

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Государственное образовательное учреждение высшего
профессионального образования**

Сибирский государственный медицинский университет

Микробиологическая диагностика инфекционных заболеваний

учебное пособие

*Рекомендовано Учебно-методическим объединением по медицинскому и
фармацевтическому образованию вузов России в качестве учебного пособия для системы
послевузовского профессионального образования врачей*

Томск 2005

УДК 579.8 (075): 616 – 0931 – 098

ББК Р264 Л

Под редакцией проф. Е.П. Красноженова, канд. мед. наук О.П. Бочкаревой

Составители: проф. Е.П. Красноженов, проф. М.Р. Карпова, проф. И.Н. Ильинских,
доц. Ю.Н. Одинцов, доц. В.Г. Пехенько, доц. Л.С. Муштоватова, ст. преп. Т.Л. Мирютова,
ас. О.П. Бочкарева

Микробиологическая диагностика инфекционных заболеваний, Томск, 2005, 157 с.,
учебное пособие.

В учебном пособии представлены сведения, касающиеся биологической характеристики возбудителей и микробиологической диагностики наиболее часто встречающихся бактериальных инфекций. Используются материалы приказов и инструктивных писем Министерства Здравоохранения Российской Федерации. Данное пособие предназначено для системы послевузовского профессионального образования врачей.

Рецензенты: заведующий кафедрой микробиологии Новосибирской государственной
медицинской академии профессор *А.Н. Евстропов*, заведующий кафедрой микробиологии
Омской государственной медицинской академии профессор *Н.В. Рудаков*

Утверждено и рекомендовано к печати учебно-методической комиссией медико-
биологического факультета (протокол № 6 от 22.02 2005 года) и центральным
методическим советом СибГМУ (протокол № 5 от 28.02 2005 года)

Оглавление

1. Инфекционный процесс <i>Красноженов Е.П.</i>	4
2. Стафилококковая инфекция <i>Муштоватова Л.С.</i>	7
3. Стрептококковая инфекция <i>Муштоватова Л.С.</i>	15
4. Менингококковая инфекция <i>Пехенько В.Г.</i>	20
5. Кишечные инфекции <i>Карпова М.Р., Мирютова Т.Л.</i>	27
6. Холера <i>Одинцов Ю.Н.</i>	50
7. Коклюш <i>Ильинских И.Н.</i>	64
8. Газовая анаэробная инфекция <i>Муштоватова Л.С.</i>	68
9. Ботулизм <i>Муштоватова Л.С.</i>	73
10. Столбняк <i>Муштоватова Л.С.</i>	77
11. Дифтерия <i>Ильинских И.Н.</i>	80
12. Туберкулез <i>Бочкарева О.П.</i>	102
13. Листерия <i>Муштоватова Л.С.</i>	113
14. Кампилобактериоз <i>Муштоватова Л.С.</i>	115
15. Госпитальные инфекции <i>Пехенько В.Г.</i>	118
16. Рецептура основных питательных сред	134

Инфекционный процесс

Инфекционные болезни занимают значительное место в общей структуре заболеваемости, достигая, по данным различных авторов, до 80 %. Увеличение удельного веса инфекционной патологии связано, во-первых, с появлением новых инфекционных заболеваний (болезнь легионеров, ВИЧ-инфекция), во-вторых, с разработкой новых высокочувствительных методов микробиологической диагностики, устанавливающих инфекционный генез соматических болезней человека. Некоторые исследователи утверждают, что 70% неинфекционных заболеваний имеют микробное происхождение. Так появились данные о роли инфекционных агентов в патогенезе хронических поражений кишечника (кампилобактериоз), язвенной болезни желудка (геликобактериоз), в развитии атеросклероза (хламидиозы, цитомегаловирусная инфекция) и др.

Инфекционная болезнь является результатом *инфекционного процесса* – комплекса взаимных приспособительных реакций в ответ на внедрение патогенного микроорганизма в макроорганизм, направленного на восстановление нарушенного гомеостаза.

Инфекционный процесс схематически можно подразделить на несколько этапов.

Начальный этап – это *адгезия*, активное прикрепление возбудителя с помощью специфических участков на своей поверхности (адгезинов) к мембране эукариотических клеток слизистых оболочек и кожных покровов в воротах инфекции. При этом клетки имеют специфические рецепторы к возбудителю.

В роли адгезинов у бактерий могут выступать фимбрии (пили), тейхоевые кислоты, поверхностные белки, липополисахариды и др.

Специфичность бактериальной адгезии достигается благодаря механизму “биологического узнавания”, который реализуется на молекулярном уровне и занимает ключевое положение во взаимоотношении и функционировании многих биологических систем (фагоцитоз, фермент-субстрат, антиген-антитело и др.).

Адгезия служит пусковым механизмом инфекционного процесса, способствует колонизации бактерий и проявлению патогенных свойств микроорганизмов. Под колонизацией подразумевают генерирование новых поколений бактерий и распространение возбудителя за пределы первичного очага.

Наряду с теоретическими аспектами рецепторного взаимодействия патогенных бактерий с эукариотическими клетками важны и прикладные стороны этой проблемы. Намечены новые направления в терапии инфекционных заболеваний. К ним относится, так называемая, рецепторная мегатерапия – использование веществ, имитирующих рецепторы эпителиальных клеток-мишеней, блокада рецепторов нетоксичными веществами во избежание связывания с таковыми самих возбудителей или их токсинов, а также элюционную терапию, основанную на удалении уже связавшегося возбудителя со слизистых оболочек, например, с помощью маннозы.

Следующая стадия инфекционного процесса – *инвазия*. Под инвазивностью понимают способность возбудителя преодолевать защитные факторы макроорганизма, проникать в его клетки и ткани. Это свойство связано с наличием у патогенных микроорганизмов факторов патогенности, среди которых выделяют, так называемые ферменты агрессии. Так, фермент гиалуронидаза расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав межклеточного вещества и, таким образом, повышает проницаемость соединительной ткани. Лецитиназа – фермент, действующий на фосфолипиды мембран различных клеток. Нейраминидаза расщепляет нейраминную кислоту, которая входит в состав поверхностных рецепторов клеток слизистых оболочек, что способствует проникновению возбудителя в ткани. Протеазы – ферменты, способные разрушать иммуноглобулины, коагулаза, - фермент, свертывающий плазму крови, лецитиназа –

фермент, разрушающий фосфолипиды мембран, фибринолизин растворяет сгустки фибрина.

Особое место в патогенезе инфекционных заболеваний занимают токсины бактерий. Различают экзотоксины и эндотоксины. Экзотоксины продуцируют как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии. Все известные бактериальные экзотоксины – белки. Они обладают высокой токсичностью, избирательностью и специфичностью. Термолабильны. Секретируются через цитоплазматическую мембрану и клеточную стенку в окружающую среду с помощью специальных секретирующих систем. Являются сильными антигенами, а некоторые суперантигенами. Индуцируют в макроорганизме образование антител – антитоксинов, которые нейтрализуют их действие. Экзотоксины синтезируются в бактериальной клетке в виде неактивной полипептидной цепи – протоксина. В активную форму протоксин превращается в результате разрезания его бактериальными либо тканевыми протеазами на два фрагмента А и В. При этом фрагмент В выполняет акцепторную функцию: распознает рецептор на мембране и формирует внутримембранный канал. Фрагмент А проникает через него в клетку и, являясь ферментом, проявляет в ней токсичность, угнетая различные процессы клеточного обмена веществ.

Основное значение активации белков-протоксинов в появлении у них ферментативной активности (АДФ-трансферазной и НАД-гликогидролазной). Каталитический центр этой активности, видимо, скрыт в интактной молекуле протоксина и требуются конформационные изменения, открывающие доступ к структуре активного центра. Такие изменения происходят в результате мягкого протеолиза белковой молекулы. Рибозилирование какого-либо белка важнейшей регуляторной системы поражаемой клетки-мишени приводит к нарушению процесса регуляции и к гибели клетки.

Так, например, дифтерийный токсин специфически рибозилирует и, таким образом, инактивирует фактор EF-2, играющий важную роль в инициации биосинтеза белка. Образуется неактивный комплекс EF-2 – АДФ-рибоза, что ведет к нарушению биосинтеза протеина, гибели клетки и некрозу слизистой оболочки верхних дыхательных путей. Энтеротоксины холерного вибриона и патогенных энтеробактерий, рибозилируя гуанинсвязывающий белок, нарушают регуляцию аденилатциклазы. Активация аденилатциклазы носит устойчивый характер, что ведет к накоплению цАМФ, выходу ионов хлора и воды из тканей в кишечник, что обуславливает диарею и дегидратацию организма – характерные признаки холеры. Экзотоксины клостридий ботулизма и столбняка угнетают выделение медиаторов в нервно-мышечном синапсе и блокируют передачу нервного импульса на мышечные волокна.

Энтеротоксины, продуцируемые стафилококками, обладают свойствами суперантигенов, т.е. антигенов, индуцирующих увеличение числа Т-лимфоцитов, которые продуцируют большое количество интерлейкина 2, что приводит к токсическому эффекту.

Эндотоксины характерны для грамотрицательных бактерий. Они представлены липополисахаридами (ЛПС) и связанными с ними белками. Термостабильны. Высвобождаются, главным образом, из бактериальных клеток после их разрушения, не обладают специфичностью действия. Токсичность и пирогенность обусловлены липидом А, входящим в состав ЛПС и имеющим сходную структуру у разных грамотрицательных бактерий. Пирогенное действие эндотоксинов связано, с их способностью индуцировать выброс пирогенной субстанции из полиморфноядерных лейкоцитов, которая активирует терморегулирующий центр головного мозга.

Ранняя лейкопения, вызванная ЛПС, совпадает по времени с лихорадкой и сменяется лейкоцитозом. Эндотоксины могут вызывать дегрануляцию тучных клеток, выделение биологически активных веществ, влияющих на кровеносные сосуды и индуцировать гипотонию вплоть до коллапса. В результате сосудистых реакций, гипотонии нарушаются тканевое дыхание, обмен веществ, что приводит к накоплению

органических кислот (особенно, лактата) и развитию метаболического ацидоза. Эндотоксины способны активировать фактор Хагемана – первую ступень свертывающей системы крови и, таким образом, запускать «коагулирующий каскад», что, в конечном итоге, приведет к тромбозу мелких кровеносных сосудов и развитию десеминированной внутрисосудистой коагуляции – ДВК. У беременных женщин эндотоксин может вызвать кровоизлияния в околоплодных оболочках, преждевременные роды и аборт.

У микроорганизмов встречаются токсические вещества, которые нельзя отнести к экзо- и эндотоксинам. К таким токсическим субстанциям относится корд-фактор микобактерий туберкулеза, являющийся гликолипидом и составляющий около 1% массы микробных тел. Корд-фактор состоит из сахара трегалозы и димиколата (миколовой и миколеновой кислот), соединенных посредством эфирной связи. Корд-фактор угнетает миграцию лейкоцитов, фагоцитоз, вызывает образование гранулем.

В основе периода *разгара болезни* лежат генерализация инфекционного процесса (распространение возбудителя по организму хозяина) и персистенция возбудителя. Распространение, проникших в организм патогенных микроорганизмов, зависит от свойств возбудителя и наличия в клетках ткани рецепторов и может происходить гематогенно, лимфогенно, нейрогенно и контактным путем (от клетки к клетке).

Кровь здорового человека стерильна, однако, при многих инфекционных заболеваниях в крови появляются и циркулируют в течение различного срока возбудитель, либо его токсин или антигены. Бактериемия – присутствие в циркулирующей крови бактерий без размножения. Диагноз бактериемии устанавливается путем выделения гемокультуры возбудителя. Вирусемия – в крови циркулируют вирусы. Сепсис – поступление в кровь возбудителя из очага гнойного воспаления, часто с образованием новых очагов (септикопиемия). При этом возбудитель размножается в кровеносной и лимфатической системах. Если образования метастатических очагов не происходит, данная форма сепсиса носит название септицемии. В случае циркуляции в крови бактериальных эндотоксинов используется термин “токсемия”, а экзотоксинов – “токсинемия”. Антигенемия – циркуляция в крови антигенов возбудителя, либо иммунных комплексов антиген-антитело, которые можно выявить с помощью серологических реакций.

Инфекционный процесс также связан со способностью возбудителя персистировать – длительное время переживать в макроорганизме.

Из наиболее важных механизмов персистенции паразита в организме хозяина можно выделить следующие:

А. Уклонение от факторов защиты.

1. В результате снижения вирулентности – образование Л-форм, антигенная и молекулярно-рецепторная мимикрия, гено- и фенотипическая изменчивость и др.

2. В результате изоляции в очагах иммунодефицита: внутриклеточно, в инфекционных гранулемах, внутри тромбов, в слабочувствительных к бактериям органах и тканях (миндалины, желчный пузырь, опухоли и др.), в местах скопления фибринозной ткани и коллагена (поврежденные ткани), в местах расположения инородных тел (катетеры, клапаны, штифты).

Б. Подавление факторов защиты.

В результате повышения вирулентности: продукция ингибиторов иммунитета (протеазы), образование плазмид, токсинов, веществ угнетающих резидентную микрофлору (бактериоцины). Антилизозимное и антикомплементарное действие бактерий.

В результате десеминации возбудителя в иммунологически некомпетентном организме, при наличии иммунодефицитных состояний, дисбактериозе, при воздействии иммуносупрессивных факторов (цитостатики, гормоны, антибиотики и др.).

Большая роль в защите патогенных бактерий от иммунных факторов принадлежит поверхностным структурам бактериальной клетки, часто представляющим собой капсулу или капсулоподобные образования.

Функционально такие структуры предназначены для того, чтобы блокировать компоненты клеточной стенки, активирующие систему комплемента (пептидогликан у грамположительных и липополисахарид у грамотрицательных бактерий). Капсульное вещество, обладающее гидрофильными свойствами, делает бактериальную клетку устойчивой к поглощению фагоцитами, поскольку, чем гидрофильнее объект, тем труднее этот процесс осуществляется. Функция защиты от фагоцитоза связана и с тем, что капсула создает как бы механический барьер, препятствующий контакту прокариотической и эукариотической клеток, обусловленный лигандной ролью СЗВ-компонента комплемента. Образования, участвующие в процессах биологического узнавания и лиганд-рецепторного взаимодействия, оказываются экранированными капсулой. Большое значение имеет легкая отделяемость капсулы от бактериальной клетки. Взаимодействуя с такой субстанцией, фагоциты оказываются ложно связанными с возбудителем, так как необходимой фиксации этих клеток не происходит.

У некоторых патогенных микроорганизмов имеются поверхностные белки (А-протеин стафилококков, М-протеин стрептококков) способные взаимодействовать с Fc-областью Ig G, в результате чего Fab-фрагмент антитела оказывается лишенным возможности выполнять свою распознающую функцию, а возникновение на поверхности клетки слоя из таких иммуноглобулинов делает возбудителя неузнаваемым для системы комплемента.

После окончания острого течения инфекционного процесса начинается постепенное (литическое) или быстрое (кризисное) его завершение – период реконвалесценции (выздоровления), который характеризуется деструкцией и элиминацией возбудителя, обусловленными механизмами неспецифической защиты и иммунологической реактивности макроорганизма.

Стафилококковые инфекции

Возбудители стафилококковых инфекций - острых инфекционных заболеваний, характеризующихся многообразием клинических проявлений, относятся к семейству Micrococcaceae, роду Staphylococcus, видам: aureus, epidermidis, saprophyticus.

Морфология и тинкториальные свойства.

Стафилококки - клетки правильной шаровидной формы, диаметром до 1,5 мкм. При размножении образуют скопления в виде гроздьев винограда. В мазках из гноя стафилококки располагаются поодиночке, парами или небольшими скоплениями. Неподвижны, не образуют спор. Некоторые штаммы золотистого стафилококка, в частности выделенные от больных, образуют капсулу. Хорошо окрашиваются анилиновыми красителями, грамположительны.

Биологические свойства

Стафилококки – факультативные анаэробы, но лучше развиваются в аэробных условиях. Нетребовательны к условиям культивирования, хорошо растут на обычных питательных средах при pH 7,2-7,4. Нечувствительны к высоким концентрациям хлористого натрия и растут при содержании хлорида натрия в среде 8-10%. Такую концентрацию соли в среде другие микроорганизмы не переносят, вследствие чего солевые среды являются селективными для стафилококков.

На плотных питательных средах стафилококки образуют пигментированные колонии диаметром 1-5 мм, грубозернистой структуры с уплотненным центром. Цвет пигмента колоний может быть различен у разных штаммов одного и того же вида, в связи с чем не является дифференциальным признаком. Патогенные штаммы стафилококка на

кровоном агаре образуют вокруг колоний зону гемолиза. На желточно-солевом агаре большая часть патогенных стафилококков вызывает лецитовителлазную реакцию, проявляющуюся в образовании вокруг колоний зоны помутнения с радужным венчиком по периферии. При росте на жидких питательных средах стафилококки вызывают диффузное помутнение с последующим выпадением осадка.

Кровяной агар: к расплавленному и охлажденному до 45-50^oC питательному агару прибавляют 5-10% дефибринированной или цельной свежеснятой крови животного.

Желточно-солевой агар: в расплавленный и остуженный до 60^oC мясопептонный агар рН 7,2-7,4 с 10% хлорида натрия прибавляют 10-20% желточной взвеси куриного яйца.

Стафилококки – биохимически активные микроорганизмы. Вырабатывают сахаролитические и протеолитические ферменты. *S. aureus* расщепляет до кислоты без газа глюкозу, лактозу, сахарозу, мальтозу, маннит, левулезу, окисляет глицерин, свертывает молоко, восстанавливает нитраты в нитриты, продуцирует уреазу, каталазу, фосфатазу, образует аммиак и сероводород, продуцирует аргиназу – фермент расщепляющий аргинин. *S. epidermidis* не сбраживает маннита. *S. saprophyticus* не сбраживает маннозу, не продуцирует фосфатазу.

Стафилококки синтезируют около 30 белков, являющихся токсинами и ферментами патогенности, способствующих их распространению в ткани и органы и вызывающими нарушение жизнедеятельности клеток макроорганизма. Из токсинов наибольшее значение имеют $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ - гемолизины, лейкоцидин, энтеротоксины, эпидермолитический токсин.

К группе ферментов патогенности стафилококков относят продуцируемые ими, гиалуронидазу, плазмокоагулазу, лецитовителлазу, стафилокиназу, дезоксирибонуклеазу, протеиназу, фосфатазу.

Стафилококки содержат полисахаридные и белковые антигены. Полисахариды специфичны, что позволяет подразделить стафилококки на серовары, но внутривидовая дифференциация по антигенной структуре в практике не используется. Антигенной активностью обладают вещества клеточной стенки: пептидогликан, тейхоевые кислоты, белок А.

Эпидемиология и патогенез стафилококковой инфекции.

Стафилококки широко распространены в природе и встречаются практически везде. Источником инфекции являются больные и бактерионосители. Наиболее опасны больные с открытыми гнойными очагами, кишечными расстройствами и воспалением легких.

Пути передачи – контактный, воздушно-капельный, алиментарный. Входные ворота – кожа, слизистые оболочки полости рта, верхних дыхательных путей, конъюнктивы глаза, органов мочеполовой системы, желудочно-кишечный тракт.

На месте внедрения стафилококк вызывает развитие местного воспалительного очага с нагноением и некрозом. При снижении резистентности под влиянием токсинов и инвазивных ферментов патогенности осуществляется проникновение возбудителя и токсинов из очага инфекции в кровь. Наступает бактериемия и токсинемия. Заболевание переходит в генерализованную форму, при которой могут поражаться различные органы и ткани. Стафилококки вызывают около 120 нозологических форм заболеваний.

Исследуемый материал

С целью обнаружения стафилококков исследуют гной, кровь при сепсисе, пунктаты, слизь из зева, носа, мокроту, мочу, отделяемое женских половых органов.

1. Материал из глотки, носа, серозное отделяемое уха, гной забирают отдельными стерильными тампонами с помощью палочек из алюминиевой проволоки. Верхний конец проволоки завернут кольцом, на нижний наворачивают вату.
2. Слизь из глотки берут натошак или через 3-4 часа после еды с воспаленных участков, при налетах и пленках – из глубины крипт миндалин.
3. При взятии материала из носа наружные отверстия необходимо предварительно обработать 60⁰ спиртом. Тампон вводят глубоко в один, а затем в другой носовой ход.
4. При открытых гнойных поражениях кожу вокруг раны обрабатывают 60⁰ спиртом. Стерильным ватным тампоном очищают поверхность раны от мази, отмерших тканей и после удаления верхнего слоя гноя двумя стерильными ватными тампонами забирают материал.
5. Материал закрытых гнойных очагов и пунктат лимфоузлов забирают шприцем и выливают в стерильную пробирку.
6. Пробу мокроты берут утром натошак, после чистки зубов и полоскания полости рта. Утреннюю мокроту, выделяющуюся во время приступа кашля, собирают в стерильную банку.
7. Отделяемое глаз исследуют при заболеваниях конъюнктивы, век, слезных мешков. Не менее чем за 6 часов до взятия исследуемого материала отменяют все медикаменты.

Материал берут с внутренней поверхности нижнего века движением к внутреннему углу глаза платиновой петлей, предварительно прожженной в пламени спиртовки и остуженной или стерильной стеклянной палочкой. При наличии большого количества гнойного отделяемого используют стерильные ватные тампоны.

Материал из роговицы глаза берут только после обезболивания платиновой петлей.

Посев исследуемого материала проводят в кабинете врача на сывороточный бульон или тиогликолевую среду и наносят на стекло для бактериоскопии.

8. Кровь при сепсисе берут из вены локтевого сгиба не менее 10 мл. У маленьких детей берут в меньшем количестве из мочки уха, пятки, пальца с соблюдением асептических условий. Сначала поверхность кожи протирают спиртом, затем йодом и еще раз спиртом. Взятие крови проводят во время подъема температуры, до начала антибиотикотерапии или через 12-48 часов после последнего введения антибиотиков. Для более достоверного результата кровь у больного следует брать трижды во время подъема температуры.

Кровь в палате больного засевают во флаконы с агаризованным сахарным бульоном или комбинированной питательной средой в соотношении крови и питательной среды 1:10.

