомянутые выше правила удается соблюдать не всегда (например, при самостоятельном сборе мочи пациентами в домашних условиях). По этой причине мочу консервируют борной кислотой (10...20 г/л) — она подавляет рост бактерий и грибов, что позволяет дольше хранить предназначенные для исследований пробы при комнатной температуре [11]. В настоящее время доступны контейнеры для мочи со стандартным количеством данного консерванта. При интерпретации результатов анализов проб мочи, содержащих борную кислоту, следует учитывать, что хотя она проявляет преимущественно бактерио- и фунгистатическое действия, тем не менее оказывает определенное негативное влияние на жизнеспособность и титр живых бактерий.

### **Питательные среды**

Важнейшие этапы диагностики ИМП — изоляция из мочи бактерий и определение их титра. В этих целях обычно пользуются 3 типами питательных сред: универсальными, селективными и хромогенными.

Универсальные среды обеспечивают рост тех видов бактерий, которые не нуждаются в специфических питательных веществах. Одна из лучших сред данной группы — кровяной агар; его состав соответствует потребностям большинства уропатогенных бактерий. На нем можно первично идентифицировать ряд бактерий по гемолитической активности. Однако на кровяном агаре склонные к роению протеи дают обильный газонный рост, мешая развитию других микроорганизмов и маскируя их колонии. Такого недостатка лишена среда CLED<sup>2</sup>. Однако ее дифференциально-

---

<sup>2</sup> CLED (син.: бролацин) — аббревиатура английских названий, характеризующих состав среды: cystine (цистина) и lactose (лактозы) и electrolyte deficient (дефицитная по электролитам)

диагностический потенциал ограничен ферментирующими лактозу бактериями. Она не пригодна для культивирования *N. gonorrhoeae*, *G. vaginalis*, хламидий, уреаплазм и других прихотливых бактерий (в частности тех, чей рост *in vitro* зависит от наличия в субстрате крови или сыворотки).

Селективные среды обеспечивают благоприятные условия для определенных видов микроорганизмов и подавляют остальные, тем самым обеспечивают диагностику специфических ИМП. При бактериологическом исследовании мочи из числа селективных сред наиболее широкое применение нашли среда МакКонки и Колумбийский СНА кровяной агар. Селективное действие, которому подвергаются энтеробактерии в среде МакКонки, можно охарактеризовать как умеренное, т.к. соли желчных кислот содержатся в ней в меньшей концентрации, чем в других средах, применяемых с той же целью. Входящий в состав среды МакКонки кристаллвиолет ингибирует рост грамположительных бактерий, особенно энтерококков и стафилококков. Выросшие на ней энтеробактерии дифференцируют по способности ферментировать лактозу (чем она сильнее, тем интенсивнее розовая или красная окраска колоний). Колумбийский СНА кровяной агар содержит колистин (10 мкг/мл) и налидиксовую кислоту (15 мкг/мл), которые облегчают изоляцию грамположительных бактерий. Среда также позволяет проводить первичную дифференциацию изолятов: выросшие на ней колонии золотистого стафилококка окрашены в белый или золотистый цвет, *S. epidermis* формирует белые, *E. fecalis* — мутно-серые, *S. pneumoniae* — бесцветные прозрачные колонии. Дополнительным идентификационным критерием служит тип гемолиза: у *S. aureus* и *S. pyogenes* — бета, у *S. pneumoniae* — альфа.

Хромогенные среды предназначены для изоляции и идентификации микроорганизмов с помощью специфических компонентов, которые определенным образом меняют цвет при контакте с гомологичными им факторами (в первую очередь ферментами бактерий), что позволяет идентифицировать продуцентов последних. Одной из наиболее популярных хромогенных сред, предназначенных для бактериального анализа мочи, является Uriselect3. Поскольку она очень питательна и не содержит селективных факторов, то на ней растут почти все уропатогенные бактерии. Колонии тех из них, которые образуют β-глюкуронидазу, окрашиваются в розово-фиолетовый цвет (кишечная палочка), колонии бактерий, синтезирующих β-глюкозидазу (эскулиназу) становятся зелено-синими (цитробактеры, энтеробактеры, энтерококки, клебсиеллы, стрептококки группы В, псевдомонады). Кроме того, в состав этой среды входит триптофан, что позволяет дифференцировать изоляты на обладающих триптофан дезаминазой (колонии спонтанно окрашиваются в оранжево-коричневый цвет) и не синтезирующих этот фермент. Дополнительно образование индола выявляют нанесением на колонии раствора перхлорита железа (становится коричнево-зеленым) или реактива Ковача (розовеет). Некоторые микроорганизмы, в т.ч. стафилококки и ацинетобактерии, формируют на среде Uriselect3 белые колонии, видовую принадлежность которых определяют дополнительными биохимическими тестами [1; 3].