9. Взятие спинномозговой жидкости проводят до антибиотикотерапии с соблюдением правил асептики. 1-2 мл свежевзятого ликвора помещают в пробирку, желательно центрифужную.
10. Желчь собирают при зондировании отдельными порциями А, В, С в три стерильные пробирки.
11. Для исследования следует выбрать среднюю порцию утренней мочи, в количестве не менее 3-5 мл.
12. Взятие материала женских половых органов проводит врач акушер-гинеколог при подозрении на инфекционную природу патологического процесса. Отделяемое вульвы и влагалища берут стерильными ватными тампонами.

Для взятия материала шейки матки ее обнажают в зеркалах. Влагалищную часть тщательно обрабатывают ватным тампоном, смоченным в стерильном физиологическом растворе или стерильной воде. После этого тонким ватным тампоном, осторожно введенным в цервикальный канал, не касаясь стенки влагалища, берут материал.

Правильное взятие содержимого из матки возможно только при использовании шприца-аспиратора, имеющего на зонде покрытие. После прохождения цервикального канала, в полости матки раскрывают наружную оболочку зонда и набирают в шприц содержимое матки. Затем закрывают наружную оболочку зонда и выводят его из матки. Получение материала из придатков матки возможно только при оперативном вмешательстве или при проведении диагностической пункции опухолевых образований, проводимой через влагалищные своды. Параллельно с взятием материала врач акушер-гинеколог готовит не менее двух мазков, используя стерильные гинекологические инструменты или ватные тампоны.

13. В случаях летальных исходов при гнойно-воспалительных заболеваниях исследуемый материал нужно брать не позднее 12 час после смерти больного. Пробы крови получают из левого желудочка сердца шприцем или пастеровской пипеткой в объеме 5-10 мл. Пункции биопсии проводят с соблюдением правил асептики. Берут 2-3 кусочка органов величиной 0,5-1 см³ и помещают в стерильные пробирки или чашки Петри. Гной, спинномозговую жидкость отсасывают шприцем в количестве 1-5 мл в стерильные пробирки. Поверхностные секреты собирают ватным тампоном.

14. Пробы вышеперечисленного материала (кроме спинномозговой жидкости) должны быть доставлены в лабораторию не позднее двух часов с момента взятия материала. Хранение материала в холодильнике допускается 1-2 часа только при невозможности быстрой отправки в лабораторию.

Спинномозговую жидкость, сразу же после взятия, подвергают анализу. Допускается хранение при температуре 37⁰С в течение 1-2 часов.

Микробиологическая диагностика

1 этап исследования. Тампоны с исследуемым материалом смачивают в питательном бульоне и втирают со всех сторон тампона у края чашки Петри с кровяным и желточно-солевым агаром. Затем этим же тампоном делается посев штрихами на оставшуюся часть чашки Петри, не отрывая тампон от поверхности питательной среды. Такой посев позволяет получить отдельные колонии. Засеянные чашки Петри помещают в термостат на 18-24 час.

Предварительное микроскопическое исследование проводят непосредственно с тампона. Если исследуемый материал брали одним тампоном, то мазки готовят после посева на питательные среды. Мазки окрашивают по Граму. В мазках выявляют Гр+ кокки, располагающиеся поодиночке или скоплениями в виде гроздьев.

Мокроту выливают в чашку Петри и стеклянными палочками отбирают 2-3 комочка, промывают в стерильном физиологическом растворе или МПБ. При необходимости возможна гомогенизация, для этого мокроту отбирают в банку, смешивают с физиологическим раствором в соотношении 1:2 и встряхивают до разбивания комочков. Из этого материала делают 2 мазка для бактериоскопического исследования и производят посев 2-3 комочков слизи или 2-3 капель гомогената на кровяной и желточно-солевой агары, растирая по поверхности шпателем.

Свежевзятую спинномозговую жидкость центрифугируют 5 мин при 3500 об/мин, если ликвор мутный – центрифугирование не проводят. Из осадка или исследуемого материала делают мазок и 0,1 мл засевают на кровяной и желточно-солевой агары.

Результаты микроскопии сообщаются врачу как предварительные данные.

Из гноя, полученного из закрытых гнойных очагов, готовят мазок и 0,1 мл засевают на рекомендуемые питательные среды.

Мочу перед посевом перемешивают, набирают петлю и наносят на чашки Петри с кровяным и желточно-солевым агаром.

По 0,1 мл каждой порции желчи засевают на кровяной и желточно-солевой агар.

При исследовании материала от трупа из гноя, кусочков тканей делают мазки-отпечатки и окрашивают по Граму. Кусочки тканей растирают в ступке с песком и добавляют двойной объем физиологического раствора и 0,1 мл взвеси засевают шпателем на кровяной и желточно-солевой агар.

При необходимости срочного ответа об антибиотикочувствительности целесообразно сделать посев на чашку Петри с кровяным агаром, которую после посева выдерживают 30-40 мин при комнатной температуре, а затем на агар раскладывают диски антибиотиков.

Засеянные чашки Петри помещают в термостат на 18-24 час.

2 этап исследования. Через 18-24 час выросшие колонии просматривают. Стафилококки на твердых питательных средах дают непрозрачные окрашенные колонии от золотистого до белого цвета. Колонии белого цвета могут выделяться от больного, леченого антибиотиками. На кровяном и желточно-солевом агаре отбирают не менее 2 пигментированных колоний характеризующихся гемолитической и лецитовителлазной активностью. Если колонии с такими свойствами отсутствуют, то отбирают колонии подозрительные на стафилококки и делают мазок. При выявлении в мазке микроорганизмов рода *Staphylococcus* колонии пересевают на скошенный агар. Пробирки помещают в термостат на 18-24 час.

Проводят предварительный учет чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

3 этап исследования. Из культуры, выросшей на скошенном агаре, делают мазки, окрашивают по Граму и при характерной морфологии бактерий проводят идентификацию культуры и окончательно определяют чувствительность микроорганизмов к антибиотикам.

Исследование отделяемого глаз

1 этап. Присланные в лабораторию мазки окрашивают по Граму и выявляют грамположительные кокки, располагающиеся одиночно, попарно или гроздьями.

Посевы помещают в термостат на 18-24 час.

2 этап. При появлении роста в питательных средах из посева готовят мазки и при соответствии морфологии микроорганизмов делают посев на кровяной и желточно-солевой агар. Посевы инкубируют в термостате 18-24 час.

3 этап. Выросшие колонии просматривают, при выявлении подозрительных на стафилококки делают мазки и пересевают на скошенный агар. Посевы инкубируют в термостате 18-24 час.

4 этап. Выросшую культуру на скошенном агаре изучают в мазках, идентифицируют и определяют чувствительность к антибиотикам.

Исследование крови

Присланные в лабораторию посевы крови помещают в термостат при температуре 37⁰С, ежедневно встряхивая и просматривая.

Если посевы производили в 0,15% агаризованный сахарный бульон, то первый высев из среды с посевом крови проводят через двое суток на кровяной агар. При наличии роста на кровяном агаре характерных для стафилококков колоний, из них делают мазок, окрашивают по Граму и делают посев на скошенный агар. После инкубации в термостате выросшую культуру идентифицируют.

При отсутствии роста после первого высева флаконы с посевом крови просматривают через каждые 24 часа в течение 10 сут.

Если для посева применялась комбинированная питательная среда (сахарный бульон со скошенным сахарным агаром), то наличие роста определяют по появлению колоний на скошенном агаре. Изучают их морфологические и тинкториальные свойства и при соответствии морфологии пересевают на кровяной агар для определения гемолитической активности и скошенный агар с целью идентификации выделенных микроорганизмов и определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

При отсутствии роста во флаконах с посевом крови выдают отрицательный результат.

Исследование отделяемого женских половых органов.

1 день. Присланные в лабораторию мазки окрашивают по Граму и выявляют микроорганизмы рода *Staphylococcus*.

Жидкий исследуемый материал в количестве 0,1 мл засевают в сахарный бульон.

Кусочки тканей измельчают в ступке с песком, добавляют стерильный физиологический раствор и 0,1 мл полученной взвеси засевают в сахарный бульон. Посевы термостатируют 18-24 час.

2 день. При помутнении бульона из него делают мазки на стекле петлей и при выявлении грамположительных кокков, типично располагающихся в мазке, делают посев на кровяной и желточно-солевой агар. Посевы выдерживают в термостате 18-24 час.

3 день. При появлении подозрительных на стафилококк колоний делают мазки и пересевают на скошенный МПА для накопления чистой культуры и ее идентификации.

4 день. Выросшую культуру проверяют на чистоту в мазках, идентифицируют и окончательно определяют чувствительность к антибиотикам.

Идентификация выделенной культуры

Методы идентификации основаны на изучении морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств микроорганизмов.

При диагностике стафилококковых инфекций первоначально проводят изучение характера роста на кровяном и желточно-солевом агаре. На кровяном агаре *S.aureus* и *S. epidermidis* дают зону гемолиза, на желточно-солевом агаре *S.aureus* характеризуется лецитовителлазной активностью, что определяется по зоне помутнения вокруг колоний.

Если колонии с указанными свойствами отсутствуют, то для изучения отбирают непрозрачные пигментированные колонии.

Целью первичной идентификации является дифференциация стафилококков от микрококков (табл. 1).

Таблица 1

Сравнительная характеристика микрококков и стафилококков

№ п/п	Свойства	Микрококки	Стафилококки
1.	Размеры клеток	большие	меленькие

2.	Окраска колоний	от белого до розово-красного, оранжевого	от золотистого до белого
3.	Ферментация глюкозы в анаэробных условиях	-	+
4.	Гемолиз	-	±
5.	Окисление глицерина	-	+

В мазках, окрашенных по Граму, стафилококки располагаются поодиночке, парами, в виде виноградных гроздьев. Микрококки, помимо указанных вариантов, образуют тетрады, пакеты.

Ферментация глюкозы в анаэробных условиях

При ферментации глюкозы в анаэробных условиях образуется молочная кислота, в связи с чем среда закисляется и ее рН снижается, что видно по изменению окраски индикатора, добавленного в среду.

Для изучения ферментации глюкозы в анаэробных условиях используется питательная среда, содержащая 0,3% агара, 1% глюкозы и индикатор ВР или стандартная среда Хью-Лейфсона с индикатором бромтимоловым синим. Среда Хью-Лейфсона является более чувствительной, поскольку изменение ее окраски на желтый происходит при более высоких значениях рН, что позволяет выявить ферментацию глюкозы слабо активными штаммами *S. epidermidis*. Если на среде с индикатором ВР штамм дал отрицательную реакцию, исследование стоит повторить на среде Хью-Лейфсона.

Среды разливают по 5 мл и стерилизуют. Перед посевом пробирки со средой прогревают на водяной бане 15 мин и быстро охлаждают для удаления O_2 . Суточную культуру выделенного микроорганизма бактериологической петлей сеют в столбик среды уколком до дна пробирки, а затем поверхность агара заливают 1,5 мл стерильного вазелинового масла для создания анаэробных условий. Инкубация в термостате при 37° – 5 сут. Реакция считается положительной, если происходит изменение цвета не менее, чем на 2/3 высоты столбика.

После определения принадлежности микроорганизмов к роду *Staphylococcus* проводят видовую дифференциацию (табл. 2).

Таблица 2

Идентификация видов стафилококков

Название микроорганизма	Плазмо-коагуляция	Ферментация маннита		гемолиз	лецитиназа	Лизоцимная активность	Определение ДНК-азы
		аэробная	анаэробная				
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	-	±	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i>	-	±	-	-	-	-	-

Первым этапом видовой идентификации стафилококков является реакция плазмокоагуляции. Если установлено, что микроорганизм не коагулирует плазму, то

проводят его идентификацию для выяснения принадлежности культуры к видам *S.epidermidis* и *S.saprophyticus* (табл. 3)

Таблица 3.

Дифференциальные признаки *S.epidermidis* и *S.saprophyticus*

Микроорганизм	Устойчивость к новобиоцину	Фосфатаза	Окисление маннита
<i>S.epidermidis</i>	-	+	-
<i>S.saprophyticus</i>	+	-	+

Реакция плазмокоагуляции

Для постановки реакции используется плазма кроличья сухая цитратная. Если таковая отсутствует, то берут стерильную кровь из сердца кролика в количестве 8 мл и вносят в пробирку с 2 мл стерильного 5% лимоннокислого натрия. Смешивают и центрифугируют 10 мин при 1500 об/мин для осаждения форменных элементов крови. Плазму отсасывают, разводят в 5 раз физиологическим раствором и разливают в пробирки по 1-2 мл. Хранят на холоду.

В пробирку с плазмой вносят 1 петлю суточной агаровой культуры, перемешивают и помещают в термостат. Результаты регистрируют через 1, 2, 4 и 18 час инкубации. Любая степень свертывания плазмы считается положительным результатом. Отсутствие свертывания плазмы в течение 18 час расценивается как отрицательный результат.

Ферментация маннита.

Расщепление маннита определяют на среде Гисса (1% пептона, 0,5 % хлорида натрия, 1% индикатора Андрее, рН 7,2). Для определения ферментации маннита в анаэробных условиях пользуются плотной средой Гисса. Среды разливают по 5 мл. Для создания анаэробных условий перед посевом кипятят 15 мин быстро охлаждают и заливают 1-2 мл стерильного вазелинового масла. Посев производится уколом. Инкубация в термостате при 37⁰ – 6 сут. Реакция считается положительной если произошло изменение цвета среды с желтого на красный не менее, чем на 2/3 высоты столбика.

Определение ДНК-азы.

Под действием ДНК-азы добавленная в плотную среду высокополимерная ДНК, распадается на нуклеиновые фрагменты. При этом мутная среда, содержащая высокополимерную ДНК, становится прозрачной.

К 100 мл расплавленного 18% мясопептонного агара (рН 8,6) добавляют раствор ДНК, из расчета 2 мл ДНК на 1 мл среды (готовят из сухой стандартной ДНК). Среду прогревают 20 мин на кипящей водяной бане и в слегка остуженный агар добавляют 0,5 мл 10% хлорида кальция. Перемешивают и разливают в чашки Петри. Суточную культуру микроорганизмов засевают штрихом на поверхность подсушенного агара. Посевы помещают в термостат на 18-24 час. Затем поверхность агара заливают 5-7 мл 3 моль/л раствора HCl.

Через 1-2 минуты кислоту сливают. Появление вокруг культуры прозрачной зоны, которая в 4 и более раз превосходит по ширине зону микробного роста, свидетельствует о положительной реакции на ДНК. Реакция с меньшей зоной деполимеризации ДНК расценивается как сомнительная и учету не подлежит.

Лизоцимная активность.

Для определения наличия в культуре лизоцима пользуются культурой *M. lysodeiticus*. Смыв этой культуры (2 млрд. микробных клеток на 1 мл среды) подвергают 20 минутному кипячению и добавляют к расплавленному агару. Перемешивают и разливают в чашки Петри. После подсушивания агара делают посев исследуемой культуры и помещают в термостат на 24-48 час. При наличии лизоцима вокруг посева микроорганизма образуется зона просветления.

Определение устойчивости к новобиоцину.

10 мг новобиоцина растворяют в 10 мл дистиллированной воды и 0,5 мл водного раствора вносят в пробирку с 3 мл физиологического раствора. Содержимое пробирки вносят во флакон с 250 мл расплавленного и охлажденного до 50° 1,8% агара. Перемешивают и разливают в чашки Петри. Исследуемую культуру засевают петлей. Инкубация в термостате 24 час. Рост штамма на питательной среде свидетельствует об устойчивости к новобиоцину. Полное отсутствие роста или наличие отдельных мелких колоний дает основание считать штамм чувствительным к новобиоцину.

Тест на фосфатазу.

Фермент фосфатаза отщепляет фосфатную группу от фосфорорганического соединения. Образующийся в результате продукт реакции приобретает окраску при добавлении соответствующего реактива.

Тест на фосфатазу можно проводить двумя методами:

1-й метод: 50 мл пара-нитрофенилфосфата растворяют в 3 мл дистиллированной воды и добавляют этот раствор к 100 мл расплавленного и охлажденного 1,8% агара. Перемешивают и разливают в чашки Петри. Суточную культуру петлей засевают на среду (до 16 культур на одну чашку Петри). Посевы помещают на 24 час в термостат. Реакция считается положительной если в толще среды вокруг колоний появляется желтое окрашивание.

2-й метод: Фенолфталеинфосфат натрия добавляют к агару в концентрации 0,01%. Перемешивают и разливают в чашки Петри. Суточную культуру засевают на агар и помещают посевы в термостат на 24 час. По окончании инкубации на крышку чашки Петри наливают 5-6 капель 25% раствора аммиака и выдерживают в перевернутом состоянии 5-10 мин, подвергая выросшую культуру воздействию паров аммиака. О положительной реакции свидетельствует появление розового окрашивания колоний.

Стрептококковые инфекции

Возбудителями стрептококковых инфекций являются микроорганизмы, представители семейства Streptococcaceae, относящиеся к родам Streptococcus и

Enterococcus. Стрептококки по полисахариду клеточной стенки делятся на 21 серологическую группу, обозначаемую латинскими буквами от А до V. Большинство возбудителей стрептококковых инфекций относится к группе А, имеющей наибольшее значение в патологии человека. К этой группе относятся *S.pyogenes* и *S.pneumoniae*, вызывающие острые инфекционные заболевания, различающиеся по патогенезу и клиническому течению.

Среди многочисленных условнопатогенных стрептококков для человека лидирующее место занимают *S.agalactiae* (группа В), представители рода *Enterococcus* - *E.faecalis*, *E.faecium*, которые являются причиной различных заболеваний урогенитального тракта, постхирургических гнойно-воспалительных процессов кишечника и брюшины.

S.pyogenes

Морфология и тинкториальные свойства.

Овальные или шаровидные клетки, размером 0,5-1 мкм. Располагаются попарно или цепочками различной длины. Неподвижны, спор не образуют, имеют капсулу. Грамположительны.

Биологические свойства

S.pyogenes - факультативные анаэробы. Культивируются на питательных средах с добавлением глюкозы, сыворотки, крови при pH 7,2-7,6. На плотных питательных средах образуют мелкие полупрозрачные колонии, в жидких средах – придонный рост. На кровяном агаре дают зону гемолиза.

S.pyogenes ферментируют с образованием кислоты без газа глюкозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, маннит, расщепляют салицин, трегалозу, не разжижают желатин, свертывают молоко, не восстанавливают нитраты в нитриты.

S.pyogenes выделяют экзотоксины, обуславливающие общую интоксикацию и специфическое действие. Токсины общего действия (эритрогенный, пирогенный, скарлатинозный) являются основным токсическим компонентом стрептококков. К токсинам местного действия относят О и S стрептолизин, гиалуронидазу, стрептокиназу, протеиназу.

Эпидемиология и патогенез

Источник заболевания – больной, бактерионоситель. Пути передачи – воздушно-капельный, контактный.

Входными воротами являются миндалины, слизистые верхних дыхательных путей, поврежденная кожа.

Развитие процесса, в значительной степени, зависит от состояния макроорганизма и преобладающей роли одного из трех компонентов: инфекционного, токсического и аллергического.

Инфекционный синдром связан с размножением стрептококков, которые на месте внедрения вызывают воспаление, переходящее в гнойное и некротическое. Из первичного очага стрептококки проникают в лимфатические узлы, затем в кровь, приводя к генерализации процесса. Выделяемые экзотоксины всасываются в кровь и вызывают интоксикацию. Аллергическое состояние обусловлено аллергизирующим действием протеиновых антигенов, приводящим к развитию хронических процессов.

S.pneumoniae

Морфология и тинкториальные свойства.

Парные кокки, несколько удлиненной формы с заостренными наружными концами, напоминающими ланцет размером от 0,5x0,75 до 1x1,5 мкм. Диплококки расположены одиночно, но могут образовывать короткие цепочки. Неподвижны, спор не образуют. Имеют капсулу. Грамположительны.

Биологические свойства.

Пневмококки – факультативные анаэробы. Культивируются на средах, содержащих сыворотку или кровь при pH 7,6. На плотных питательных средах образуют мелкие полупрозрачные колонии, в жидкой среде – диффузное помутнение. Пневмококки не полностью разрушают гемоглобин, а превращают его в метгемоглобин, который обуславливает зеленоватую зону вокруг колоний на кровяном агаре.

Расщепляют до кислот без газа лактозу, глюкозу, мальтозу, сахарозу, не ферментируют маннит, салицин, сорбит.

Пневмококки содержат три основных антигена: полисахаридный, капсульный, М-антиген. На основании различий капсульного антигена эти микроорганизмы разделяют на серовары. Наиболее патогенными для человека являются пневмококки 1,2 сероваров.

S.pneumoniae образуют α , β - гемолизины, гиалуронидазу, пептиназу, мурамидазу.

Эпидемиология и патогенез

Источник заболевания – больной, бактерионоситель. Путь передачи – воздушно-капельный. Входные ворота - слизистая верхних дыхательных путей. В нижележащие отделы легких пневмококки проникают бронхогенным путем и вызывают пневмонию. В случае генерализации процесса развивается септикопиемия.

S. agalactiae

Имеют округлую форму, спор и капсул не образуют. Факультативный анаэроб. Колонизирует носоглотку, ЖКТ, влагалище. Основным резервуаром является ЖКТ. Поражает людей всех возрастных групп, но доминируют новорожденные. Вызывают послеродовые инфекции.

E. faecalis и E. faecium

Энтерококки, имеющие округлую или ланцетовидную форму. Грамположительны. Некоторые подвижны, спор, капсул не образуют. На плотных питательных средах, содержащих сыворотку, кровь, желчь, образуют мелкие сероватые колонии с гладкой или шероховатой поверхностью, на жидких – диффузное помутнение с выпадением осадка. На кровяном агаре некоторые штаммы дают зону гемолиза. Каталазоположительны. Обитают в кишечнике человека и животных.

Исследуемый материал.

Взятие исследуемого материала проводят так же, как и при стафилококковых инфекциях.

Микробиологическая диагностика.

В лаборатории проводится предварительная микроскопия исследуемого материала. Мазки окрашивают по Граму. Стрептококки располагаются одиночно, цепочками или в виде диплококков.

Посев исследуемого материала проводят на 5% кровяной агар. Посевы помещают в термостат при температуре 37⁰ на 24 ч. Идентификацию стрептококков начинают с изучения колоний в первичных посевах.

Колонии гемолитических стрептококков бывают:

А) правильной округлой формы, блестящие, напоминающие капельки росы - характерны для *S.pyogenes*.

Б) гладкие, мелкие, с блестящей влажной поверхностью - характерны для слабовирулентных штаммов *S.pyogenes*.

В) круглые, серовато-белого цвета с приподнятым центром - характерны для штаммов содержащих М-антиген.

Колонии зеленающих стрептококков бывают:

А) мелкие, серовато-зеленого цвета, с гладкой или шероховатой поверхностью - характерны для *S.agalactiae*, *E.faecalis*, *E. faecium*.

Б) полупрозрачные плоские, характерны для *S.pneumoniae*

Колонии негемолитических стрептококков серовато-белые, серовато-зеленоватые не дающие гемолиза, характерны для энтерококков.

Изучение гемолитической активности способствует выявлению патогенных штаммов, но не является дифференциально-диагностическим признаком.

Из колоний, подозрительных в отношении стрептококков, делают мазки, окрашивают по Граму, что позволяет дифференцировать стрептококки от грамотрицательных гемофильных бактерий, рост которых на кровяном агаре сходен с ростом гемолитического стрептококка.

При выявлении в мазках стрептококков, колонии пересевают в сывороточный бульон. Посевы инкубируют при температуре 37⁰ 24 час.

На следующий день в посевах изучают характер роста. Придонно-пристеночный рост характерен для *S.pyogenes*. Диффузное помутнение и образование гомогенного осадка характерно для *S.agalactiae*, *S.faecalis*, *S. faecium*, единичных штаммов *S.pyogenes*.

Из посевов делают мазки и после установления чистоты культуры приступают к идентификации стрептококков и энтерококков. С этой целью суточную бульонную культуру высевают на желчно-щелочной агар и на молоко с 0,1 % метиленового синего. Посевы помещают в термостат. Через 20-24 часа производят учет посевов и делают заключение о принадлежности микроорганизмов к стрептококкам или энтерококкам (табл. 4).

Таблица 4.

Сравнительная характеристика стрептококков или энтерококков

Микроорганизмы	Рост на желчно-щелочном агаре	Редукция метиленового синего в молоке
Стрептококки	-	-
Энтерококки	+	+

В пробирках с молоком энтерококки редуцируют метиленовый синий, вследствие чего среда обесцвечивается и становится кремового цвета.

В зависимости от полученных результатов делают заключение о выделении микроорганизмов группы энтерококков или проводят дальнейшую идентификацию видов стрептококков.

Идентификация *S. pyogenes*.

Осуществляется серологическим методом Ленсфильд-реакцией преципитации в агаровом геле, модифицированной в лаборатории стрептококковых инфекций института им. Н.Ф. Гамалеи.

На предметное стекло наливают 1% расплавленный агар толщиной не более 2 мм. В застывшем агаре трафаретом или металлической полой трубкой вырезают контур лунок $d=4$ мм: одну лунку в центре, 6 лунок по радиусам на равном расстоянии друг от друга. Расстояние между центральной лункой и периферическими должно составлять 3 мм. Центральную лунку заполняют стандартной диагностической сывороткой к стрептококку А. В периферические лунки вносят антиген, полученный из исследуемого материала. Одна лунка служит контролем, ее заполняют стандартным антигеном, содержащим полисахарид стрептококков группы А. Стекло помещают во влажную камеру (на сетку эксикатора с водой) и оставляют при комнатной температуре. Предварительный просмотр пластин проводят через 2-3 час и окончательный через 24 час от момента постановки реакции. Перед окончательным учетом реакции пластины погружают на 20 мин в 10% раствор хлорида натрия для устранения неспецифической реакции с тейхоевой кислотой. Экстракты, содержащие полисахаридные антигены стрептококков группы А, образуют с антителами диагностической сыворотки тонкие молочно-белого цвета линии преципитата, расположенные между центральной и соответствующей периферической лункой.

Приготовление антигена из исследуемого материала: колонии выделенного микроорганизма засевают во флаконы с 50 мл питательного бульона. Инкубируют 24 час в термостате. Суточную бульонную культуру отмывают большими объемами физиологического раствора применяя центрифугирование в течение 30 мин при 3000 об/мин. К отмытому осадку добавляют 0,06 молярный раствор HCl из расчета 0,5 мл раствора на 10^{11} микробных клеток (число микробных клеток определяют по оптическому стандарту мутности). Взвесь встряхивают, кипятят 15 минут, охлаждают и центрифугируют 30 мин при 3000 об/мин. Надосадок сливают и доводят его рН до 7,0, добавляя 1 молярный раствор едкого натра. В качестве индикатора используют 0,1 мл 0,04% раствора бромтиолового синего и цвет полученного антигена изменяется с соломенно-желтого до зеленого. Образовавшийся при добавлении щелочи осадок удаляют центрифугированием.

Идентификация *S. pneumoniae*.

Для выявления используют оптохиновый тест, тест с желчью, реакцию Нейфельда и, как дополнительный тест, биопробу.

1. Оптохиновый тест.

Чистую выделенную культуру засевают на агар, содержащий 1:50000-1:100000 оптохина. Посевы помещают в термостат при температуре 37⁰С. На следующие сутки учитывают результат. Пневмококки не растут в присутствии оптохина.

Можно использовать диски, пропитанные оптохином, которые накладываются на поверхность среды после посева. У пневмококков вокруг дисков образуется зона задержки роста диаметром не менее 18 мм.

2. Тест с желчью.

Основан на способности 10 % желчи лизировать пневмококк. В 2 пробирки с 2-3 мл сывороточного бульона с 10% желчи и без нее добавляют 0,5-1 мл испытуемой бульонной культуры и выдерживают 1 час при температуре 37⁰С. При лизисе пневмококка отмечается просветление бульона по сравнению с контролем. При сомнительной реакции пробирки оставляют при комнатной температуре до следующего дня и окончательно учитывают реакцию.

Можно использовать диски, пропитанные 20% раствором желчи. Диски накладывают на выросшую культуру и инкубируют в термостате 1-2 ч. По окружности диска на расстоянии 1-2 мм пневмококки лизируются, а *S.pyogenes* остаются без изменений.

3. Реакция Нейфельда (реакция набухания капсулы).

Основана на увеличении капсулы пневмококков в присутствии иммунной сыворотки. На мазок с чистой культурой наслаивают поливалентную диагностическую сыворотку, добавляют 1 каплю раствора метиленового синего и накрывают покровным стеклом. Выдерживают в термостате от 10 мин до 1 час. в зависимости от активности сыворотки. Микроскопируют сравнивая с контролем, где вместо сыворотки используют физиологический раствор.

При отсутствии диагностической сыворотки и оптохина пневмококки можно идентифицировать с помощью теста с желчью в сочетании с культуральными и морфологическими свойствами.

4. Биопроба.

Рекомендуется как дополнительный тест и используется для выделения пневмококков из исследуемого материала и изучения вирулентности чистой культуры.

а) Выделение пневмококков из материала.

Материал разводят физиологическим раствором 1:2 –1:5 и вводят внутрибрюшинно по 0,5 мл 2 белым мышам, весом 18-20 г. Через сутки вскрывают погибших животных или забивают одну мышь и производят посев крови из сердца на кровяной агар для выделения культуры микроорганизмов.

б) Изучение вирулентности.

Готовят различные разведения (с 10⁻¹ до 10⁻⁸) чистой культуры пневмококка и по 0,5 мл внутрибрюшинно вводят белым мышам, заражая по 4 мыши на каждое разведение. Через 5-7 дней определяют LD₅₀, по величине которой судят о вирулентности выделенной культуры.

Идентификация *S.agalactiae*.

Штаммы гемолитических и зеленящих стрептококков, выделенных при заболеваниях урогенетального тракта, дифференцируют с *S.agalactiae*, для чего используют CAMP – тест.

На кровяной агар, толщиной не менее 3 мм, через центр чашки Петри сплошной линией наносят суточную бульонную культуру *S.aureus* штамм Sg №511, продуцирующего β-токсин. Через 3-5 мин на эту же чашку Петри высевают штаммы стрептококков, подлежащих идентификации. Стрептококки наносят петлей параллельно друг другу и перпендикулярно по отношению к линии посева стафилококка, не доходя до нее 2 мм. На одну чашку Петри высевают не более 4 штаммов стрептококков. Посевы инкубируют при температуре 37⁰С в течении 18-24 час. Выращивание на кровяном агаре *S.agalactiae* совместно с *S.aureus*, продуцентом токсина, ведет к усилению лизиса эритроцитов и увеличению образуемых зон гемолиза, вследствие чего в месте пересечения посевов гемолиз приобретает форму бабочки.

Менингококковая инфекция

Менингококковая инфекция - острое инфекционное заболевание, характеризующиеся разнообразными как по характеру, так и по тяжести клиническими проявлениями: от назофарингита и простого носительства до генерализованных форм – гнойного менингита, менингоэнцефалита и менингококкемии с поражением различных органов и систем. Возбудитель относится к семейству Neisseriaceae, роду Neisseria, виду meningitidis.

Морфология и тинкториальные свойства.

Менингококк – диплококк, размером 0,6-1,0 мкм. Имеет форму кофейного зерна, но наблюдается большой полиморфизм – шаровидная, овальная, почкообразная формы. Каждая пара диплококков окружена нежной капсулой. Жгутиков нет, спор не образует. По Граму окрашивается отрицательно. В мазках наиболее молодые особи окрашены ярко, отмирающие бледно.

Биологические свойства

Менингококк – факультативный анаэроб, оптимальная температура размножения 37°C, рН среды 7,2-7,6. Культивируется на питательных средах с добавлением нативных белков – крови или сыворотки человека и других млекопитающих. В качестве источника углерода и азота менингококки используют аминокислоты (глутамин, таурин, аспарагин, L-аргинин, глицин, тирозин), которые необходимо включать в среду культивирования. Среда Мюллера-Хинтона является безсывороточной средой, где содержится полный набор аминокислот и мясной экстракт. Для получения большой массы микроорганизмов менингококк культивируют при повышенном содержании углекислого газа (7-10%).

На плотных питательных средах менингококк формирует бесцветные, опалесцирующие, плоские, круглые колонии 0,5-1,5 мм, с ровными краем. В сывороточном бульоне растет, образуя равномерную муть, через 3-4 дня на поверхности среды появляется нежная пленка. Ферментирует глюкозу, мальтозу с образование кислоты без газа, не разжижает желатин, обладает оксидазной активностью. Важным признаком, имеющим дифференциально-диагностическое значение, является неспособность менингококка синтезировать полисахариды из сахарозы (табл. 5)

Таблица 5

Ферментация углеводов различными видами Neisseria

	N.gonorrhoeae	N.meningitidis	N.subflava	N.flavescens	N.mucosa	N.flava	N.sicca
В сывороточном агаре, 37°C	+	+	+	+	+	+	+
В безсывороточном агаре, 37°C	-	-	+ (-)	+ (-)	+	(±)	+ (-)
В среде с 0,2% желчи	-	-	+	+	+	+	+ (-)
Образование пигмента	-	-	+	+	-	+	+ (-)
Глюкоза	К	К	К	-	К	К	К
Мальтоза	-	К	К	-	К	К	К
Сахароза	-	-	-	-	К	-	К
Лактоза	-	-	-	-	-	-	-
Фруктоза	-	-	-	-	К	К	К
Образование полисахаридов	-	-	-	+	+	-	+
Нитратов	-	-	-	-	+	-	-
Нитритов	- (+)	+	-	+	+	+	+
Зависимость CO ₂ при первичном выделении	+	+	-	-	-	-	-

При гибели микробной клетки высвобождается эндотоксин липополисахаридной природы.

Антигенная структура достаточно сложная и классификация менингококков основана на различиях в строении полисахаридов капсулы. Выделяют серогруппы А, В, С, D, X, Y, Z, W-135, H, J, K и L.

Микробиологическая диагностика

Лабораторная диагностика менингококковой инфекции осуществляется бактериологическим методом выделения и идентификации возбудителя, а также серологическим - выявлением антител в сыворотке крови человека и специфических антител в ликворе, крови, синусоидальной жидкости.

Проводят лабораторное обследование больных с клинически выраженной формой заболевания, стертой формой и с подозрением на менингококковую инфекцию. По эпидемическим показателям обследуют лиц, бывших в контакте с больными менингококковой инфекцией.

Бактериологическое исследование спинномозговой жидкости больного

1 день исследования. Спинномозговую жидкость в количестве 2-5 мл берут у больного при поступлении в стационар. Первую порцию (1 мл) берут в отдельную стерильную пробирку для общего ликворологического исследования, вторую порцию используют для бактериологического исследования. Если материал невозможно доставить в лабораторию, допустимо хранение при температуре 37⁰С в термостате в течении 48-72 часов.

В лаборатории стерильной пастеровской пипеткой со дна пробирки берут 0,3-0,5 мл материала по 2-3 капли засевают на поверхность 2 чашек Петри с подогретой питательной средой, растирая шпателем. Одна чашка содержит "шоколадный" агар, вторая - сывороточный. Посевы ставят в термостат при 37⁰С и создают условия повышенного содержания СО₂ в воздухе.

Спинномозговую жидкость оставшуюся в пробирке, используют для посева, на среду обогащения (полужидкий сывороточный агар). Рекомендуются засеивать на питательную среду для определения чувствительности к антибиотикам.

Таблица 6.

Свойства основных возбудителей менингитов, учитываемые через 24 часа от начала бактериологического исследования

Морфология клеток	Интенсивность роста на агаре		Изменение цвета шоколадного агара вокруг колонии	Обработка колонии 3% КОН*	Грам -окраска	Наличие			Подозреваемые микроорганизмы
	20% сывороточном	Шоколадном				Оксидазы	Ката-лазы	Уреазы	
Капсульные полиморфные кокки	++++	++++	---	+	-	+	+	---	Neisseria meningitidis
Мелкие	---	++++	---	+	-	---	+	+	Haemophilis

полиморфные палочки									influenzae
Капсульные удлиненные парные кокки	++++	++++	Желто-зеленый	---	+	---	---	---	Streptococcus pneumoniae
Цепочки и пары из кокков	++++	++++	Зеленый	---	+	---	---	---	Streptococci B,D, viridans
Мелкие палочки частоколом и под углом	++++	++++	Зелено-коричневый	---	+	---	+	---	Listeria monocytogenes
Пары и цепочки коккобактерий	++++	++++	---	+	-	---	+	+	Acinetobacter calcoaceticum

Примечание:* В каплю 3% раствора КОН вносят петлю (колонию) культуры, эмульгируют. Образование в капле студенистой массы, тянущейся за петлей указывает на наличие грамотрицательной флоры (-), крошащуюся консистенцию образует грамположительная флора (+). На основании бактериоскопии ставится предварительный ответ.

Микроскопия. Из оставшегося материала готовят мазки и окрашивают метиленовой синью или по Граму в модификации Калины. Микроскопия окрашенных мазков спинномозговой жидкости в ряде случаев позволяет установить наличие бактерий, вызывающих гнойный менингит. Следует производить дифференцировку с пневмококками, а так же *Haemophilis influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* и др. (табл. 6)

2 день исследования. Ведется просмотр чашек с посевами и из колонии готовят мазки, окрашивают, ставят реакцию с 3% раствором КОН и биохимические тесты на оксидазу, каталазу, уреазу. Чашки с отсутствием роста инкубируют дополнительно одни сутки. На “шоколадном” агаре колонии менингококков нежные, сероватого цвета, с блестящей поверхностью и ровными краями, имеют масляную консистенцию, размером от 0,1 до 3,0 мм.

На основании микроскопии мазков из колоний и результатов первичных биологических тестов выдается предварительный ответ.

3 день исследования. Культуры, отселенные из отдельных колоний, просматриваются под МБС и ставят пробу с 3% раствором КОН. Для оценки чистоты выросшей культуры готовят мазки и просматривают. При обнаружении морфологически типичных грамотрицательных кокков проводят идентификацию культуры, а так же определяют ее лекарственную устойчивость. На этом этапе возможна выдача окончательного положительного ответа для менингококков и для других микроорганизмов (кроме пневмококка и стрептококков).

4 день исследования. Учитывая результаты посевов с целью дифференциации менингококков от непатогенных нейсерий и *M. catarrhalis*, а так же чувствительности к химиопрепаратам. Возможна выдача положительного ответа. Культуру менингококков, выросшую на сывороточном агаре при 37⁰С, можно использовать для серологической идентификации менингококков в реакции агглютинации, реакции преципитации на агаре, а так же для определения лекарственной устойчивости.

После учета результата проб на лекарственную чувствительность и свойства других возбудителей, выдают окончательный ответ.

Бактериологическое исследование крови

При подозрении на менингококковую инфекцию проводят бактериологическое исследование крови. В качестве экспресс-метода диагностики рекомендуется приготовление мазка “толстой капли” из крови, взятой из вены или пальца. В препарате

“толстой капли” менингококки имеют такую же морфологию, как в спинномозговой жидкости, но чаще располагаются по одиночке и имеют более крупную форму. В мазке, имеющим голубой фон, хорошо видно окрашенные в желтый цвет лейкоциты и между ними множество мелких, темно-синих, располагающихся кучками, парно или по одному кокков. Результат бактериоскопии является предварительным ответом.

Кровь, взятую из вены стерильно засевают на чашки с питательными средами, а затем на 0,1% полужидкий агар в отношении 1:10 т.е. 1-2 мл крови можно посеять в пробирку с 7-10 мл полужидкого агара или 5-10 мл крови засеять во флаконы с 50 мл среды.

После суточной инкубации материал высевает на сывороточный и “шоколадный” агары в чашки Петри. При отрицательном результате рекомендуется инкубировать в течение недели с ежедневными посевами.

Выделение и идентификацию гемокультур проводят так же, как при исследовании спинномозговой жидкости.

Бактериологическое исследование экссудата из петехий.

При менингококкемии иногда удается обнаружить менингококки непосредственно в экссудате кожных петехий.

Экссудат берется в центре петехий из некротизированных участков стерильной бактериологической петлей. При неповрежденной коже экссудат берут шприцем, содержащим 0,1-0,2 мл физиологического раствора. Физиораствор вводят в толщу петехии и отсасывают обратно. Посев экссудата производят в чашки Петри с сывороточным агаром, содержащим антибиотики ристомидин или линкомицин для подавления кожной флоры. Засеянные чашечки инкубируют при 37⁰С 24 часа (в случае отсутствия 48 час). Подозрительные на менингококки колонии отсевают и изучают по схеме бактериологического исследования спинномозговой жидкости.

Из остатка экссудата готовят мазки. Мазки из содержимого петехий можно приготовить в виде отпечатков. Для этого стерильной петлей скарифицируют поверхность петехий, затем прикладывают несколькими местами стерильное предметное стекло, фиксируют пламенем горелки, окрашивают.

На основании данных микроскопии возможно выдача предварительного ответа.

Бактериологическое исследование слизи на менингококки

1 день исследования. Слизь с задней стенки глотки берут натошак или через 3-4 часа после приема пищи стерильными ватными тампонами. Материал берут с обязательным надавливанием на корень языка. Тампон вводят за мягкое небо в носоглотку и проводят 2-3 раза по задней стенке. При извлечении тампон не должен касаться зубов, слизистых щёк, языка, язычка.

Материал может быть засеян на месте его взятия на чашку Петри с питательной средой, или погружен в пробирку с транспортной средой, или взят смоченным тампоном, который доставляют в лабораторию. Бульон для тампонов готовят на питательной среде с добавлением 20% сыворотки животных и ристомидина из расчета 20 ед/мл среды.

Для посева материала используется сывороточный агар с добавлением в него антибиотиков ристомидина или линкомицина с конечной концентрацией 20 ед/мл питательной среды.

2 день исследования. Просматривают чашки, засеянные накануне, визуально и под лупой-микроскопом МБС, подозрительные колонии отсевают на секторы чашки с сывороточным агаром (не менее 3-5 колоний.)

На средах с ингибиторами вырастают только грамотрицательные бактерии, преимущественно, нейссерии. При отсутствии роста, в чашках с антибиотиками проводят

повторный просмотр их через 48 час. В эти же сутки делают высеивание из полужидкой среды (0,1%) без ингибитора.

3 день исследования. Изучают рост чистых культур, отсеянных из отдельных колоний в предыдущий день. Культуры, колонии которые имеют желтый пигмент различной плотности, а также характеризующийся сухим ростом, отбрасывают.

Для дальнейшего исследования на менингококки оставляют только непигментированные культуры, дающие нежный влажный рост. Из них готовят мазки, проводят микроскопию чистой культуры. В первых генерациях для менингококков характерны полиморфизм и вариабельность окраски, что не наблюдается у непатогенных нейссерий. Кроме микроскопии проводят идентификацию культур группоспецифическими сыворотками по ферментативным свойствам.

4 день исследования. Учитывают результаты роста на безсывороточном и желчном агаре, сахаролитическую активность, ставят реакцию с водным раствором Люголя на продукцию полисахарида, проводят окончательную серологическую идентификацию менингококков по результатам реакции агглютинации. В тот же день выдают окончательный ответ.

Исследование трупного материала.

В качестве материала для бактериологического исследования используют кровь, ликвор, кусочки мозга, кусочки ткани или гноя из печени, легкого, селезенки. Кровь берется стерильно из правого сердца, после вскрытия скальпелем с помощью стерильной пипетки с грушей в количестве 7-10 мл. Из них 2-3 мл засевают в 25 мл 0,1% полужидкого агара, а оставшиеся 5-7 мл используют для серологических исследований в ВИЭФ.

Ликвор берут стерильной пипеткой из околооболочечного пространства в стерильную пробирку в количестве 3-5 мл и немедленно высевают на чашки с питательными средами. В количестве 0,1 мл исследуемый материал наносят в центр чашки и распределяют по ее поверхности покачиванием.

Бактериологическое исследование ликвора и крови проводят по схеме бактериологического анализа спинномозговой жидкости. Кроме общепринятого набора сред следует добавить чашку сывороточного агара с антибиотиками (ристомин, линкомицин).

Гной с мозговой оболочки берут стерильным ватным тампоном и засевают газоном или штрихами на чашки с шоколадно-сывороточным агаром и в пробирку со средой обогащения, делают 2 мазка на предметных стеклах, один из которых красят метиленовым синим, другой по Граму.

Для взятия материала из мозга и других органов к месту разреза прикасаются раскаленным шпателем, материал берут из глубины разреза стерильным ватным тампоном.

Посев производят на питательные среды и дифференцируют. Необходимо проводить изучение мазков отпечатков с поверхности мягких мозговых оболочек. После высушивания и фиксации над пламенем горелки, мазки окрашивают и просматривают.

При бактериологическом исследовании трупного материала: кусочков ткани, крови, жидкости из полостей окончательный отрицательный ответ выдается не ранее восьмого дня с момента посева исследуемого материала.