### **Способы определения титра бактерий в моче**

Золотым стандартом определения титра бактерий в моче остается ее посев на универсальные среды в чашках Петри. Способ основан на штриховом распределении дозированного объема образца (1...100 мкл) по поверхности среды, которую инкубируют при аэробных условиях (можно параллельно выращивать посеvy и в анаэробных условиях — но это не является обязательным для всех случаев этапом бактериологического анализа, т.к. *Cl. perfringens*, *P. anaerobius* и другие анаэробы крайне редко вызывают ИМП у людей). Посев серийных разведений мочи дает

наиболее точные результаты. Применение калиброванных пластиковых бактериологических петель упрощает и ускоряет данную процедуру, но не обеспечивает высокой точности исследований при титре бактерий ниже  $10^4$  КОЕ/мл [1].

Полуколичественные методы определения титра бактерий в моче проводят с применением пластинок, покрытых питательными средами (дипслайдов и др.). Хотя титр бактерий в моче, определенный количественными методами точнее, но упомянутые приспособления позволяют объединить несколько преаналитических и аналитических этапов, ускоряя тем самым получение результатов, что нередко имеет большее значение для клиницистов, чем очень точная информация о титре бактерий в исследованных пробах.

Концентрацию бактерий определяют по числу выросших колоний через сутки после посева пробы. Одновременно отбирают колонии для установления морфологии изолятов (при низкой концентрации бактерий посева инкубируют еще сутки, а затем оценивают их морфологию).

### **Специальные приспособления для бактериологического анализа мочи**

При бактериологическом анализе мочи фактор времени имеет особое значение: во-первых, как отмечалось выше, плотность популяции находящихся в моче бактерий при благоприятных условиях постепенно увеличивается, что нередко ведет к получению ложноположительных результатов лабораторных анализов; во-вторых, от точности и своевременности постановки диагноза зависит дальнейшая судьба пациента. Снижение затрат времени на преаналитическом этапе повышает эффективность медицинской помощи урологическим пациентам. Стремясь к такой цели, Дж. П. Маккей и Г.Х. Сендис<sup>3</sup> в 1965 г. испытали приспособление, представлявшее собой контейнер с пластиковой ложкой, в которую залита питательная среда [9]. Его погружали в пробу мочи, переносили в контейнер и транспортировали в лабораторию. С помощью такого незамысловатого приспособления удалось свести преаналитический этап к процедуре сбора мочи и погружения в нее ложки со средой. Это можно было делать не только в поликлинике, но и непосредственно в домашних условиях, причем для проведения столь простой манипуляции не требовалась специальная подготовка пациента или медицинского персонала. Исходная стерильность приспособления значительно снижала риск случайной контаминации посторонними микроорганизмами взятой пробы. Отпала необходимость в экстренной доставке взятой пробы мочи в лабораторию, т.к. рост бактерий в посевах начинается с момента погружения дипслайда в мочу. Более того, выдержав в течение ночи в термостате приспособление с посевом, медсестра может в начале нового рабочего дня провести первичную оценку результатов: если признаки роста микроорганизмов отсутствуют, то отпадает необходимость в транспортировке пробы мочи или ее посева в лабораторию для дальнейшего исследования (а следовательно значительно сокращаются затраты труда и времени специалистов, а также расход реактивов, питательных сред и других средств).