Методы серологической идентификации менингококков или их антигенов.

Реакция агглютинации в полистероловых пластинках. При серологическом группировании штаммов менингококка необходимо использовать при постановке реакции агглютинации микробную взвесь. Густота взвеси обеспечивается ростом колоний на 1/8-1/10 части чашки Петри. Запаянной изогнутой пипеткой снимают бактериологическую массу и тщательно эмульгируют в двух каплях физиологического раствора, а затем для получения оптимальной рабочей густоты к взвеси добавляют до 1,0 мл физиологического

раствора. Взвесь разносят по 1 капле в лунки, содержащие агглютинирующие группоспецифические сыворотки. (1 капля сыворотки + 1 капля взвешенной культуры). Реакцию учитывают в течение первых трех минут. Заключение о принадлежности культуры к той или иной серогруппе производят на основании положительной реакции агглютинации с соответствующими сыворотками по 4 плюсовой шкале (при отсутствии агглютинации в физиологическом растворе).

При наличии реакции агглютинации с несколькими сыворотками серологическую группу определяют по наибольшему титру реакции агглютинации с одной из сывороток, взятой в разведении 1:2; 1:4; 1:8. В случае реакции с несколькими сыворотками, одинаковой интенсивности, культуру определяют как полиагглютинабельную. В этих случаях проводят серогруппирование в реакции преципитации.

Реакция микропреципитации для определения серогруппы менингококков.

В чашку Петри или стеклянную пластинку размером 9x12 см наливают 20 мл, расплавленного 1% агара на физиологическом растворе. В застывшем агаре с помощью металлических трубок просекают отверстия диаметром 3 мм, из которых агаровые пробки удаляют. Расстояние между центрами лунок 0,5 см. Лунки в агаре располагают следующим образом: в центральную лунку пастеровской пипеткой наливают сыворотку, в периферические – прогретые при температуре 100⁰С в течение 15 мин взвеси испытуемых культур. Для реакции микропреципитации используют не разведенные сыворотки.

Концентрация испытуемой суточной культуры менингококка, выращенной на 20% сывороточном агаре, должна составлять 30-60 единиц, т.е. быть в 3-6 раз гуще оптического стандарта мутности в 10 ед. Чашки Петри или пластины, заполненные сывороткой и антигенами, помещают в во влажную камеру на 24-48 час при температуре 20-22⁰С. Реакция проявляется только со штаммами менингококков гомологичной серогруппы в виде 1-2 линий преципитации.

Метод встречного иммуноэлектрофореза (ВИЭФ) для определения группоспецифического менингококкового антигена в спинномозговой жидкости.

У больных с гнойным менингитом, желательна до применения химиотерапии, берут СМЖ которую исследуют на присутствие специфического полисахаридного антигена. Для этого используют аппарат для иммуноэлектрофореза ПЭФ-3 или любой другой марки. В аппарат заливают веронал-мединаловый буфер, содержащий дистиллированной воды 21, 9 – мединала и 3,45 г веронала, рН –8,6. Приготовленный 1% агар растопленный и остуженный до 60⁰С, наносят в количестве 20 мл на поверхность стеклянной пластинки, размером 9x12 см, помещенной на горизонтальный столик. После застывания агара пробойником или металлической трубкой, диаметр которой равен 3 мм, высекают 3 параллельных ряда отверстий на расстоянии 3 мм друг от друга, по числу групповых сывороток. Ряды располагают перпендикулярно к направлению силы тока.

Менингококковые антисыворотки разных серогрупп вносят в лунки, расположенные со стороны анода (+), а спинномозговую жидкость в лунки со стороны катода (-). Сыворотки каждой группы вносят в разные лунки. В отдельную лунку помещают заведомо положительный контроль, который позволят оценивать правильность постановки теста. В качестве контроля используют менингококковую вакцину серогруппы А с гомологичной сывороткой в концентрации 10-20 мкг/мл. Приготовленную пластинку помещают в аппарат для иммуноэлектрофореза на 20-30 мин при силе тока 12-15 мА.

Аппарат работает при комнатной температуре. При положительной реакции через 10 минут после включения тока, между лунками появляются линии преципитации, которые хорошо видны в проходящем свете. Для ускорения процесса в тот же день, можно 2-3 пропускать ток через пластинку в течение 5-10 мин, т.е. время анализа увеличивается до 60 минут.

На основании ВИЭФ ликвора дают ответ, который в зависимости от результата формируется в трех вариантах:

А) при наличии линии преципитации с одной из группоспецифических сывороток пишут: в спинномозговой жидкости в реакции ВИЭФ выявлен специфический антиген серогруппы А (или другой серогруппы).

Б) при наличии линий преципитации с несколькими группоспецифическими сыворотками ответ пишут: В спинномозговой жидкости в реакции ВИЭФ выявлены менингококковые антигены.

В) при отсутствии линий преципитации пишут: В спинномозговой жидкости в реакции ВИЭФ специфические антигены не выявлены.

РНГА для выявления антител при менингококковой инфекции.

Данную реакцию проводят как дополнительный метод диагностики менингококковой инфекции. Сыворотки исследуются в динамике заболевания. Кроме того, РНГА применяется для оценки иммунологической эффективности противоменингококковых вакцин и для ретроспективного выявления локализованных форм менингококковой инфекции в очагах заболевания.

Сроки взятия крови при генерализованной форме менингококковой инфекции 1-3 день, 2, 3 недели. За условно диагностический титр антител с полисахаридным и менингококковым антигенами серогруппы А и С у взрослых и детей принимают положительную реакцию в разведении сыворотки 1:40-1:80.

У детей до 1 года положительную реакцию наблюдают в более поздние сроки, со второй недели болезни, а за условно диагностический титр антител у детей до трех лет к А и С антигенам принимают положительную реакцию в разведении сыворотки 1:20 и выше.

Заключение: В зависимости от наличия исследуемого материала, а так же сроков его взятия проводится комплексная клиническая микробиологическая диагностика менингококковой инфекции. Группоспецифическая активность менингококков сохраняется в течение двух недель.

Кишечные инфекции, вызванные бактериями семейства *Enterobacteriaceae*

К семейству *Enterobacteriaceae* относятся 30 разнообразных по биологическим свойствам родов микроорганизмов, семейство энтеробактерий насчитывает более 100 видов и огромное число серо- и фаговариантов. Среди них имеются безусловно патогенные виды, условно-патогенные и сапрофитные микроорганизмы. Большая группа патогенных и условно-патогенных представителей семейства входит в число возбудителей таких заболеваний, как энтероколиты, шигеллёзы, иерсинеозы, сальмонеллёзы, заболевания тифо-паратифозной группы, гнойно-воспалительные заболевания любой локализации. Работа по их выделению и идентификации составляет немалую долю в деятельности бактериологических лабораторий службы здравоохранения. Традиционно основную группу патогенных кишечных бактерий составляют представители родов *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* – возбудители таких острых инфекционных заболеваний, как энтероколиты, гастро- и колиэнтериты, шигеллезы, инфекции тифо- паратифозной группы и сальмонеллезные токсикоинфекции, а так же микроорганизмы, относящиеся к родам *Yersinia*, *Proteus*, *Morganella* и многим другим. Сложность в выделении и идентификации возбудителей заболеваний, вызванных этими микроорганизмами, состоит в том, что многие из них имеют сходную морфологию и биологические свойства и отличаются друг от друга только по некоторым специфическим признакам, таким, как биохимические свойства, антигенная структура, способность лизироваться специфическими фагами.

Основные биологические свойства энтеробактерий

Представители семейства энтеробактерий, как правило, тонкие полиморфные Г-палочки размером 0,3-1,0 – 1,0-6,0 мкм. Среди них имеются подвижные (перетрихи) и

неподвижные микроорганизмы. Они не образуют спор, не кислотоустойчивы, некоторые имеют капсулу, многие из них обладают пиллями, выделяют факторы адгезии и способны адгезироваться на слизистых кишечника, инвазировать и колонизироваться. Среди энтеробактерий встречаются патогенные, условно-патогенные и сапротрофные варианты. Патогенные вырабатывают эндотоксины, а иногда, и экзотоксины типа холерогена или шигоподобного токсина. Условно-патогенные способны вызывать гнойно-воспалительные заболевания любой этиологии, при любых входных воротах.

Энтеробактерии хорошо размножаются в мясо-пептонных средах, как в присутствии кислорода, так и без него. По типу питания – это хемоорганотрофы. В жидких средах бактерии образуют диффузное помутнение, пленку на поверхности, кольцо на стенке пробирки, осадок на дне. На плотных средах – круглые, выпуклые, блестящие (иногда слизистые) S-колонии и плоские, с неровными краями зернистые R-колонии. В большинстве случаев, колонии энтеробактерий не пигментированы.

Для кишечных бактерий характерен дыхательный и бродильный метаболизм. При ферментации глюкозы, других углеводов и многоатомных спиртов бактерии продуцируют кислоту с выделением газа или без газообразования. Большинство энтеробактерий - каталазоположительны, оксидазоотрицательны, нитраты редуцируют в нитриты.

Все виды семейства имеют соматический O-антиген (O-АГ), подвижные представители семейства – жгутиковый H-АГ, некоторые – капсульный K- или Vi-АГ. O-АГ представлены липополисахаридами наружной мембраны бактериальной клетки, они термостабильны. Штаммы, лишенные O-АГ, образуют шероховатые R-колонии и, как правило, авирулентны. H-АГ - термолабильны, состоят из белка жгутиков флагеллина, K-АГ - термостабильны, содержат полисахариды капсулы наружной оболочки, находятся за пределами O-АГ и могут блокировать (экранировать) способность бактерий вступать в реакцию агглютинации со специфической O-антисывороткой.

Учитывая биологические свойства семейства Enterobacteriaceae, идентификацию при выделении чистых культур из клинических образцов проводят по морфологическим, тинкториальным, биологическим (биохимическим) и антигенным свойствам.

Первичную идентификацию культур Г-палочек для их отнесения к семейству энтеробактерий проводят по способности бактерий ферментировать лактозу и (или) сахарозу, глюкозу с учетом газообразования, выделять H₂S при разложении серусодержащих соединений и разлагать мочевины (тест на уреазу).

Дальнейшая идентификация энтеробактерий заключается в уточнении их биохимических свойств на основе способности разлагать или утилизировать определенные вещества. Основными являются следующие тесты: оксидазный, на ферментацию глюкозы, на восстановление нитратов, на индолообразование, на утилизацию нитрата, на уреазную активность, на декарбоксилирование и гидролиз аминокислот, на фенилаланиндезаминазную активность, на способность образовывать H₂S, на подвижность и реакции с метиленовым красным и Фогеса-Проскауэра (VP-тест) (табл. 7). Идентификацию серологических типов энтеробактерий проводят со специфическими сыворотками в реакции слайд-агглютинации для двух или трех антигенов, например: O-, K- (Vi-), H-, E. coli 0111:K55:H3. Особенности постановки реакции агглютинации с O-, K- и H- антигенами будут приведены далее в соответствующих разделах.

Основные питательные среды для выделения и идентификации патогенных энтеробактерий

Большинство энтеробактерий растет на простых питательных средах – МПБ и МПА. Однако, в ряде случаев необходимы более богатые и сложные среды, например, среды обогащения для сальмонелл, дифференциально-диагностические среды для первичной идентификации энтеробактерий и специальные среды, содержащие субстраты для конкретного определения биохимических (ферментативных) свойств выделенного возбудителя.

Среды накопления (обогащения) для сальмонелл:

1. Селенитовая среда содержит пептон, одно- и двузамещенный фосфорнокислый натрий, обеспечивающий буферную емкость среды, лактозу, влияющую на реакцию среды и гидроселенит натрия, как ингибитор сопутствующей микрофлоры.
2. Магниевая среда содержит пептон с дрожжевым диализатом в качестве источника питания сальмонелл, калий фосфорнокислый двузамещенный для создания буферной емкости среды, хлористые соли калия, магния и натрия для изотоничности и бриллиантовую зелень для ингибирования сопутствующей микрофлоры.
3. Среда Мюллера (тетратионатный бульон Мюллера) состоит из бульона Хоттингера с содержанием амминого азота 1,2-1,3 % и солей кальция, тиосульфата натрия, раствора Люголя, избирательно подавляющего рост многих видов бактерий микрофлоры кишечника и не влияющий на рост сальмонелл.
4. Среда Кауфмана состоит из среды Мюллера, бычьей желчи и бриллиантового зеленого.
5. Среда Раппопорт состоит из МПБ или бульона Хоттингера, бычьей желчи, глюкозы и индикатора Андрее.

Плотные питательные среды для первичного посева энтеробактерий с целью выделения чистых культур.

1. *Агар Эндо*. Это слабоселективная среда бледно-розового цвета для дифференциальной диагностики энтеробактерий. Лактоза и основной фуксин, входящие в ее состав, дифференцируют лактозо-положительные (они вырастают в виде окрашенных в красный цвет с металлическим блеском колоний) от лактозоотрицательных (слаборозовые или бесцветные на этой селективной среде).

2. *Агар с эозин-метиленовым синим (среда Левина)* – слабоселективная среда для выделения энтеробактерий. Готовая среда прозрачна, окрашена в фиолетовый цвет. Дифференциальная способность основана на изменении рН под действием кислоты, образующейся при ферментации лактозы и (или) сахарозы. Индикатор, выпадая в осадок при рН 4,7, окрашивает колонии кислотообразующих бактерий в темный сине-фиолетовый, почти черный цвет. Бактерии, не ферментирующие указанные сахара, образуют бесцветные или розовые колонии.

3. *Агар Плоскирева* – высокоселективная среда для выделения шигелл и сальмонелл. Готовая среда имеет розово-желтый цвет. Входящие в ее состав соли желчных кислот, бриллиантовый зеленый и йод подавляют рост грамположительных микроорганизмов, протей, задерживают рост эшерихий и другой сопутствующей микрофлоры. Лактозоположительные бактерии, благодаря сдвигу рН в кислую сторону, окрашиваются индикатором нейтральным красным в брусничный цвет. Лактозоотрицательные бактерии вырастают в виде бесцветных или слабо-розовых колоний. На этой среде плохо растут некоторые виды сальмонелл и *Sh.dysenteriae 1*.

4. *Висмут-сульфит агар*. Это строгоселективная среда для выделения сальмонелл. Она не прозрачна, зеленовато-горохового цвета. В ее состав входят сульфит висмута и бриллиантовая зелень, которые подавляют рост грамположительной микрофлоры и многих энтеробактерий, в том числе, шигелл. Через 36-48 часов после посева сальмонеллы выделяют из сульфита висмута H_2S и бесцветный сульфид висмута переходит в черный сульфит висмута. Колонии сальмонелл, выделяющие H_2S , вырастают темно-окрашенными, а среда под ними чернеет. Сальмонеллы, не выделяющие H_2S формируют бесцветные, сероватые или зеленые колонии.

Все вышеперечисленные среды выпускают в сухом виде. Способ приготовления указан на этикетке.

Среды для первичной идентификации энтеробактерий

1. *Агар Клиглера*. Среда предназначена для дифференциации бактерий по их способу ферментировать глюкозу и лактозу, а так же образовывать аммиак и сероводород. Готовая среда имеет красновато-бурый цвет. Среду разливают в пробирки и укладывают так, чтобы верхний слой среды застыл в виде скошенного участка, а нижний образовал столбик. В среде имеется 2 индикаторные системы, первая из них регистрирует образование аммиака и расщепление сахаров, а вторая существует для обнаружения сероводорода.

При расщеплении сахаров среда подкисляется и, благодаря присутствию индикатора фенолового красного, окрашивается в желтый цвет, при этом в скошенной части агара глюкоза утилизируется в первые часы роста бактерий, ферментирующих этот сахар. К моменту учета реакции, а это обычно 18-24 час после посева материала, для своего питания бактерии используют пептоны, имеющиеся в среде в качестве белковой основы. При этом в скошенной части среды происходит образование аммиака и подщелачивание, среда приобретает красный цвет, а в столбике, где к этому времени в анаэробных условиях произошло разложение глюкозы, желтый цвет сохраняется. Получается желтый столбик и красный скос. Если бактерии сбраживают кроме глюкозы и лактозу, среда подкисляется и становится желтой полностью. Для обнаружения сероводорода в среду введены соли железа, окрашивающие образующийся сероводород в черный цвет. При положительной реакции среда чернеет, что проявляется в виде кольца в средней части, которое постепенно расширяется и может помешать прочесть реакцию среды.

2. *Трехсахарный агар с мочевиной (среда Олькеницкого)*. Принцип действия этой среды тот же, что и среды Клиглера. Присутствие в составе среды мочевины позволяет определить наличие у бактерий фермента уреазы. Выделение аммиака при расщеплении мочевины изменяет рН среды до 8,1, при этом вся среда приобретает красный цвет. Поэтому для уреазоположительных штаммов энтеробактерий учет ферментации углеводов в комбинированных средах невозможен и требуется использование других сред (табл.7).

3. *Сорбитол E.coli 0157 : H7 агар*, среда, предназначенная для выделения и дифференциации энтерогеморрагических кишечных палочек, например, E.coli O157 : H7. Действие среды основано на способности подобных кишечных палочек ферментировать Д – сорбит, входящий в состав среды.

Среды для дальнейшей идентификации энтеробактерий

Для дальнейшей идентификации энтеробактерий используются моносубстратные среды. Основные из них, или среды и тесты минимального дифференцирующего ряда, перечислены ниже.

1. *Цитратный агар Симонса* - для дифференциации энтеробактерий по их способности использовать в качестве источника углерода цитрат натрия. При положительной реакции цвет среды изменяется из оливкового на синий.

2. *Цитратный агар Кристенсена* для дифференциации шигелл и эшерихий, а также S. gallinarum (цитрат+) от S.pullogum (цитрат-). Действие среды основано на способности некоторых бактерий утилизировать цитрат натрия в щелочной среде. При положительной реакции цвет среды меняется с желтого на розовый или красный.

3. *Среда с малонатом* применяется для дифференциации энтеробактерий по признаку ферментации малоната натрия. При положительной реакции цвет среды меняется с бледно-оливкового на ярко-синий.

4. *Среда с мочевиной Кристенсена* предназначена для выявления у энтеробактерий фермента уреазы. При положительной реакции цвет среды меняется с желтого на красный.

5. *Среда с мочевиной Преуса* предназначена для выявления разложения мочевины, – как и среда Кристенсена. При положительной реакции цвет среды меняется с оливкового на синий, при отрицательной – с оливкового на желтый.

6. *Среда Кларка* используется для постановки реакции с метиловым Красным (MV –

тест) и Фогеса-Проскауера (VP – тест).

а) В реакции с метиловым красным определяют степень ферментации глюкозы с образованием смеси кислот. В случае положительной реакции, при рН 4,0-5,0, среда с выросшей культурой из бесцветной становится красной, в случае отрицательной реакции, при рН 6,0-7,0, среда желтеет.

б) В реакции Фогеса-Проскауера определяют образование ацетоина (ацетилметилкарбинола), промежуточного продукта расщепления глюкозы до бутилен-гликоля, осуществляемого некоторыми энтеробактериями. Для проведения теста используют 4-5 суточную культуру, при положительной реакции появляется красное окрашивание среды. Среда с углеводами предназначена для дифференциации бактерий по их способности ферментировать углеводные субстраты с образованием нескольких кислот, спиртов и альдегидов и газообразных веществ. В зависимости от используемого индикатора цвет реакции различен.

7. *Среды с аминокислотами* – лизином, орнитином, аргинином предназначены для дифференцирующей способности энтеробактерий расщеплять разные аминокислоты. Продукты расщепления аминокислот подщелачивают среду. При использовании индикатора бромтимолового синего исходно желтая среда в случае положительной реакции приобретает синий или фиолетовый цвет.

8. *Среды с органическими кислотами* – Д, L Y-тартараты, мукат, цитрат предназначены для дифференциации сальмонелл, которые с помощью специфических энзимов расщепляют эти субстраты. Не засеянные среды имеют синий цвет с зеленоватым оттенком. При росте сальмонелл, расщепляющих указанные субстраты, цвет среды меняется от зеленовато-желтого до мутно-белого. При отрицательной реакции среда мутнеет, но остается синей.

Ускоренные и упрощенные методы бактериологического исследования энтеробактерий

Имеется значительное количество ускоренных и упрощенных методов идентификации энтеробактерий. В их основе лежит принцип рационального выбора дифференцирующих субстратов. Это могут быть комбинированные среды в пробирках, наборы контейнеров, содержащих отдельные субстраты в лунках, диски (системы индикаторные бумажные, СИБ), полоски бумаги или бумажные поплавки, пропитанные определенными ингредиентами. Часть из них предназначена для полной идентификации, другие - для ускорения и упрощения отдельных этапов анализа. Все идентификационные системы снабжены подробной инструкцией и могут быть использованы в бактериологических лабораториях. В качестве примера приведем выпускаемый в НИИ эпидемиологии и микробиологии (г. Нижний Новгород) СИБ для видовой идентификации энтеробактерий. Набор №2А включает 9 наименований субстратов и используется для межродовой идентификации бактерий, набор №2Б включает 25 субстратов и тестов и дает возможность видовой идентификации энтеробактерий по отношению к этим субстратам. Методы идентификации возбудителей кишечных инфекций из семейства энтеробактериация с использованием мультитест-систем не могут полностью заменить классический бактериологический анализ, а служат лишь дополнительным способом изучения разнообразных ферментативных признаков энтеробактерий.

Таблица 7

Первичная идентификация энтеробактерий по биохимическим реакциям в комбинированной среде

Реакция в среде Олькеницкого, Клиглера				Предполагаемые энтеробактерии
лактоза и (или) сахароза*	глюкоза	серо-водород	мочевина**	
–	К	–	–	Shigella, некоторые серовары сальмонелл, Escherichia, Hafnia, P. Inconstans, Y. enterocolitica
–	КГ	–	–	S. paratyphi А и некоторые другие серовары сальмонелл, некоторые биовары S. flexneri 6,

				Escherichia, Hafnia, P. Inconstans.
—	К	+	—	S.typhi и некоторые другие серовары сальмонелл
—	КГ	+	—	Salmonella, Citrobacter, Edwardsiella
+	К	—	—	Escherichia, Citrobacter или не энтеробактерии
+	КГ	—	—	Escherichia, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia
+	КГ	+	—	Citrobacter
.	.	.	+	Proteus (кроме P.inconstans), Yersinia
.	Г	.	+	Proteus (кроме P.inconstans)
—	—	—	—	Не энтеробактерии

Условные обозначения: Г - кислота, Г - газ, . - учет реакции затруднен, (-) - реакция отрицательна, (+) - реакция положительна; * - при применении среды Олькеницкого; ** - при использовании среды Клиглера проводят параллельный посев в среду с мочевиной (по Преусу или Кристенсену), либо посев с применением соответствующего теста СИБ.

Методика испытания культур энтеробактерий на чувствительность к фагу

Дополнительным тестом для подтверждения принадлежности культур к роду Shigellae служит проба с соответствующим поливалентным родоспецифическим бактериофагом. Для шигелл используют диагностический жидкий бактериофаг или лечебный дизентерийный фаг. Для идентификации сальмонелл используют поливалентный сальмонеллезный О-бактериофаг или лечебный сальмонеллезный поливалентный фаг. Фаги используют для реакции фаголизиса в бульонных культурах возбудителя или наносят на плотную питательную среду - подсушенный слабощелочной агар поверх двух капель исследуемой бульонной культуры. Положительную реакцию на наличие лизиса определяют по просветлению бульонной культуры через 18-20 час инкубации в термостате или по появлению в месте нанесения фага на плотную среду очерченного сливного лизиса (++++) , полусливного (+++) или отчетливых отдельных негативных колоний (++) , видимых невооруженным глазом. При отсутствии лизиса наблюдается активный (сплошной) рост культуры.

Материал для исследования, отбор проб, особенности посева в соответствии с характером пробы

Успех по выполнению бактериологического анализа при идентификации энтеробактерий во многом зависит от правильности выбора и взятия материала для исследования.

Отбор клинических материалов следует проводить до антибиотико- и химиотерапии, а пробы материала помещать в стерильные пробирки, банки для предохранения от контаминации посторонней микрофлорой, высев в питательные среды проводить в максимально быстрые сроки или использовать консервирующие растворы - фосфатный буфер с рН=8,0, смесь глицерина с 0,9% раствором NaCl в соотношении 1:1.

Испражнения используют в качестве материала для исследования при выделении всех патогенных энтеробактерий. Испражнения, взятые непосредственно из судна, горшка, тщательно продезинфицированных осветлённым раствором хлорной извести и многократно отмытым горячей водой до полного удаления дезинфектанта, при наличии в испражнениях слизи, крови и других патологических примесей, их обязательно включают в пробу для анализа. При невозможности получения испражнений после дефикации материал собирают непосредственно из прямой кишки с помощью ректальных ватно-марлевых тампонов и засевают на плотные высокоселективные (Плоскирева), низкоселективные (Эндо, Левина) или строгоселективные (висмут-сульфит агар) среды или в среды обогащения для энтеробактерий, если материал взят ректальным тампоном, при этом получая копрокультуру.

Кровь используют для получения гемокультур при диагностике брюшного тифа и паратифов, а также при лихорадочных состояниях, связанных с инфицированием

энтеробактериями другой родовой принадлежности. Кровь берут из локтевой вены с соблюдением строгих правил асептики с первых часов и на протяжении всего лихорадочного периода и у постели больного засевают в 10-кратный объем среды обогащения. Используют одну из следующих сред: Мюллера, Раппопорт, 10 процентный желчный бульон, посев в дистиллированную воду по Клодницкому.

Рвотные массы и промывные воды желудка используют в качестве материала для бактериологического анализа при острых кишечных заболеваниях с соответствующей симптоматикой. Рвотные массы нейтрализуют раствором бикарбоната натрия, промывные воды желудка берут из первых порций без добавления перманганата калия или других дезинфицирующих средств. Материал засевают в среды обогащения или МПБ.

Желчь (дуоденальное содержимое) используют при диагностике заболеваний, вызванных сальмонеллами тифо - паратифозной группы и для выявления бактерионосительства после перенесенного тифа или паратифов. Материал собирают при дуоденальном зондировании, порции В и С отделяют друг от друга. Желчь с примесью желудочного сока имеет низкое значение рН и поэтому непригодна для анализа. Исследуемый материал высевают в среды обогащения, содержащие кровь или желчь. Моча исследуется по различным показаниям: на 2-3 неделе заболевания брюшным тифом и паратифами, при обследовании на бактерионосительство, для установления инфекционной этиологии гнойно-воспалительных заболеваний моче-выводящей системы. Для получения уринокультуры мочу или осадок мочи высевают в среды обогащения.

Исследование розеол у больных брюшным тифом проводят в том случае, если при подозрении на это заболевание культуру возбудителя из других материалов выделить не удалось. Содержимое выраженных розеол собирают пастеровской пипеткой и засевают в желчный бульон.

В качестве материала для выделения возбудителей кишечных инфекций могут быть использованы фрагменты органов и тканей при патологоанатомическом вскрытии, молоко кормящих матерей с подозрением на заболевание брюшным тифом, объекты окружающей среды, продукты питания.

Идентификация родов и видов бактерий семейства Enterobacteriaceae

1 день (этан) Посев исследуемого материала в зависимости от его свойств в среды обогащения, плотные лактозные среды или висмут-сульфит-агар.

2 день (этан) Бактериоскопия характерных колоний с плотных сред. Пересев на среду обогащения, на плотные лактозные среды. Пересев с плотных сред на комбинированные дифференциально-диагностические среды и на МПА для выделения чистой культуры.

3 день (этан) Анализ комбинированных дифференциально-диагностических сред, определение 4-5 биохимических признаков, пересев на минимальный дифференцирующий ряд для определения 10-12 признаков выделенной культуры. Испытания в агглютинационном тесте характерных колоний бактерий с поливалентными сыворотками. Посев чистой культуры на чашку Петри для определения чувствительности к антибиотикам. Посев чистой культуры в пробирки с жидкими средами для проведения реакции фаголизабельности.

4 день (этан) Анализ результатов посевов на минимальный дифференцирующий ряд, фаголизабельность, чувствительность к антибиотикам. При подтверждении принадлежности выделенной культуры к одному из родов патогенных энтеробактерий, постановка реакции агглютинации на стекле с диагностическими групповыми и факторными О-сыворотками или иммуноглобулинами, ОК-сыворотками и Н-сыворотками для подвижных представителей семейства. Выдача ответа

5 день (этан) При необходимости в качестве дополнительных тестов идентификации возможен пересев возбудителя на развернутый дифференциальный биохимический ряд, постановка реакции колициногенности, а также в более поздние сроки, определение титров специфических антител в РПГА, РТГА и других серологических реакциях.

**Микробиологическая диагностика энтеробактерий,
относящихся к роду *Escherichia***

После выделения в 1-й день из исследуемого материала чистой культуры на одной из указанных выше сред для первичного посева, во 2-й день проводят испытание в реакции агглютинации на стекле части колонии с поливалентной ОКА сывороткой. Оставшуюся часть колонии, давшей положительную реакцию агглютинации с ОКА сывороткой не менее, чем на 3 - 4 креста, засевают в 2 пробирки со слабощелочным агаром и средой для первичной идентификации. Далее, в 3-й день, выросшие культуры с отрицательной реакцией на сероводород и мочевины испытывают в агглютинационном тесте на стекле с ОКА, ОКВ, ОКС, ОКД, ОКЕ иммуноглобулинами или сыворотками и засевают культуры, давшие положительную реакцию с одним из поливалентных препаратов, в пробирки минимального дифференцирующего ряда. Принадлежность выделенной культуры к виду *E.coli* можно чётко определить по 6-ти следующим тестам:

1. Цитрат Симмонса “-“,
2. Мочевина “-“,
3. Малонат натрия “-“,
4. Сероводород “-“,
5. Фенилаланиндезаминаза “-“,
6. Ацетат натрия “+” или “(+)”.

Для определения подвижности и типирования Н-антигена производят посев культуры глубоким уколом в пробирки с высоким столбиком полужидкого агара.

Для построения антигенно-диагностических схем эшерихий, также как и других подвижных бактерий кишечной группы, наиболее важное значение имеют О-, К- и Н-антигены, их специфичность последовательно определяют в 4-й, 5-й и 6-й дни исследования со специфическими моновалентными ОК-сыворотками и поливалентными Н-сыворотками.

Антиген О эшерихий представляет липополисахаридно-протеиновый комплекс, он термостабилен и не разрушается при кипячении в течение 2,5 ч. В настоящее время насчитывают 167 разновидностей О-АГ, однако это количество может увеличиться т.к. в природе встречаются штаммы *E.coli*, которые не идентифицируются сыворотками к известным О-АГ. Агглютинабельность штаммов эшерихий, содержащих К-АГ имеет своеобразие. Известно около 100 серовариантов эшерихий, обладающих К-АГ. К-АГ локализованы в оболочке бактерии или за ее пределами, в капсульном веществе. К-АГ термостабильны, истинно капсульные АГ разрушаются лишь при 2-часовом автоклавировании при 1 атм (121° С). Наличие К-АГ у многих сероваров эшерихий экранирует О-АГ и препятствует агглютинации О-АГ специфическими О-сыворотками. Это явление называется инагглютинабельностью. Устранение инагглютинабельности эшерихий возможно при прогревании культуры в течение 3 часов или при обработке формалином. Н-антиген эшерихий термолабилен. Он состоит из белка флагеллина. Насчитывают 53 жгутиковых антигена которые обозначают порядковыми номерами от 1 до 56. Н-АГ 10, 13 и 22 вариантов по различным причинам не учитываются при диагностике эшерихий.

Определение сероваров эшерихий по Н-АГ имеет диагностическое и эпидемиологическое значение и серологическая идентификация эшерихий заканчивается определением Н-АГ. Серовары патогенных эшерихий, наиболее часто вызывающих заболевания у человека, представлена в табл.8. Для эпидемиологического изучения заболевания эшерихиозами, выявления источника инфекции, путей передачи недостаточно определения серологической принадлежности возбудителя, а необходимо определять колициногенность (определение продуцируемых эшерихиями колицинов) и колициночувствительность (определение колициноваров).

Классификация эшерихий по антигенам

Поражения, категория Эшерихий	Серогруппы		
	О- Ag	H- Ag	K- Ag
Кишечные, энтеротоксигенные	01,06,08,011,025,027,034,048, 063,078,080,085, 0115ac, 0128ac, 0139,0148,0149,0153,0154, 0166	H4,H7,H9,H11,H12,H19, H21,H28,H40	-
Кишечные энтеропатогенные	1 класса 020, 025, 033, 055, 075, 086, 091, 0111ав,0112ав,0114, 0119,0125ac,0127,0128ав, 0142, 0146, 0159	H2,H6,H7,H11,H12, H14,H18, H20	-
	2 класса 018, 044		
Кишечные энтероинвазивные	015a,028a,028c, 029,032, 0112a,0112c,0115ав,0124,0129, 0135,0136,0143,0144,0151,0152, 0164,0167	-	-
Кишечные энтерогеморрагические	026, 0111ac, 0126, 0145, 0157, 0158	H6,H7,H8,H9,H11	-
Инфекции мочевыводящих путей	01,02,04,06,07,08, 09,011,018,022,025, 075	-	K1,K2,K5,K12, K13
Бактериемии	01,02,04,06,07,08,09, 011,018,022,025,07	-	K1,K2,K5,K12, K23
Менингиты	01,06,07,016,018,08	-	K1

Примечание: “-“ АГ отсутствует либо не обнаружен. Цит. по уч. “Микробиология,” О.В.Поздеев, 2002г. с модификациями.

Идентификация патогенных эшерихий возможна при анализе маркеров, специфичных для каждой группы этих бактерий. Например, энтероинвазивные эшерихии определяют по развитию конъюнктивита у морских свинок при введении бактерий в конъюнктивальный мешок или по способности инвазировать клетки HeLa или Нер-2, эти эшерихии не подвижны и не выделяют лизиндекарбоксылазу.

Энтеротоксигенные эшерихии выявляют по способности продуцировать токсины - термостабильный (ST) – на мышках-сосунках при внутрибрюшинном введении, термолабильный (LT) – на культуре клеток надпочечников YJ, а так же по отрицательной реакции разложения сорбозы.

Энтерогемморрагические эшерихии идентифицируют при посеве на среду сорбитол Е. Coli O157:H7 агар по отсутствию способности ферментировать сорбитол. Методы выделения и идентификации энтерогемморрагических кишечных палочек на примере E.coli0157:H7 регламентированы в Методических указаниях МУК 4.2.992 – 00, Минздрава России, Москва, 2001.

Описанный в данных указаниях дифференциально-диагностический метод основан на использовании некоторых биохимических особенностей этого микроорганизма: отсутствии фермента в-D-глюкоронидазы и способности ферментировать сорбитол, а так же на наличии у E. Coli O157:H7 такого “маркёра”, как продукция веротоксинов (VT1 и VT2). Для практического выделения данного серовара кишечной палочки из биоматериала больных неосложненными диареями, острыми кишечными инфекциями с гемоколитом, развитием гемолитико-уремического синдрома, то контактных лиц в очагах, а так же пищевых продуктов и сырья разработаны питательная среда и созданы диагностические агглютинирующие сыворотки и методика определения веротоксинов в клиническом материале. В таблице 9 представлен характер роста E.coli 0157:07 на плотных питательных

средах.

Таблица 9

Характеристика роста E.coli 0157:H7 на плотных питательных средах

Питательная среда	Характер колоний
Среда Эндо	Колонии средней величины, выпуклые, круглые, тёмно-красные, Lac+
Сорбитол E.coli 0157:H7агар	Колонии средней величины, выпуклые, круглые, влажные, бесцветные, прозрачные. Могут быть со светлым ореолом, мутноватые.
Простой питательный агар	Колонии средней величины, выпуклые, круглые, влажные, блестящие, прозрачные в проходящем свете.
Агар Плоскирева, Висмут-сульфит агар, ЖСА, среда Сабуро.	Роста нет. Иногда на среде Плоскирева мелкие выпуклые колонии красноватого цвета Lac+
Кровяной агар	Колонии средней величины, выпуклые, круглые, влажные, бледноватые, иногда сероватые. Гемолиз отсутствует.

Определение веротоксинов E.coli

Методические указания МУК, 4.2.992 – 00 предлагают для определения веротоксинов использовать “Набор реагентов для выявления веротоксина у эшерихий”, разработанный японской фирмой “Seiken” для постановки реакции обращенной пассивной латексной агглютинации (РОПЛА), метод иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора “Веротоксин” фирмы “Biopharm”, Германия и, наиболее приемлемым в условиях практического здравоохранения методом биологических проб с использованием белых мышей. Мышам вводят супернатант, полученный в результате центрифугирования разрушенных клеток кишечной палочки. Изучаемый штамм высевают на триптозный ГРМ-агар в чашку Петри, инкубируют 18 – 20 час, выросшую культуру смывают 3 мл физиологического раствора. Микробную взвесь переносят в пробирку и измельчают с помощью ультразвука при режиме: интенсивность обработки 1 Вт/ смз, при импульсном режиме работы 10 миллисекунд в течение 5 мин, погружая электрод в микробную взвесь. Затем микробную взвесь центрифугируют при 3000 об/мин 30 мин. Для проведения одной биопробы используют 4 мыши весом 16 – 18 г, двум мышам вводят внутрибрюшинно по 1 мл супернатанта, двум контрольным мышам вводят по 1 мл прокипяченного в течение 45 мин супернатанта той же культуры. При положительном результате мыши погибают через 10 - 12 часов. В этом случае определяют комплекс токсинов (VT1+VT2) или один из них, присущий изучаемому штамму. При вскрытии погибших мышей обнаруживаются патологические изменения в толстом кишечнике, характеризующиеся явлениями гемоколита (отёк слизистой, эритемы, геморрагии). Мыши контрольной группы остаются живыми. В клиническом материале принцип определения веротоксинов остаётся таким же, приготовление проб для анализа модифицируется в зависимости от характера материала.

Схемы выделения E.coli 0157:H7 представлены на рисунках 1 и 2. Таблица 9 и рисунки 1 и 2 цитированы по Методическим указаниям МУК, 4.2.992 – 00. Минздрав России, М.2001.

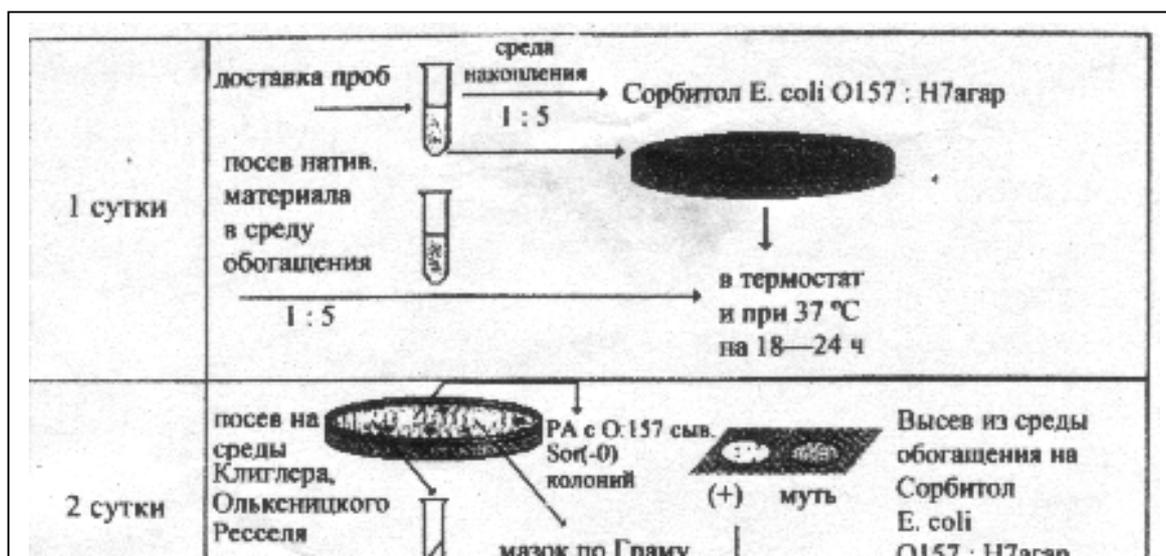


Рисунок 1: Схема выделения *E. coli* O157 : H7 из клинического материала.

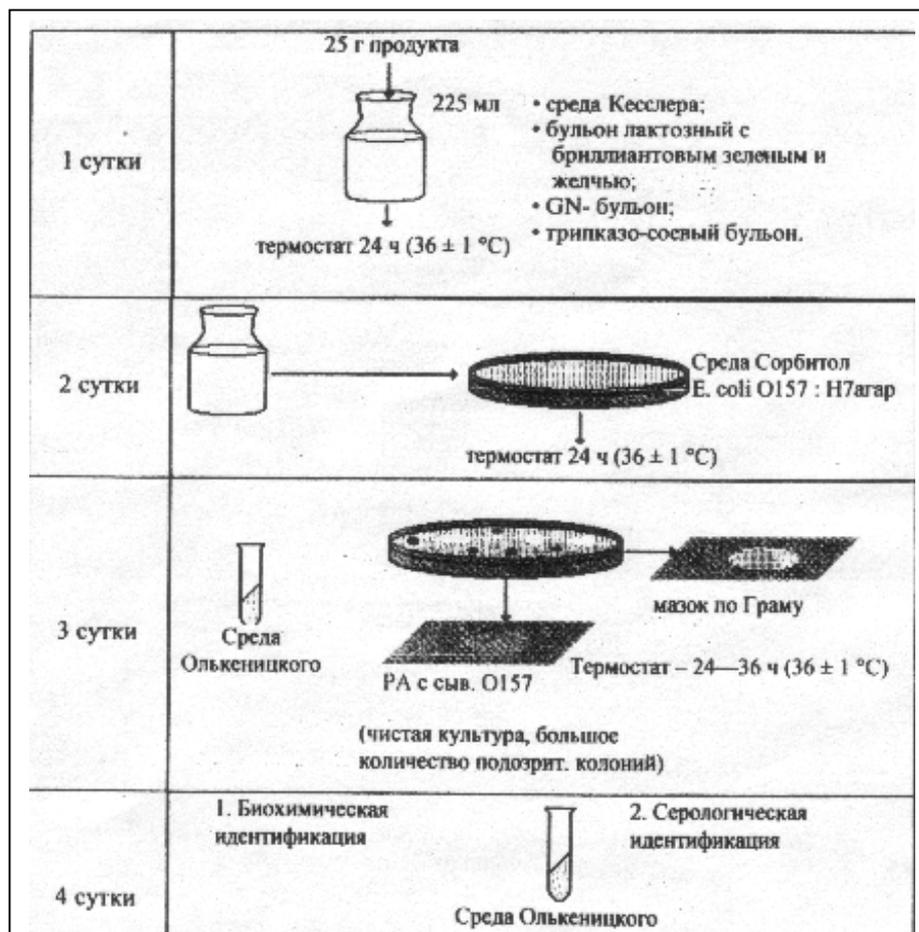


Рисунок 2: Схема выделения E. coli O157 : H7 из пищевых продуктов.

**Микробиологическая идентификация энтеробактерий,
относящихся к роду Shigella**

Бактерии из рода Shigella представлены прямыми неподвижными палочками, с закругленными концами средних размеров 0,5-0,7 мкм x 2-3 мкм. В мазках из чистых культур расположены хаотично, по Граму окрашиваются отрицательно. Шигеллы факультативные анаэробы, хемоорганотрофы, каталазо-положительны, оксидазо-отрицательны. Растут на простых питательных средах. На жидких средах S-формы дают равномерное помутнение, R-формы – осадок на дне, среда остается прозрачной. На плотных средах формируются гладкие и шероховатые колонии. S-колонии имеют куполообразную форму, гладкие, полупрозрачные. R-формы - плоские, тусклые с шероховатой поверхностью. Характерно образование переходных форм колоний. Шигеллы, по сравнению с другими энтеробактериями, наименее активны в биохимическом отношении. Многие ферментативные свойства переменны, но шигеллы безусловно не выделяют H₂S при разложении белка, не гидролизуют мочевины, не утилизируют цитрат аммония и малонат натрия, не ферментируют лактозу и сахарозу, дают положительную реакцию с метиловым красным в среде Кларка и разлагают глюкозу без газообразования. Эти признаки могут дать ориентировочные представления о видовой принадлежности шигелл. Биохимические свойства шигелл разных видов представлены в таблице 10.