В последующем «ложку» Маккея–Сендис усовершенствовали, разделив на 2 сектора площадью около  $310 \text{ мм}^2$ , которые заливали триптиказно-соевым агаром и средой Левина, соответственно [5]. Поскольку засев осуществляли погружением приспособления в мочу, то его называли «дипслайдом». Со временем дипслайд стал плоским и более компактным, т.к. среды стали заливать на его противоположные стороны. Пластинчатая форма дипслайда обеспечила равномерность посева, облегчила визуальный контроль роста бактерий. Наличие на пластинке нескольких сред расширил

---

<sup>3</sup> Г.Х. Сендис — автор среды CLED.

возможности и повысил результативность анализа, снизив его трудоемкость и общую стоимость.

Комбинации питательных сред, использованных при изготовлении дипслайдов постепенно оптимизировали. В начале 60-х годов фирма Oxoid (Великобритания) предложила одну сторону пластинки заливать универсальной средой CLED для определения титра бактерий в моче по числу выросших колоний, а другую — средой МакКонки, селективно поддерживающей рост большинства энтеробактерий [7]. Данная комбинация питательных сред стала основной.

В 90-х годах компания ORION (Финляндия) приступила к выпуску дипслайдов Uricult-Trio, одна сторона которых залита средой CLED, а другая — частично средой МакКонки, а частично агаровой основой с солями желчных кислот (для подавления роста грамположительных кокков), а также с 8-гидроксиквинолином-b-D-глюкуронидом и солью железа (для выявления  $\beta$ -глюкуронидазы, как маркера колиформных бактерий). На последней из упомянутых сред значительно ограничено роение протеев; образуемые ими и кишечной палочкой колонии можно спутать по форме и цвету.

Применение дипслайдов значительно облегчает полуколичественную оценку интенсивности бактериурии. Их устройство (компактность, комбинирование на одной пластинке нескольких сред в небольшом количестве) обеспечивает экономию средств, облегчает транспортировку проб в лабораторию, требует очень небольшого места в термостате, а также меньших затрат времени и труда (поскольку посев на несколько сред происходит одновременно посредством простого погружения в пробу). Основное преимущество, предоставляемое дипслайдами состоит в возможности посева на них мочи непосредственно у кровати больного или в поликлинике, куда тот принес пробу своей мочи. Как следствие снижается риск получения ложноположительных результатов оценки интенсивности бактериурии, обусловленных ростом популяции микроорганизмов в пробе мочи с момента ее взятия до анализа.

Однако идеальными эти устройства считать нельзя из-за наличия у них ряда недостатков. Самым существенным из них является сплошной рост бактерий в посевах проб мочи с высокой концентрацией ( $\geq 10^5$  КОЕ/мл). Чем меньше площадь пластинки, залитой питательной средой, тем чаще сплошной рост бактерий мешает оценке их титра и изоляции отдельных колоний для изучения их морфологии и выращивании чистой культуры. В дипслайдах с тремя питательными средами эта проблема в еще большей степени усугубилась из-за сокращения площади засеваемых сред. Рекомендацию погружать дипслайды в мочу не более, чем на 75 % площади, нельзя считать целесообразной: это никак не влияет на интенсивность роста микроорганизмов и не облегчает оценку их концентрации, хотя повышает шансы обнаружить подвижные виды бактерий, способные мигрировать в неконтактировавшие с пробой участки сред.

Можно одновременно использовать несколько дипслайдов, засевая их целевой мочой и ее разведениями, но тогда надо смириться с большим расходом средств на проведении анализа. Бывает сложно сделать посев на дипслайд небольшой порции мочи (например, взятой от новорожденных детей). Большой объем мочи, абсорбируемый средами в процессе их засева, часто ведет в процессе инкубации к образованию конденсата, мешающего визуальному контролю роста бактерий и делающего необходимым преждевременное открывание контейнера с приспособлением.

Для устранения перечисленных недостатков компания Новамед (Израиль) предложила новое техническое решение. Она выпустила приспособление (дипстрик), принципиально отличающееся от обычных дипслайдов тем, что посев на питательные среды осуществляется погружением в мочу не всей пластинки, а только специальной насадки (рис. 2). Последняя представляет собой пластиковое кольцо с зубцами. При опускании дипстрика в пробирку-контейнер кольцо остается у ее горлышка, а зубцы

делают посев штрихом на средах обеих сторон дипстрика. Неодинаковая толщина зубцов обеспечивает захват разных по объему проб мочи. В сделанных ими штриховых посевах постепенно уменьшается концентрация бактерий, что обеспечивает формирование изолированных колоний, если титр микроорганизмов в моче не превышает  $10^7$  КОЕ/мл. Минимальный титр бактерий, выявляемый приспособлением в моче, находится в интервале от  $5 \times 10^2$  до  $5 \times 10^3$  КОЕ/мл.