Таблица 10

Биохимические свойства шигелл различных видов

Тест или субстрат	Реакция				
	S. dysenteriae	S. flexneri		S. boydii	S. sonnei
		серовар. 1-5	серовар 6		
Глюкоза (газ)	-	-	-,+	-	-
Лактоза	-	-	-	-	(+)
Маннит	-	+	+,-	+	+
Сахароза	-	-	-	-	(+)
Дульцит	-,+	-	x	x	-
Сорбит	x	x	(+),+	x	-
Арабиноза	x	x	x	+	+
Рафиноза	-	x	+. (+)	-	x
Рамноза	x	x	x	-	+, (+)
Мальтоза	x	x	-	x	+, (+)
Ксилоза	x	-	-	x	x
Трегалоза	+, (+)	+, (+)	(+), +	+, (+)	+
Целобиноза	-	-	-	-	x
Глицерин	x	-	+. (+)	x	x
Индол	-, +	-, +	-	-, +	--

Аргениндигидролаза	x	-	x	x	--
Орнитиндигидролаза	-	-	-	-	+
Мукаг	-	-	-	-	-,+
b-Галактозидаза	-,+	-	-	-,+	+

Антигенная структура шигелл представлена типовыми и групповыми термостабильными О-АГ и термолабильными К-АГ. К-АГ имеют все виды шигелл, кроме *Sh. flexneri* и *Sh. sonnei*. К-АГ шигелл экранирует О-АГ, чем объясняется О-инагглютинабельность этих бактерий. Кипячение в течение 1 час устраняет свойство инагглютинабельности. Определение антигенной структуры шигелл проводят для окончательной идентификации бактерий.

Человек - единственный природный резервуар шигелл, механизм передачи возбудителя - фекально-оральный, контактно-бытовой. Патогенез заболевания обусловлен проникновением бактерий в слизистую толстой кишки, поражением нейтрофилов и макрофагов и выработкой цитотоксина. В результате лиганд-рецепторного взаимодействия шигелл с энтероцитами слой слизистой разбухает и отторгается. Токсин нарушает синтез белка, всасывание ионов Na^+ и воды, чем объясняется диарея при шигеллезе.

Материалом для исследования являются испражнения, рвотные массы и промывные воды желудка. Выделение *S. dysenteriae* возможно из крови. Частота выделения шигелл из исследуемого материала зависит от сроков забора материала (наибольшая - в первые 3 дня от начала заболевания), правильности хранения и транспортировки пробы, быстроты посева в адекватные питательные среды. Материал следует брать в стерильную посуду в отсутствие дезинфектантов. При хранении материала в течение 24 час даже в консервирующих растворах выделяемость шигелл чрезвычайно низка. Однако известен способ сохранения испражнений в высушенном на фильтровальной бумаге виде в течение месяца.

Для бактериологической диагностики шигеллезов достаточно биохимического и серологического исследования. Проводят учет результатов на комбинированной среде и на минимальном биохимическом ряде. Для серологической ориентации реакцию агглютинации на стекле ставят с материалом с характерных колоний первичного посева или со скошенной части комбинированной среды со смесью шигеллезных сывороток. В России в 95% случаев заболевание шигеллезом вызвано *S. flexneri* 1-5 сероваров и *S. sonnei*. В связи с этим реакцию агглютинации ставят со смесью антисывороток к этим видам возбудителя. Если реакция агглютинации положительна, продолжают агглютинировать с монорецепторными типовыми сыворотками, определяя таким образом, серовар возбудителя. Если со смесью этих сывороток реакция агглютинации отрицательна, проводят агглютинацию с сыворотками *S. dysenteriae* серовара 2 и 3, которые также встречаются в России среди возбудителей шигеллезов. Затем проводят идентификацию с сыворотками к *S. boydii*. Штаммы, обладающие культуральными и биохимическими свойствами, характерными для шигелл, но не дающие агглютинацию, проверяют с сыворотками к провизорным штаммам. Культуру кипятят в течение 30-60 мин. для разрушения термолабильного капсулярного антигена, способного ингибировать взаимодействие О-АГ со специфическими антителами. Такого исследования достаточно для бактериологической диагностики шигеллезов, но недостаточно для эпидемиологического анализа. Эпидемиологический маркер может быть определен по биохимическим свойствам (определение биоваров). Он наиболее прост и надежен и основывается на определении способности шигелл определенных сероваров ферментировать некоторые сахара или образовывать индол при разложении белка. Для всех видов шигелл, кроме *S. dysenteriae*, разработаны легко воспроизводимые схемы типирования шигелл по биоварам. Так, индолообразующими являются серовары 2, 7 и 8 *S. dysenteriae*, серовары 5, 7, 9, 10, 13, 15 *S. sonnei*, серовары 1, 2, 4, 5, 7, 9, 12 *S. sonnei* ферментируют маннит.

Эпидмаркер может быть определен по колициногенности, то есть по способности шигелл продуцировать колицины, вещества с неодинаковым спектром действия на чувствительные к ним бактерии. Наибольшей колициногенностью обладают *S. sonnei*, наименьшей - *S. flexneri*. Исследования на колициногенность проводят способом перекрестных посевов. Суточную бульонную культуру исследуемого штамма высевают на плотную среду в чашки Петри в виде двух параллельных полос, располагающихся по обе стороны предполагаемого диаметра чашки. Расстояние между полосами посева 3-4 см. В качестве питательной среды используют коммерческий питательный агар "Д" или агар на гидролизате Хоттингера с pH=7,4. К агару добавляют генцианвиолет для ингибирования сапрофитной воздушной микрофлоры (по 2-4 капли 0,1% водного раствора на 100 мл среды). Чашки инкубируют до 48 часов, при этом накапливаются колицины. Культуру, выросшую в виде двух полос, инактивируют парами хлороформа, затем культуру осторожно снимают с агара узким краем стерильного предметного стекла, не нарушая целостности агаровой поверхности. После этого на агар наносят 4-часовые бульонные культуры индикаторных штаммов в виде поперечных полосок, под прямым углом к продольным полосам исследуемого штамма. Чашки с посевами инкубируют 18-20 час при температуре 37°C. Если исследуемый штамм не образует колицин, индикаторные штаммы вырастают в виде сплошных поперечных полос. Показателем колициногенности является торможение роста индикаторного штамма 44 (*E. coli* ROW), чувствительного ко всем известным колицинам, кроме типа 7. Зону торможения роста индикаторных бактерий размером более 4 мм оценивают, как положительный результат. Определение колицинов предусматривает использование 11 эталонных штаммов бактерий, наиболее стабильно продуцирующих колицины.

Определение титра специфических антител в сыворотке крови больных шигеллезом

Для определения титра специфических антител в сыворотке крови больных шигеллезом используют реакцию непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА), РПГА с шигеллезными эритроцитарными видовыми диагностикумами. Диагностическими титрами специфических антишигеллезных антител считаются титры в разведении 1:400 для взрослых, 1:200 для детей 3-14 лет и 1:100 для детей до 3 лет.

Для постановки РПГА при определении синтеза антител с дифференцировкой их по классам Ig между IgM и IgG с целью определения продолжительности инфекционного процесса используют редуцирующие вещества, содержащие сульфгидрильные группы – L-цистин и унитиол (2,3 - демеркантопропансульфатон натрия), которые снижают титры IgM.

Микробиологическая идентификация энтеробактерий, относящихся к роду *Salmonella*

Бактерии рода *Salmonella* представлены мелкими грамтрицательными палочками с закругленными концами. Размеры их 1-3 мкм x 1,5-0,8 мкм. Большинство из них – подвижные перетрихи. Спор не образуют, но достаточно устойчивы к внешним воздействиям. Как правило, растут в простых мясо-пептонных средах, в бульоне образуют диффузное помутнение (S-формы) и осадок на дне пробирки (R-формы). На МПА формируют разнообразные колонии от прозрачных, голубоватых, влажных, небольших S-колоний до шероховатых, мутных R-колоний. Переход из S -в R-форму значительно влияет на антигенную структуру сальмонелл. На висмут-сульфитагаре большинство представителей рода вырастает в виде черных блестящих колоний с прокрашенной под ними в черный цвет средой. Исключение – *S. paratyphi* A, *S. choleraesuis* .(и немногие другие виды) формируют зеленоватые плоские колонии. Возбудитель паратифа может давать сплошной слизистый рост или образовывать слизистый валик по периметру

колонии – “феномен валообразования”. Сальмонеллы – факультативные анаэробы, каталазоположительные, оксидазоотрицательны. Ферментативные свойства сальмонелл положены в основу разделения рода на виды и подвиды, но вариабельность биохимических свойств наблюдается не только внутри вида, но и в пределах серовара. Тем не менее, большинство сальмонелл образует H_2S при разложении белка, не ферментирует лактозу, сахарозу, адонит, салицин, мочевины и не образует индол. Биохимические свойства, рода сальмонелл и дифференциальные ферментативные свойства отдельных подвидов представлены в таблицах 11 и 12.

Антигенная структура сальмонелл очень сложна. Они располагают O-, H-, Vi-, M-, K-антигенами. При серологической идентификации сальмонелл учитывают 3 первых АГ. (Этот принцип положен в основу диагностической антигенной схемы Кауфмана-Уайта).

O-АГ - фосфолипидный полисахаридный комплекс. Основная специфичность O-Аг обусловлена присутствием на концах полисахаридных цепочек, они формируют антигенные факторы.

Все сальмонеллы на основе набора O-АГ разделены на 67 серогрупп. А (02), В (04), С (07), Д(09) и т.д. Антигенные варианты обозначают арабскими цифрами. Одним из компонентов O-АГ является Vi-АГ, это термостабильный антиген, инактивируется фенолом, сальмонеллы, не обладающие признаком вирулентности, могут быть носителями Vi-АГ. В реакции агглютинации Vi-АГ может экранировать O-АГ и вызывать феномен инагглютинабельности.

H-АГ сальмонелл представлен термолабильным белком, устойчивым к формалину. Он подразделяется на 2 фазы: 1 - специфическую и 2 - неспецифическую, состав H-АГ обуславливает разделение сальмонелл на серовары. 1 фаза H-АГ обозначается строчными латинскими буквами, 2 - арабскими цифрами или строчными латинскими буквами с цифрами. В природе встречаются как монофазные, так и двухфазные по H-АГ сальмонеллы.

Антигены сальмонелл подвержены мозаичным перестройкам или вариациям в результате перехода гладких форм колоний к шероховатым и обратно, жгутиковых форм бактерий к безжгутиковым, изменениям O-АГ в результате лизогении и др. Этим обусловлено постоянное появление новых серологических вариантов сальмонелл, в настоящее время насчитывается более 2500 серовариантов сальмонелл и схема Кауфмана-Уайта постоянно дополняется.

Таблица 11

Биохимические свойства бактерий рода *Salmonella*

Тесты или субстраты	Реакция	Тесты или субстраты	Реакция
Адонит	-	Сероводород	+, -
Арабиноза	+, (+)	Мочевина (гидролиз)	-
Глицерин (по Штерну)	x	Желатин (22°C)	x
Глюкоза (газ)	+, -	Фенилаланиндезаминаза	-
Дульцит	x	Лизиндекарбоксилаза	+, -
Инозит	x	Аргининдегидролаза	+, (+)
Ксилоза	x	Орнитиндекарбоксилаза	+
Лактоза	x	Глутаминовая кислота	-
Мальтоза	+	Цитрат Симонса	+, -
Маннит	+	Цитрат Кристенсена	x
Рамноза	+	Восстановление нитратов	+

Салицин	-	Ацетат	x
Сахароза	-	Малонат	x
Сорбит	+	Мукаг	x
Трегалоза	+	D-Тартрат	+,(-)
Реакция с метиловым красным	+	I-Тартрат	x
Реакция Фогеса-Проскауэра	-	L-Тартрат	x
Индол	-	β -Галактозидаза	+
		Подвижность	+, -

Таблица 12

Основные дифференциальные признаки сальмонелл и сходных энтеробактерий

Тесты или субстраты	Роды						
	Salmonella	Citrobacter	Proteus	Klebsiella	Hafnia	Serratia	Enterobacter
β -Галактозидаза	+	+	-	+	+	+	+
Индол	-	x	x	x	-	-	-
Сероводород	+, -	+, -	+, -	-	-	-	-
Гидролиз мочевины	-	+, (-)	x	(+)	-	x	X
Рост в присутствии KCN	x	+	+	+	+	-	+
Лизиндекарбоксилаза	+	-	-	x	+	+	+
Цитрат	+	+		x	+	+	+
Малонат	x	x	-	+	X	-	+, -
Мукаг	x	+		x	-	-	X
D-Тартрат	x	+		x	-		-
Реакция Фогеса-Проскауэра	-	-	-	x	X	x	+
Гидролиз желатина	x	-	x	x	-	+	-, (+)
Фенилаланин	-	-	+	-	-	-	-

Сальмонеллы являются возбудителями заболеваний 2 типов. Это брюшной тиф и паратифы, сальмонеллезы или гастроэнтериты. Кроме того, выделяют септицемическую форму сальмонеллезной инфекции. Брюшной тиф и паратиф А - типичные антропонозы. Возбудители паратифов В и С выделены и от животных. Путь передачи всех форм инфекций, вызванных сальмонеллами – фекально-оральный.

Сальмонеллы тифо-паратифозной группы, проникнув в тонкий кишечник посредством эндоцитоза, попадают в лимфатические фолликулы, мезентериальный и забрюшинный лимфатические узлы, а в конце инкубационного периода - в большой лимфатический проток и кровеносную систему.

Период бактериемии сопровождается лихорадкой с повышением температуры до 39-40С°. Происходит гематогенный занос возбудителя в печень, селезенку, костный мозг и другие органы и ткани, где формируются тканевые очаги инфекции - брюшнотифозные гранулемы. Из очагов происходит вторичный занос возбудителя в тонкий кишечник и возникают последовательно сменяющиеся стадии морфологических изменений - мозговидное набухание, некроз, образование, а затем - заживление язв. Основная патогенетическая роль принадлежит экзотоксину, освобождающемуся при массовой гибели сальмонелл, - при этом Vi-АГ ингибирует действие сывороточных и бактериальных защитных факторов. Эндотоксин угнетает деятельность ЦНС и может вызвать инфекционно-токсический шок на фоне лихорадки. Проникновение сальмонелл в желчный пузырь может вызвать длительное носительство и выделение бактерий с испражнениями. При инфицировании почек возникают пиелонефриты и сальмонеллы выделяются с мочой. После перенесенного заболевания формируется стойкий иммунитет.

Второй тип заболеваний, вызванных сальмонеллами, - гастроэнтериты или сальмонеллезы. Основным источником заражения человека считаются домашняя птица,

яйца и мясные продукты. Наиболее часто причиной заболевания являются *S.typhimurium*, *S.enterica*, *S.derby* и др. Попадая с продуктами питания в ЖКТ, сальмонеллы этой группы начинают погибать и выделять эндотоксин уже в желудке, поэтому инкубационный период короткий от нескольких часов до 2-3 суток.

При сальмонеллезе наблюдается бактерионосительство, продолжительность которого может быть до нескольких месяцев без проявления клинических симптомов заболевания. Бактериовыделители в настоящее время являются основным источником распространения возбудителей брюшного тифа и паратифов.

Материалом для исследования при диагностике заболеваний, вызванных бактериями рода *Salmonella* могут быть испражнения с первых дней заболевания до выписки больного из стационара; кровь с первых часов и на протяжении всего лихорадочного периода; рвотные массы и промывные воды желудка в первые часы и дни заболевания; желчь, моча со второй недели заболевания, спинномозговая жидкость, биоптаты костного мозга, молоко кормящих матерей, продукты питания. Исследование необходимо проводить до антибиотикотерапии и не менее чем через 48 часов после ее окончания;

Оптимальными сроками для проведения бактериологического исследования при острых формах заболевания считают первые часы и дни, при генерализованных формах – конец второй, начало третьей недели. Основным методом исследования является бактериологический с последующей идентификацией возбудителя в реакции агглютинации и определением его серологической и (или) видовой принадлежности по схеме Кауфмана-Уайта.

На первом этапе исследования материал засевают в среды первичного посева. Испражнения - на среды, содержащие лактозу – Плоскирева, Эндо, Левина или на висмут-сульфит агар. Кровь, желчь, мочу – в среды обогащения Мюллера, 10 % желчный бульон. Через сутки делают пересев характерных колоний на среды для первичной идентификации - Клиглера, Олькеницкого, Ресселя и определяют способность возбудителя ферментировать сахара, разлагать белок, выделять аммиак. Далее выделяют чистую культуру и проводят пересев на малый дифференцирующий ряд, определяя реакцию на среде Кларка, способность возбудителя разлагать аминокислоты и другие субстраты. При этом учитывают, что бактерии тифопаратифозной группы сальмонелл не разлагают лактозу, сахарозу и салицин, не выделяют индол при разложении белка.

На втором этапе исследования проводят реакцию агглютинации с поливалентной сальмонеллезной сывороткой или со смесью А, В, С, Д, Е сальмонеллезных сывороток для идентификации О-АГ выделенного возбудителя. Материал для реакции агглютинации с О-сыворотками берут петлей из верхней части скола среды в пробирке. Если культура дает положительную реакцию агглютинации с такими сыворотками, определяют только обязательный для каждой серологической группы сальмонелл О-АГ, используя для этого только 6 сывороток.

Когда удается установить с помощью перечисленных сывороток принадлежность культуры к определенной серогруппе, определяют наличие других О-АГ, характеризующих сальмонеллы данной группы. По схеме Кауфмана-Уайта можно легко определить, что сальмонелла, принадлежащая к гр. А и дающая агглютинацию с 02 сывороткой, должна (может) обладать О-АГ 1 и 12, а сальмонелла из гр. Д, агглютинирующая с сывороткой 09 должна дать агглютинацию и с АГ 01, 012. Определение полного комплекса 0-рецепторов у сальмонелл обязательно. Это дает возможность установить серологическую подгруппу, что необходимо для установления серологического типа возбудителя и позволяет в пределах серологических групп А В и Д выявить сероварианты для эпидемиологического прогноза.

Большинство циркулирующих в природе сальмонелл относится к 5 серогруппам - А, В, С, Д, Е (98%) и только 2% - к остальным, они называются сальмонеллами “редких” групп. Это группы F, G, H, I, L, Y, M, N, 7, P, O, K, 3, T, и V, VI, X, Y, X. Имеется еще 15 О-групп.

Если культура не агглютинируется в смеси сывороток А, В, С, В, Е, не четко реагирует со смесью сывороток “редких” групп, ее испытывают с каждой из сывороток, входящих в эту смесь.

После определения О-АГ начинают определять Н-АГ с 1-фазы, учитывая при этом, какие из сальмонелл наиболее распространены в данном регионе. Для проведения реакции агглютинации с Н-сыворотками материал берут петлей из конденсата или самой нижней части среды в пробирке. После определения 1-й фазы Н-АГ, определяют принадлежность Н-АГ второй фазы и таким образом устанавливают антигенную формулу сальмонеллы. Для определения антигенной формулы некоторых сероваров из групп С1 и Д необходимо проводить испытания с Vi-сывороткой, т.к. эти сальмонеллы обладают Vi-АГ, например S.paratyphi, S.typhi, S.dublin. Составив антигенную формулу по схеме Кауфмана-Уайта, легко найти видовое название сальмонеллы. Например -атигенная формула гр. А 02 а (1, 5) соответствует S.paratyphi А, гр. А 01, 4(5), 12, Z 1,5 – S.haifa и т.д.

Если выделенная культура, дающая реакцию агглютинации с О-антисальмонеллезными сыворотками, не агглютинирует с Н-сыворотками, то есть бактерии утратили подвижность, этот феномен необходимо восстановить, проведя пересев (пассаж) культуры 2-3 раза через сахарный, желчный или мясо-пептонный бульон с последующим высевом культуры в полужидкий слабощелочной агар. Через 24 часа роста у бактерий такой культуры удастся определить одну из фаз Н-АГ.

Серологическая диагностика брюшного тифа, паратифов

Для обнаружения специфических антител в крови больных заболеваниями тифо-паратифозной группы и бактерионосителей, используют классическую реакцию агглютинации Видаля на 2-3 нед заболевания и у бактерионосителей. Необходимо дифференцировать прививочную реакцию от инфекционной, для чего реакцию ставят в парных сыворотках, нарастание агглютинационного титра АГ говорит в пользу инфекционной природы реакции. Для более точного выявления специфических иммунологических сдвигов в крови больных реакцию Видаля следует ставить с 09, 012 и Н (d) моноспецифическими диагностикумами.

Для серологической диагностики брюшного тифа и паратифов применяют также РПГА с О- и Vi-брюшнотифозными эритроцитарными диагностикумам. Используется и унитоловая проба для дифференцированного определения наличия в сыворотке IgM и IgG, что позволяет отдифференцировать первично возникший инфекционный процесс от бактерионосительства.

Для эпидемиологического маркирования сальмонелл используют определение серо-, фаго-, био- и биохимических вариантов этих бактерий. Их определение дает возможность эпидемиологу выявлять источник инфекции и устанавливать эпидемиологические связи.

Поэтому после определения серотипа определение подтипов (или серовариантов) имеет положительное значение. Для установления биохимических вариантов исследуют отношение культур к рамнозе, ксилозе, дульциту, арабинозе, инозиту, d-, l-, i-тартратам (солям органических кислот), образованию H₂S, отсутствие газообразования при ферментации сахаров.

Фаготип сальмонелл определяют с помощью типовых фагов. Имеются фаги к паратифам А и В, тифимуриум, дублин, потсдам, галлинарум-пуллорум и некоторым “редким” видам – аделаида, вайкросс и др. У S.typhi до 90 фагов.

Микробиологическая идентификация энтеробактерий, относящихся к роду Yersinia

Род Yersinia включает 11 видов, наиболее значимые из них в этиологическом отношении – три: Y.pestis (вызывает чуму, рассматриваться на будет), Y.pseudotuberculosis и Y.enterocolitica. Типовой представитель рода – Y.pestis.

У человека *Y.pseudotuberculosis* вызывает псевдотуберкулез – острую инфекционную болезнь, относящуюся к алиментарным зоонозам с природной очаговостью, характеризующуюся лихорадкой, поражением мезентериальных лимфатических узлов, подвздошной кишки, печени, суставов и часто протекающую с экзантемой. Основное заболевание, вызываемое *Y.enterocolitica* – иерсиниоз – инфекция, сопровождающаяся диареей, энтеритом, псевдоаппендицитом, илеитом, узловатой эритемой и (иногда) септициемией и острым артритом.

Иерсинии – это палочки с закругленными концами от 0,8 до 1,2 мкм в длину и 0,5-0,8 мкм в ширину. Спор не образуют грамтрицательны. *Y.pseudotuberculosis* – биполярный овоид, при окраске метиленовым синим дает биполярное окрашивание, при окраске по Романовскому-Гимзе определяется капсула. Микробы в старых культурах окрашиваются неравномерно, бактерии, взятые с влажного агара, чаще всего окрашиваются биполярно. В бульонных культурах преобладают равномерно окрашенные особи. *Y.pseudotuberculosis* в мазках из свежих бульонных культур могут располагаться короткими (по 2-5 клеток) цепочками. У *Y.pseudotuberculosis* – 3-5 перитрихально расположенных жгутиков, *Y.enterocolitica* их много, отдельные штаммы имеют фимбрии.

Таблица 13

Характер колоний иерсиний на различных плотных питательных средах

Микроорганизм	Среда Эндо (22 ⁰ С)		Среда Серова через 44 ч (28-37 ⁰ С)
	1-е сут	2-е сут	
<i>Y.pseudotuberculosis</i>	Мелкие колонии-росинки, круглые, выпуклые, блестящие, неокрашенные	Колонии диаметром 0,1-0,2 мм, круглые, блестящие с ровными краями, бесцветные	1. Колонии диаметром до 2 мм, восьмигранники со сходящимися к центру гранями, края ровные, структура исчерченная, форма колоний может быть и круглой с выпуклым сосцевидным центром. Периферическая зона прозрачная, нежная; 2. Колонии диаметром до 5 мм. Форма чаще неправильная (амебевидная) с более плотной поверхностью и чуть выпуклым темно-красным центром. Края фестончатые. Колонии обоих типов имеют суховатую матовую с перламутровым блеском поверхность. Во время снятия петлей перемещаются по поверхности среды, центр легко крошится.
<i>Y.enterocolitica</i>	То же	Колонии подобны, но имеют розоватый оттенок	1. Через 18-20 ч после посева имеют почти правильную форму, выпуклые, с более темным центром, блестящие, влажные, легко снимаются петлей. Диаметр 0,5-1 мм. 2. На второй день инкубации – колонии выпуклой неправильной формы с сосочками в центре, форма неправильного многоугольника. Диаметр – от 0,5 до 2,5 мм. Центр колоний темно-красный, края светлые, опалесцирующие.

Иерсинии – факультативные анаэробы, могут расти при температуре от 2 до 40⁰С, оптимум 22-28⁰С (при этой температуре наиболее хорошо выражена подвижность бактерий). Иерсинии хорошо растут на дезоксихолатном агаре, агаре с цефсулодином, иргазаном и новобиоцином, средах Эндо, МакКонки, среде Серова с бромтимоловым синим. В состав среды Серова входят индикатор Конго красный, глюкоза, мочевины, молибденовокислый аммоний, генциановый фиолетовый, сухая желчь, гидрокарбонат натрия и питательный агар. Среди этих ингредиентов автор выделяет три группы: индикаторную (Конго красный, глюкоза и мочевины), ингибиторную (генциановый фиолетовый и желчь) и группу питательных веществ и стимуляторов роста (питательный агар, глюкоза и молибденовокислый аммоний). Вещества индикаторной группы придают колониям псевдотуберкулезного микроба очень характерный вид, ингибиторные – тормозят рост сопутствующей микрофлоры, питательные вещества и стимуляторы роста способствуют более быстрому формированию колоний иерсиний.

Медленный рост бактерий (до 3 сут) можно ускорить добавлением гемолизированной крови или сульфата натрия. На плотных средах колонии *Y.enterocolitica* мелкие,

блестящие, часто выпуклые с голубоватым оттенком в проходящем свете. При культивировании (48 ч при 37⁰С) на среде Эндо колонии имеют розоватый оттенок. Бактерии проявляют пектиназную активность: на пектиновом агаре колонии окружены зоной разжижения. При культивировании на жидких средах микроорганизм вызывает их помутнение.

Колонии *Y.pseudotuberculosis* отличаются серовато-желтоватым оттенком в проходящем свете и меньшей прозрачностью. При культивировании (48 ч при 37⁰С) на среде Эндо колонии *Y.pseudotuberculosis* остаются бесцветными. *Y.pseudotuberculosis* при пониженной температуре способны к диссоциации от S (гладкой) к R (шероховатой) форме. Образование R-форм сопровождается изменением или потерей О-АГ. Они могут давать спонтанную агглютинацию или агглютинацию с несколькими сыворотками к разным сероварам иерсиний. S-колонии *Y.pseudotuberculosis* круглые, диаметром 1 мм, слегка выпуклые голубовато-белые полупрозрачные с ровным краем. Консистенция их слизистая, центр колонии несколько приподнят и более интенсивно окрашен, периферия радиально исчерчена. Под малым увеличением микроскопа колонии имеют вид пирамидки со сходящимися к центру 8-10 гранями. R-формы – выпуклые, бугристые с фестончатой зоной (или без нее), диаметром 5-7 мм, центр более выпуклый и сильно пигментирован, напоминают колонии *Y.pestis*. На бульоне диссоциированные культуры *Y.pseudotuberculosis* растут в виде хлопьевидного осадка, оставляя среду прозрачной, а гладкие – вызывают ее помутнение.

Среды Плоскирева и висмут-сульфит агар ингибируют рост иерсиний, особенно при 37 °С. При 22-28⁰С *Y.pseudotuberculosis* на этих средах формируют слабый рост в виде отдельных колоний в начале штриха. На плотной среде с бромтимоловым синим вырастают голубоватые колонии со светло голубым ободком по краю, при взятии петлей они сдвигаются.

Как *Y.pseudotuberculosis*, так и *Y.enterocolitica* ферментируют глюкозу, мальтозу, маннит, мочевины, ксилозу, трегалозу, не растут на среде Симмонса, не выделяют ацетилметилкарбинол при 37 °С (проба Фогеса-Проскауэра отрицательна), не разлагают фенилаланин. А вот по другим признакам есть различия. По ферментации ксилозы, салицина и трегалозы, а также образования индола, различают 5 биоваров *Y.enterocolitica*.

Таблица 14

Отличия *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* по биохимическим свойствам

Биохимические свойства	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
Образование индола	–	+
Фогеса-Проскауэра (22-24 ⁰ С)	–	+
Лактоза	–	d
Сахароза	–	+
Рамноза	±	–
Сорбит	–	+
Салицин	[–]	d

Примечание. «–» – 0-10% штаммов положительные; [–] – 11-25% штаммов положительные; d – 26-75% штаммов положительные; «+» – 90-100% штаммов положительные; пропуск означает, что нет данных. Данные получены для срока инкубации 48 ч. Тесты проводились при 36±1 °С.

Таблица 15

Дифференциация биотипов *Yersinia enterocolitica*

Тест	Биотип				
	1	2	3	4	5
Образование индола	+	+	–	–	–
Образование кислоты из сахарозы	+	+	+	+	d
трегалозы	+	+	+	+	–
D-ксилозы	+	+	+	–	–

Дезоксирибонуклеазы	–	–	–	+	+
Липаза (Твин-80)	+	–	–	–	–
Восстановление нитрата	+	+	+	+	–

Y.pseudotuberculosis обладает H-жгутиковым АГ, он термоллабилен и не имеет диагностического значения. Все виды иерсиний имеют соматический О-АГ (эндотоксин), похожий на АГ многих грамотрицательных бактерий и токсичный для животных и человека. Липополисахариδο-белковые комплексы О-АГ разделяют на основе химических и антигенных характеристик на «гладкие» (S) и «шероховатые» (R), последние – общие для *Y.pseudotuberculosis* и *Y.pestis*. По S-АГ выделяют 8 сероваров (I-VIII). 60-90% возбудителей псевдотуберкулеза, выделенные от животных и людей, относятся к I-му серовару, от 8 до 32% – к III-му серовару, единичные ко II-му, IV-му и V-му сероварам. О циркуляции *Y.pseudotuberculosis* VI-VIII сероваров в нашей стране сведений нет. Значительные антигенные взаимодействия обнаружены в РА между возбудителями псевдотуберкулеза I серовара и *Y.enterocolitica* сероваров O8, O18 и O21.

Y.enterocolitica также имеет H- и O-АГ. H-АГ термоллабилен и разрушается при кипячении. В отличие от H-АГ *Y.pseudotuberculosis* активны в РА при температуре 26-28⁰С и поэтому имеет диагностическое значение. O-АГ – термостабилен и устойчив к этиловому спирту. Выделяют 51 O-АГ *Y.enterocolitica*. Большинство встречающихся в природе *Y.enterocolitica* принадлежат к сероварам O3, O5, O27, O7, O8 и O9. Среди *Y.enterocolitica* безусловно патогенными являются серовары O3, O5, O27 биовара 4 и 3b и O9 биовара 2, которые широко распространены в России.

Лабораторная диагностика иерсиниозов основана на проведении бактериологического и серологического этапов.

Порядок проведения бактериологического исследования

Исследуемый материал для выделения возбудителей псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза очень разнообразен. От больных это фекалии и моча в первые 6 дней болезни и в период обострения, смыв из зева и кровь в первые три дня болезни, рвотные массы, мокрота, моча, желчь – по показаниям, операционный и секционный материал, который необходимо измельчать перед посевом. Материал для получения копрокультуры берется до назначения антибактериальных средств. Кроме того, используют материалы из внешней среды – смывы с поверхности овощей, оборудования и тары, молоко, мясные и рыбные продукты, салаты и т.д.

Особенностью обогащения исследуемого материала является выдерживание сред с первичным посевом при низких температурах. Затем делаются высевы на дифференциально-диагностические среды для выделения и идентификации культур и определения биоваров и сероваров.

Для первичного выделения культур используются следующие среды: фосфатно-буферный раствор (рН=7,6-7,8); буферно-казеиново-дрожжевая среда с тем же рН и забуференная пептонная вода. Из плотных питательных сред чаще используются дифференциально-диагностическая среда с бромтимоловым синим и среда Эндо.

Подготовленный соответствующим образом материал вносят в пробирки с 5 мл жидкой среды и выдерживают в холодильнике до возникновения роста, но не более 10 дней. Посев на плотные среды делают петлей из верхней трети слоя среды, со среды буферно-казеиново-дрожжевой и забуференной пептонной воды на 2, 3, 5 и 7 сут, а с ФБР на 5, 10, 15 сут. Исследуемый материал перед посевом на среду Эндо подвергают щелочной обработке для ингибиции посторонней флоры, так как иерсинии относительно резистентны к щелочи. На среде с бромтимоловым синим (СБТС) вырастают *Y.pseudotuberculosis* – мелкие (1-2 мм) голубые (через 24 ч слегка желтоватые) колонии с приподнятым центром и матовой поверхностью. *Y.enterocolitica* – 2-4 мм, выпуклые, сухие с матовым налетом голубого цвета. Другие энтеробактерии, не разлагающие мочевины, изменяют окраску среды, приобретая желтый цвет, они выпуклые, сочные, легко

дифференцируются от иерсиний. На среде Эндо посторонняя флора не вырастает, а иерсинии – лактозонегативные, выпуклые, гладкие приобретают розовый оттенок.

На следующем этапе характерные для *Y.pseudotuberculosis* и *Y.enterocolitica* колонии высевают на среду Олькельницкого и среды с маннитом и мочевиной для первичной идентификации. На основании отсутствия ферментации маннита и отрицательной реакции на мочевины исключают ряд условно-патогенных микроорганизмов, в том числе *Proteus vulgaris*, *P.mirabilis*, *P.morganii*, *Alcaligenes fecalis*. Для дальнейшей идентификации берут культуры, обладающие на среде Олькельницкого уреазной активностью и ферментирующие маннит до кислоты.

Видовую принадлежность иерсиний определяют по комплексу типичных морфологических, культуральных, биохимических, антигенных свойств. Для идентификации *Y.pseudotuberculosis* и дифференциации их от других энтеробактерий, используют реакцию с поливалентным псевдотуберкулезным бактериофагом. Пробу ставят на плотной питательной среде при 20-22 °С, нанося цельный или разведенный фаг каплями или дорожкой на сплошной посев иерсиний «газоном».

Серологической идентификации подлежат культуры, отнесенные по биохимическим свойствам к видам *Y.pseudotuberculosis* и *Y.enterocolitica*. Ее проводят с помощью РА на стекле с поливалентными диагностическими сыворотками (I-IV серовары) к возбудителю псевдотуберкулеза и моновалентными к I и III сероварам, а также с сыворотками наиболее распространенных сероваров к *Y.enterocolitica* (O3, O5, O27, O9, O28, O8, O5, O6, O30, O4, O32, O13, O7).

Для определения маркеров вирулентности иерсиний используют:

1. определение способности бактерий к аутоагглютинации, этот феномен проявляется при культивировании иерсиний в жидкой среде и состоит в спонтанном склеивании клеток иерсиний;
2. определение кальцийзависимого роста, это свойство проявляется в бактериостазе (ограничении роста) при дефиците ионов Ca^{+} в кальцийдефицитном агаре при температуре 22-28°C;
3. определение температурзависимой морфологии колоний, этот тест заключается в способности иерсиний при определенных условиях образовывать на обычном питательном агаре вирулентные колонии.
4. выявление патогенных иерсиний в реакции агглютинации на стекле, с этой целью используют диагностическую адсорбированную кроличью сыворотку для реакции агглютинации к вирулентным иерсиниям.

Иммунологические методы выявления антигенов иерсиний

Иммунологические методы обладают высокой чувствительностью и строгой специфичностью. К ним относятся: РКА – реакция коаггутинации; ИФА; НРИФ; РЛА – реакция латексагглютинации, РНАТ – реакция нейтрализации антител. С помощью этих реакций возможно выявление антигенов возбудителя в моче, слюне, крови, копрофильтратах, полученных из испражнений больных людей, а также в органах мелких животных и смывах с объектов внешней среды в очагах псевдотуберкулеза.

С помощью ИФА возможно выделение антигенов *Y.pseudotuberculosis* в материале от больных в первые 10 дней от начала заболевания. Чувствительность метода высока: 10^5 микробных клеток в 1 мл крови. Для обнаружения антигенов возбудителей в фильтраатах копрокультур и смывах с предметов внешней среды возможно использовать РЛА. С помощью этого метода подтверждение диагноза происходит в 73% случаев.

Для обнаружения *Y.pseudotuberculosis* I-V сероваров и *Y.enterocolitica* распространенных в природе сероваров (O3, O4,32, O4,33, O5,27 O8, O9, O13) может быть использована НРИФ. Чувствительность метода 10^5 микробных клеток в 1 г пробы. Применять его рекомендовано в первые 3-5 дней болезни.

В настоящее время внедрены в практику такие современные методы как иммуноблотинг и ПЦР.

Серологический метод диагностики иерсиниозов

Для выявления АТ в сыворотках больных псевдотуберкулезом рекомендованы реакции РНГА и РА. АТ появляются в крови в конце первой – начале второй недель заболевания и достигают титров 1:100 – 1:400, на 3-й неделе титры антител достигают 1:800-1:3200 и более. Диагностическим титром РА считается разведение 1:200 и более. Обязательным условием подтверждения специфического антителобразования является изучение динамики накопления антител в парных сыворотках: первая сыворотка крови забирается в начале болезни, вторая – на третьей неделе. Для постановки РА в качестве АГ возможно использование живых культур в S-форме или формализированные препараты *Y.pseudotuberculosis* I-V сероваров и *Y.enterocolitica* O3, O5, O8, O9 и других наиболее распространенных сероваров.

Для приготовления АГ двухсуточную культуру иерсиний, выращенных на агаре (предварительный пересев с бульона Хоттингера) смывают 0,85% NaCl и готовят стандартную взвесь 1 млн/мл. Живую культуру используют в день смыва, формализованную – месяц. Диагностический титр не ниже 1:160. В случае выделения аутокопрокультуры ее можно вводить в РА как дополнительный антиген.

Другие бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, вызывающие кишечные инфекции

Чаще других из материала от больных кишечными инфекциями выделяются бактерии родов *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* и *Morganella*. Характеристика бактерий родов *Klebsiella* и *Proteus* будут рассмотрены в разделе условно-патогенных микроорганизмов.

Enterobacter. Прямые палочки, 0,6–1,0×1,2–3,0 мкм, грамтрицательные, подвижные за счет перитрихальных жгутиков (за исключением *E. asburiae*). В мазках располагаются одиночно, реже короткими цепочками; некоторые штаммы снабжены капсулой. Согласно IX изданию определителя бактерий Берджи (1994), род насчитывает 13 видов, некоторые из них, в основном *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. sakazakii*, *E. agglomerans* и *E. gergoviae* вызывают поражения у человека. Наиболее часто их выделяют при острых желудочно-кишечных заболеваниях, инфекциях желчевыводящих и мочевыводящих путей, гнойных поражениях кожи, инфекционном воспалении мозговых оболочек, септицемиях и внутририбольничных инфекциях. Типовой вид: *Enterobacter cloacae*.

Энтеробактерии – это факультативные анаэробы; хемоорганотрофы, обладающие и дыхательным и бродильным типами метаболизма. Оптимальный диапазон температуры 30–37°C, оптимум pH – 7,2. Энтеробактерии хорошо растут на простых питательных и селективно-дифференциальных средах. На твердых средах образуют слизистые и неслизистые колонии, напоминающие колонии клебсиелл и эшерихий. Ферментирующие лактозу штаммы образуют розовые или малиновые колонии на средах Эндо, Плоскирева или Мак-Конки. Неферментирующие лактозу штаммы образуют желтоватые или бежевые колонии. *E. agglomerans* и *E. sakazakii* образуют на кровяном агаре желтые колонии. Пигментообразование более выражено при температуре 25°C. Вызывают помутнение жидких сред.

Все или большинство штаммов сбраживают следующие углеводы: глюкозу, маннит, лактозу, сахарозу, ксилозу, мальтозу, сорбит, арабинозу, рафинозу, салицин, трегалозу и целлобиозу, вариабельно – инозит, дульцит, адонит. У большинства штаммов реакция Фогеса – Проскауэра и результат теста на среде Симмонса с цитратом положительные. Проба с метиловым красным варьирует. Энтеробактерии лизинотрицательные (за исключением *E. gergoviae*) и орнитинположительные (за исключением *E. agglomerans*). Большинство штаммов обычно использует малонат и медленно разжижает желатину (3–14 сут). Индол, H₂S, дезоксирибонуклеазу, фенилаланин дезаминазу и липазу не образуют.

У энтеробактеров выделяют O- и H-Аг; у капсулированных штаммов – также K-Аг. Типирование проводят по O-Аг.

Лабораторная диагностика включает выделение и идентификацию возбудителя. Большинство видов можно идентифицировать по дезоксикарбоксилированию аминокислот и расщеплению углеводов.

Morganella. Прямые палочки, 0,6–0,7x1,0–1,7 мкм, грамотрицательные, подвижные за счет перитрихальных жгутиков. Феномен роения отсутствует. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы, обладающие и дыхательным и бродильным типами метаболизма. Оптимальная температура 37°C. Служат возбудителями вторичных оппортунистических инфекций, выделяемыми при бактериемии, инфекциях дыхательных путей, ран и мочевых путей. Типовой (и единственный) вид: *Morganella morganii* с подвидами *morganii* и *sibonii*.

Лабораторная диагностика состоит в выделении и идентификации возбудителя. Бактерии хорошо растут на любых селективных и дифференциально-диагностических средах, применяемых для выделения грамотрицательных аэробных палочек. Поскольку подавляющее большинство изолятов не ферментирует сахарозу и лактозу, то они образуют бесцветные колонии на средах МакКонки, Плоскирева, SS-агаре, ксилозе, лизиндезоксихолатном агаре и агаре с эозином и метиленовым синим. На неселективных средах (например, кровяном агаре) через 24 ч образуют негемолизирующие серовато-бежевые выпуклые колонии 2-3 мм в диаметре. Характерен полиморфизм колоний (S-R, диссоциаты) – причина ошибок, особенно при выделении из материала, контаминированного другими бактериями.

Из обычно тестируемых углеводов катаболизируют с образованием кислоты и обычно газа (иногда с задержкой) только D-глюкозу и D-маннозу. Оксидазоотрицательные, каталазоположительные, индолположительные. Проба с метиловым красным положительная; реакция Фогеса–Проскауэра отрицательная. На агаре Симмонса с цитратом не растут, по лизиндекарбоксилазе и аргининдигидролазе отрицательные, по орнитиндекарбоксилазе положительные. Осуществляют окислительное дезаминирование фенилаланина и триптофана, гидролизуют мочевины. Способны к росту в присутствии KCN, H₂S не образуют. Разлагают тирозин, вызывая просветление среды, содержащей эту нерастворимую аминокислоту. Восстанавливают нитрат.

Дифференциальный признак, отличающий морганеллы от протеев, – отсутствие покраснения скола лизино-железного агара, что обусловлено отсутствием способности дезаминировать лизин и образовывать кето-кислоты. Важный признак – способность морганелл (подобно протеев) дезаминировать фенилаланин. Разложение последнего до фенилпировиноградной кислоты в присутствии FeCl₂ приводит к окрашиванию среды в зелёный цвет. Второй дифференциальный признак – способность вызывать просветление и побурение среды Хауки с тирозином и триптофаном. При росте на средах, содержащих ароматические аминокислоты (например, фенилаланин), культуры могут иметь миндальный запах.

Холера

Холера - острое инфекционное заболевание, из группы карантинных инфекций, с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, водным, пищевым и контактно-

бытовым путями распространения инфекции. Болезнь характеризуется поражением желудочно-кишечного тракта, нарушением водно-солевого обмена и обезвоживанием организма вследствие потери жидкости и солей с испражнениями и рвотными массами.

Возбудитель холеры *Vibrio cholerae* относится к семейству *Vibrionaceae*, виду *V. cholerae*, который включает как патогенные, способные вызывать заболевания, склонные к эпидемическому и пандемическому распространению, так и свободноживущие в воде вибрионы, безопасные для человека или обуславливающие спорадические случаи диарей. Известно около 200 0-серологических групп холерных вибрионов, из которых лишь холерные вибрионы 01 серогруппы до последнего десятилетия являлись возбудителями холеры.

В 1992-1993 гг. в Бангладеш, Индии, Китае, Малайзии и других странах началась крупная эпидемия холеры, возбудителем которой оказался новый, ранее неизвестный серовариант вида *Vibrio cholerae*. Он отличается от *V. cholerae* 01 по своим антигенным признакам, а именно: имеет антиген 0139 и не агглютинируется никакими другими 0-сыворотками. Все остальные его морфологические и биологические свойства, включая способность вызывать холеру, т. е. синтезировать экзотоксин-холероген, оказались сходными со свойствами *V. cholerae* 01. Видимо, вследствие мутации, изменившей 0-антиген, возник новый возбудитель холеры — *V. cholerae* 0139. С 1993 г. по решению ВОЗ заболевания, вызываемые холерными вибрионами 0139 серогруппы, регистрируют как холеру.