Приспособление выпускают с несколькими комбинациями сред: Uriselect3 + МакКонки (основная), CLED + МакКонки, а также CLED + СНА Колумбийский кровяной агар (дополнительные). С их помощью одновременно оценивают интенсивность бактериурии и идентифицируют уропатогенные возбудители в хромогенной среде Uriselect3, а также в среде МакКонки (грамотрицательные бактерии) и СНА Колумбийском агаре (грамположительные бактерии).

Параллельные исследования клинических проб мочи в дипслайде Uricult и дипстрике подтвердило превосходство нового приспособления по чувствительности, специфичности, а также воспроизводимости результатов [4; 6]. На сегодняшний день дипстрик — единственное приспособление сочетающее точность бактериологического анализа в чашках Петри с преимуществами дипслайдов, что позволяет говорить о появлении новой «дипстрик»-технологии. Дипстрики легко интегрируются в привычную практику работы лечебных и диагностических медицинских учреждений. Значительно проще и удобнее транспортировать в лабораторию сделанный на них посев, чем пробы мочи пациентов. При этом значительно сокращается время, затрачиваемое на проведение бактериологического анализа. Эти приспособления позволяют быстро и точно устанавливать этиологию большинства ИМП. В тех случаях, когда изолированные на дипстрике бактерии не удается идентифицировать, не надо повторно исследовать мочу — достаточно продолжить изучение морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств выросших колоний.

## Библиография

1. Меньшиков В.В. (ред.) Методики клинических лабораторных исследований. т. 3. Клиническая микробиология. – М, Лабора, 2009.
2. Покровский В.И., Поздеев О.К. Медицинская микробиология. М.:Гэотар Медицина, 1999.
3. Anon. European Urinalysis Guidelines. Scand J Clin Lab Invest, 2000, 60, 1—96.
4. Colodner R., Keness Y. Comparison between Two Urine Culture Devices: and DipStreak Containing Cled/MacConkey Agar. 39th Intersci Conf on antimicrobial agents and chemotherapy (ICAAC), San Francisco, CA, USA, 26-29.09.1999.
5. Craig W., Calvin C.M. Quantitative Urine Culture Method Using a Plastic "Paddle" Containing Dual Media Appl Microbiol, 1972, 23, 5, 919—922.
6. Deguchi K.; Yokota N.; Koguchi M. et al. Detection of bacteria in urine using dip-slides (1). Possible occurrence of false-negative results when dip-slides are used for urine containing antibacterial agents. Japan J Antibiotics, 1995, 48, 1, 155—162.
7. Guttman, D., and Naylor, G. R. E. (1967). Dip-slide: an aid to quantitative urine culture in general practice. Brit. med. J., 3, 343—345.
8. Kass E.H. The role of asymptomatic bacteriuria in the pathogenesis of pyelonephritis. In: Quinn E.L., Kass E.H. (Eds.). Biology of pyelonephritis. Boston: Little & Brown, 1960, p. 399—412.

9. Mackey, J. P., Sandys G. H.. Laboratory diagnosis of infection of urinary tract in general practice by means of a dip-inoculum transport medium. *Brit Med J*, 1965, 2, 1286 — 1288.
10. Mobiey H.L.T., Warren J.W. *Urinary Tract Infections* ASM Washington D.C., 1995.
11. Porter I. A., Brodie J. Boric Acid Preservation of Urine Samples. *Br Med J*, 1969, 2, 353—355.
12. van der Velden J., de Bakker D.H., Claessens A.A.M.C., Schellevis G.F. Een nationale studie naar ziekten en verrichtingen in de huisartspraktijk. Basisrapport: morbiditeit in de huisartspraktijk. Utrecht: NIVEL, 1991.
13. Yagupsky P., Rider M., Peled N. Clinical Evaluation of a Novel Chromogenic Agar Dipslide for Diagnosis of Urinary Tract Infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2000, 19, 694—698.