Таким образом, к настоящему времени известны три варианта возбудителя холеры: холерные вибрионы 01 серологической группы - классические (*V. cholerae* biovar cholerae) и эльтор (*V. cholerae* biovar eltor) и холерные вибрионы новой 0139 серогруппы.

Холерные вибрионы 01 серологической группы имеют сероварианты - Огава, Инаба, Гикошима.

Морфологические и тинкториальные свойства

Холерные вибрионы представляют собой небольшие слегка изогнутые или прямые палочки длиной 1,5-3 мкм, шириной 0,2-0,6 мкм. Спор и капсул не образуют, имеют один полярно расположенный жгутик, по длине в 2-3 раза превышающий размер вибриона, обуславливающий его активную подвижность. Хорошо красятся анилиновыми красителями, грамотрицательны. При воздействии медикаментозных препаратов холерные вибрионы могут иметь s-образные, нитевидные, кокковидные, гигантские формы, которые при отмене препарата или пересеве вибрионов на свежие среды возвращаются к своей исходной форме (реверсируют).

Биологические свойства

Холерные вибрионы – факультативные анаэробы, хорошо растут на обычных питательных средах слабощелочной и щелочной реакции (7,6-8,0 до 9,2), особенно при наличии в них хлорида натрия в концентрации 0,5-2%. Температурный диапазон 10-40°C при оптимуме 35-38°.

На 1% пептонной воде микроб быстро размножается и на ее поверхности через 6 час появляется нежная пленка, содержащая вибрионы. На щелочном агаре через 14-16 час вибрион образует гладкие прозрачные с голубоватым оттенком колонии размером 1-1,5 мм. Поверхность колонии влажная, блестящая край ровный.

Холерные вибрионы разлагают до кислоты без газа глюкозу, маннит, мальтозу, маннозу, сахарозу, левулезу, рафинозу, рамнозу, инозит, салицин, сорбит. По отношению к трем углеводам (сахароза, арабиноза, манноза) Heiberg отнес холерные вибрионы к I группе (X-I группа). Холерные вибрионы образуют оксидазу, декарбоксилируют лизин и орнитин, не продуцируют аргининдегидрогеназу. Глюкозу расщепляют как в анаэробных, так и в аэробных условиях с образованием кислоты без газа (тест Хью-Лейфсона), что характерно для всего рода *Vibrio*. Расщепляют крахмал и декстрин, разжижают желатин,

казеин. Продуцируют индол из триптофана, восстанавливают нитраты в нитриты. Сероводород не образуют.

Холерные вибрионы продуцируют экзотоксин (холероген), а при лизисе освобождают эндотоксин.

Образуют также фибринолизин, гиалуронидазу, коллагеназу, муциназу, лецитиназу, протеиназы, нейраминидазу, липазу.

Холерные вибрионы имеют термолabile H-антиген, неспецифический, общий для всего рода *Vibrio*. По O-антигену (соматическому, термостабильному) вибрионы подразделяют на O-группы (190 по международной и 84 по классификации Ростовского Н/Д НИПЧИ). *V.cholerae* биоваров *cholerae* и *eltor* принадлежат к 0-1 группе, а 0-139(84 – по отечественной классификации) представляет самостоятельную группу. Внутри 0-1 подгруппы различают три серовара по комбинациям соматических антигенов А,В,С: Инаба (АС), Огава (АВ), Гикошима (АВС). Вследствие изменчивости холерных вибрионов встречаются штаммы, имеющие типичные морфологические, культуральные и биохимические свойства, но не агглютинирующиеся холерными сыворотками (0-1, 0-139 (84)). Такие, потерявшие агглютинабельность штаммы холерных вибрионов, относят к НАГ – вибрионам.

Эпидемиология и патогенез холеры

Основным источником инфекции является человек - больной и вибрионоситель. Механизм передачи возбудителя заключается в проникновении холерных вибрионов в желудочно-кишечный тракт с зараженной водой или пищевыми продуктами. Не исключена возможность заражения посредством контакта с больными, когда возбудитель может быть занесен в рот руками, загрязненными выделениями больного холерой, а так же передача возбудителя мухами.

Заражающая доза холерных вибрионов огромна - от 10 до 100 млрд. микробных тел. Большое значение имеет рН желудочного сока. Его снижение при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, при его неравномерной секреции, быстрой эвакуации из желудка (при действии алкоголя) ведет к уменьшению заражающей дозы до 1 млн. клеток.

Проникнув в дистальные отделы тонкого кишечника, вибрионы адгезируются к слизистой оболочке, размножаются, продуцируют токсин. В энтероциты *V.cholerae* не проникают. Холероген, выделяемый бактериями, является причиной развития острой диареи, приводящей к дегидратации и нарушению баланса электролитов. В механизме возникновения диареи ведущая роль отводится гиперсекреции эндотелиальных клеток тонкого кишечника. Холероген вызывает активацию фермента аденилатциклазы энтероцитов, обуславливающую накопление ц-АМФ, что приводит к гиперсекреции электролитов, воды в просвет кишечника. При этом всасывание ионов страдает в меньшей степени, хотя оно не в состоянии компенсировать чрезмерный объем секреции. Всасывание ионов натрия восстанавливается наиболее быстро, особенно в условиях приема глюкозы. Это лежит в основе эффективной оральной терапии глюко-электролитными растворами при холере легкой степени тяжести.

Всасывание ионов калия и бикарбоната нарушается в значительно большей степени и восстанавливается медленно, что способствует развитию гипокалиемии и метаболического ацидоза.

Реабсорбция воды в толстом кишечнике резко снижена, что обуславливает появление характерной водянистой диареи и впоследствии рвоты, объем выделяемой жидкости, при которой может достигать 30 литров в сутки и более.

Для холеры характерны потери жидкости и электролитов с испражнениями и рвотными массами, которые в короткие сроки достигают объемов, практически не встречающиеся при других патологических состояниях. Дегидратация и дисбаланс электролитов, ацидоз и гипокалиемия являются ведущим звеном в патогенезе холеры.

Другие механизмы (интоксикация, аллергические реакции) имеют второстепенное значение.

Микробиологическая диагностика

Основным методом микробиологической диагностики холеры является бактериологический. Для ретроспективной диагностики атипичных форм заболевания используют серологический метод.

Бактериологический метод

От правильности и своевременности проведения бактериологического метода зависит характер и объем профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Исследования проводят с целью:

- выявления больных холерой и вибрионосителей;
- установления окончательного диагноза при вскрытии трупов лиц, умерших от подозрительного на холеру заболевания;
- обоснования выбора средств этиотропной терапии холеры;
- бактериологического контроля эффективности лечения больных холерой и вибрионосителей;
- бактериологического контроля объектов окружающей среды, в т. ч. поверхностных водоемов;
- бактериологического контроля эффективности обеззараживания в очаге инфекции.

Отбор и доставка материала на исследование

Материалом для бактериологического анализа могут служить: испражнения, рвотные массы, желчь, трупный материал (отрезки тонкого кишечника и желчный пузырь); предметы, загрязненные испражнениями (постельное и нательное белье и др.); вода, ил, гидробионты, сточные воды, содержимое выгребных туалетов; смывы с объектов окружающей среды, пищевые продукты, мухи и др.

Материал от больного забирает медицинский персонал лечебного учреждения немедленно после выявления больного и до начала лечения антибиотиками.

Необходимо учитывать высокую чувствительность холерных вибрионов к дезинфицирующим средствам и кислотам, возможность антагонистического действия сопутствующей микрофлоры и предполагаемую концентрацию возбудителя в исследуемом материале. Если в материале от больных алгидной формой холеры концентрация возбудителя достигает 10^6 — 10^9 м. к./мл, то в испражнениях больных легкой формой и леченных антибиотиками, реконвалесцентов и носителей количество холерных вибрионов обычно не превышает 10^2 — 10^4 м. к./г.

Для отбора проб используют чистую стерильную посуду, не содержащую следов дезинфицирующих растворов. Стерилизацию посуды и других средств забора материала проводят автоклавированием, сухим жаром или кипячением в 2 %-ном растворе пищевой соды.

Материал для исследования должен быть доставлен не позже чем через 2 час после его взятия. В случае удлинения сроков доставки используют транспортные среды. Наиболее удобной и достаточно эффективной является 1 %-ная пептонная вода (рН 8,4 ± 0,1).

В пептонную воду в качестве ингибитора сопутствующей флоры может быть добавлен теллурид калия из расчета 1 : 100000— 1 : 200000 или моющее средство «Прогресс» в концентрации 0,1— 0,2 %. В отдельных случаях для транспортирования материала могут быть использованы солевые консерванты (см. среды для бактериологических исследованиях на холеру)

На флаконах (пробирках) с пептонной водой, передаваемых в стационары для отбора проб, должна быть этикетка или надпись с указанием названия среды и даты ее приготовления.

Среды во флаконах или пробирках, закрытых ватно-марлевыми пробками, рекомендуется хранить не более 2 сут при температуре не выше $(10,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$ при условии сохранения их стерильности. Целесообразно обеспечение стационаров и групп забора проб средами в закатанных флаконах.

При наличии у больного диареи материал забирают до начала этиотропной терапии в количестве 10—20 мл, у больных легкими формами - 1—2 г испражнений. От больных тяжелой формой материал направляют в лабораторию нативным и в 1 %-ной пептонной воде. В транспортную среду вносят 1—2 мл или 1—2 г материала на 5—6 мл среды.

При вынужденном удлинении сроков доставки материала в лабораторию (длительное плавание, круиз и т. п.) можно использовать полоски фильтровальной (промокательной) бумаги. Жидкими испражнениями пропитывают полоску обычной плотной промокательной бумаги или другого гигроскопичного материала и герметично упаковывают в пластиковый пакет для предохранения от высыхания при транспортировании в лабораторию. На таких полосках холерные вибрионы выживают до четырех-пяти или более недель, пока сохраняется влага.

При обследовании на вибрионосительство материал забирает медицинский персонал лечебно-профилактических учреждений, в очаге - создают специальные группы по отбору проб, работающие под руководством эпидемиологов. Материал в количестве 1—2 г может быть доставлен на исследование нативным, в 1 %-ной пептонной воде или другой транспортной среде.

Способы отбора проб от больных холерой,

вибрионосителей и контактных с ними лиц, секционного материала

- Испражнения и рвотные массы в количестве 10—20 мл собирают в стерильную посуду стерильными ложками или стеклянными трубками с резиновой грушей из индивидуального судна, на дно которого помещают меньший по размеру сосуд (лоток), удобный для обеззараживания кипячением.
- Для взятия материала у больных с обильным водянистым стулом можно использовать резиновый катетер, один конец которого вводят в прямую кишку, а другой опускают в банку. Жидкие испражнения стекают в сосуд свободно или при легком массаже брюшной стенки.
- Стерильный ректальный ватный тампон из гигроскопической ваты вводят в прямую кишку на глубину 5—6 см и собирают им содержимое со стенок кишечника. Тампон опускают во флакон или пробирку с 1 %-ной пептонной водой, обломив часть деревянного стержня.
- Стандартную стерильную петлю из алюминиевой проволоки перед забором материала смачивают стерильным 0,9%-ным раствором натрия хлорида и вводят в прямую кишку на 8—10 см. Взятый материал переносят во флакон или пробирку с 1 %-ной пептонной водой.
- Желчь берут при дуоденальном зондировании в лечебном учреждении. В отдельные пробирки собирают две порции: из желчного пузыря и желчных протоков (В и С). Материал доставляют нативным.
- От умерших с подозрением на холеру берут отрезки (длиной около 10 см) верхней, средней и нижней частей тонкой кишки; разрез производят между двойными лигатурами, предварительно наложенными на оба конца изымаемого участка кишечника. Желчный пузырь после перевязки протока извлекают целиком. Содержимое кишечника и желчь от трупа можно взять стерильным шприцем с толстой иглой в объеме до 10 мл и перенести в

емкость с 1 %-ной пептонной водой. Взятые образцы органов трупа укладывают
раздельно в стерильные банки.

Направление проб от людей

В _____ лабораторию _____
ию _____
для исследования _____ от « ____ » _____ 200 ____ г.

№ регистрационный *	№ пробы	Первичное или повторное	Характер материала	Ф.И.О.	Возраст	Диагноз	Адрес места жительства	Место работы	Время отбора пробы	Примечание**
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

* Регистрационный номер проставляют в лаборатории.

** Указать принимал(а) ли антибиотики (если да - то какие, когда и сколько).

Пробы отбирали: _____

(Ф. И. О., должность)
(Подписи)

Пробы доставил: _____

(Ф. И.О., должность)
(Подпись)

Время доставки проб _____

Дата, время – часы, минуты

Банки, пробирки с материалом закрывают непромокаемыми пробками и пергаментной бумагой, тщательно обрабатывают снаружи салфеткой, смоченной дезинфицирующим раствором, избегая затекания его внутрь. Все пробы этикеткируют, укладывают в специально подготовленную для транспортирования металлическую тару и перевозят на

служебном транспорте с сопровождающим. Форма направления проб от людей приведена выше.

Отбор проб из объектов окружающей среды.

• Воду (питьевую, из поверхностных водоемов и др.) для исследования берут в количестве 1 л на одну пробу в двух объемах по 500 мл в стерильную посуду с непромокаемой пробкой.

Из водопроводных кранов пробы воды берут после предварительного обжигания их спиртовым факелом и спуска воды в течение 10 мин при полном открытии крана.

• Хозяйственно-бытовые сточные воды отбирают для исследования двумя способами: в объеме 1 л также в двух емкостях по 500 мл или тампонами, приготовленными из марлевых салфеток размером 10 x 10 см, сложенных в 10—15 слоев. Последние закрепляют у места забора воды, через сутки помещают в стерильную банку и доставляют в лабораторию.

• Гидробионтов (рыб, лягушек и др.) отлавливают из водоемов любым способом и в закрытых банках, ведрах и других сосудах доставляют в лабораторию.

• Исследовать зоопланктон (дафнии, циклопы и др.) можно групповым методом, объединяя в один посев 10—30 образцов, отловленных на одном участке водоема. В этом случае они могут быть доставлены в одном сосуде. При исследовании рыб берут содержимое желудка и жабры.

Направление проб из объектов окружающей среды

В _____ лабораторию

ию _____

для исследования на _____ от «___» _____ 200

г.

№ регистрационный *	№ пробы	Место отбора проб	Объект для исследования	Характер материала	Объем (количество)	Время отбора пробы (час., мин)
1	2	3	4	5	6	7

* Регистрационный номер проставляют в лаборатории.

Пробы отбирали: _____

(Ф. И. О., должность) (Подписи)

Пробы доставил: _____

(Ф. И.О.. должность) (Подпись)

Время доставки проб _____

Дата, время – часы, минуты

- Смывы с различных объектов окружающей среды берут ватным или марлевым тампоном, смоченным 0,9 %-ным раствором натрия хлорида, с поверхности площадью 10 x 10 см. Тампон опускают во флакон или пробирку с 1 %-ной пептонной водой.
- Для сбора мух расставляют мухоловки, в которые наливают 1 %-ную пептонную воду с 1 % сахара.
- Остатки пищи в очаге и по показаниям пищевые продукты отбирают по 200 г плотных и 0,5 л жидких, помещают в стеклянную посуду и закрывают. При необходимости в жидкие продукты добавляют основной пептон до 1 %-ной концентрации.

Пробы объектов окружающей среды этикетировывают, заполняют направление и отправляют в лабораторию с нарочным, согласно действующим СП. Форма направления проб из объектов окружающей среды приведена выше.

Бактериологическое исследования

При бактериологическом исследовании на холеру используют различные питательные среды: жидкие среды обогащения, щелочной агар, элективные дифференциально-диагностические среды и набор сред для идентификации. Применяют сухие среды производственного выпуска, имеющие номера госрегистрации и лицензии, или среды, консерванты, приготовленные по рецептуре и технологии, **изложенной в разделе «Среды»**. Перечень производственных питательных сред для выделения и идентификации возбудителя холеры приведен ниже

При транспортировании и хранении медицинских иммунобиологических препаратов следует руководствоваться СП 3.3.2.028—95. Используемые для диагностики холеры питательные среды подлежат бактериологическому контролю в установленном порядке.

Агаровые среды перед использованием должны быть тщательно подсушены. Посев делают так, чтобы получить рост в виде изолированных колоний. Все посеvy инкубируют при температуре $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

Посевы исследуемого материала на всех этапах выращивают в 1 %-ной пептонной воде 6—8 ч, в пептонной воде с теллуридом калия - 12—18 час, на щелочном агаре - не менее 14—16 ч, а на плотных элективных средах - 18—24 час. Теллурид калия следует добавлять в 1 %-ную пептонную воду с рН не ниже $8,3 \pm 0,1$ до внесения исследуемого материала. Продолжительность хранения рабочего раствора теллурида калия (1 : 1000) - 7 дней, а питательных сред с теллуридом калия - не более 2 сут при условии содержания их в холодильнике.

Исследование материала от больных, трупов и подозреваемых на вибрионосительство

1 этап (см. рис. 3,4; табл.16)

А) Испражнения, рвотные массы больных, а также содержимое кишечника, желчного пузыря и суспензию кусочков слизистой тонкого кишечника трупа в объеме 0,5—1,0 мл засевают пипеткой в 50—100 мл накопительной среды, петлей - на щелочной агар и одну из элективных сред (СЭДХ, TCBS).

При исследовании материала от больных с подозрением на заболевание холерой, не допускается использование 1 %-ной, пептонной воды с теллуридом калия в качестве накопительной среды. В случае поступления материала от больных с подозрением на холеру целесообразно применять ускоренные методы исследования: иммунофлюоресцентный метод, специфическую иммобилизацию с О-холерными

диагностическими сыворотками в капле при фазово-контрастной или темнопольной микроскопии, ПЦР со специфическими праймерами.

Б) Материал от подозреваемых на вибрионосительство засевают в 50 мл среды накопления при индивидуальных анализах и в 100мл - при групповых, объединяя в один флакон по 0,5—1,0мл пробы не более чем от 5 человек. К групповым посевам прибегают в редких случаях при проведении массовых обследований на вибрионосительство.

Материал, доставленный в 5 мл 1 %-ной пептонной воды, полностью используют для посева в 50 мл среды накопления. В случае поступления в лабораторию материала, забранного в 50 мл 1 %-ной пептонной воды во флаконе, и доставки его не позже 2 час после забора пробы, флакон помещают в термостат на 6 час для накопления возбудителя. При доставке материала в более поздние сроки 5 мл его засевают в 50 мл 1 %-ной пептонной воды.

В отдельных случаях, при бактериологическом исследовании материала от лиц, принимавших антибиотики, активные по отношению к возбудителю холеры, его засевают в 200—300 мл 1 %-ной пептонной воды (предпочтительно в широкогорлые колбы) и на 2 чашки щелочного агара так, чтобы получить рост в виде изолированных колоний. Посевы инкубируют при 37 °С в течение 24 час, производят последовательные высевы через 8—10 час инкубации с поверхностного слоя среды на пластинки щелочного агара. Использование второй среды обогащения в этом варианте исследования нецелесообразно.

2 этап (через 6—8 час от начала исследования).

С первой среды накопления делают высев на щелочной агар и одну из элективных сред и в 5—8 мл второй среды накопления. Пересевы в жидкие и на плотные среды делают с поверхности жидкой среды большой бактериологической петлей диаметром 5 мм.

При отрицательных результатах исследования нативного материала ускоренными методами, их повторяют после 6 ч инкубации первой среды накопления.

3 этап (через 12—16 час от начала исследования).

Высев со второй среды накопления на щелочной агар.

В случае необходимости ускорения хода анализа материала от больного или подозрительного на заболевание холерой, отбор колоний со щелочного агара, засеянного в начале исследования, можно начинать уже на этом этапе, в остальных случаях - на следующем.

4 этап (через 18-24 час от начала исследования)

А) чашки с посевами просматривают в проходящем свете невооруженным глазом или с помощью лупы, а также под стереоскопическим микроскопом и отбирают подозрительные колонии для выделения и идентификации культуры.

Колонии *Vibrio cholerae* в типичной S форме – круглые, гладкие, плоские, голубоватые, гомогенные, прозрачные в проходящем свете и серо-голубые под стереоскопическим микроскопом. Колонии на СЭДХ имеют ярко-желтую окраску на зеленом фоне среды, полупрозрачные.

Б) при отборе колоний можно использовать пробу на эндофенолоксидазу. Колонии отсевают после появления положительной реакции.

В) Подозрительные колонии проверяют в реакции агглютинации на стекле (слайд-агглютинация) с сывороткой холерной 01 в разведении 1:50-1:100. При положительной реакции ставят слайд-агглютинацию с вариантоспецифическими сыворотками Инаба и Огава в том же разведении.

Г) Готовят мазки для окраски по Граму. Готовят мазки для обработки люминесцирующей сывороткой.

Д) При отрицательных результатах исследования колоний, обнаруженных в посевах материала от больных, проверяют их с холерной сывороткой 0-139 и RO (против атипичных холерных вибрионов) в слайд-агглютинации.

Положительная ориентировочная реакция агглютинации с холерной 01 сывороткой в разведении 1:100 и вариантоспецифической в разведении 1:50 или положительная

реакция с люминесцирующими антителами в сочетании с морфологическими, культуральными признаками и специфической иммобилизацией позволяет выдать предварительный ответ об обнаружении в исследуемом материале холерного вибриона 01, а в случае положительной реакции агглютинации с сывороткой 0139 – холерного вибриона 0139 серогруппы.

Е) Подозрительные на вибрионы колонии, агглютинирующиеся и не агглютинирующиеся холерными 01, 0139 и RO сыворотками, отсевают на одну из полиуглеводных сред (Лактозо-сахарозная, Ресселя, Клигlera и другие полиуглеводные среды (ПУС) или на сектор ЩА для выделения чистой культуры и её идентификации.

5 этап (через 24-36 час от начала исследования).

Отбор культур для идентификации.

На полиуглеводных средах (ПУС) отбирают культуры с типичным для вибрионов характером роста:

А) на двууглеводных средах (лактозо-сахарозная, глюкозо-лактозная) наблюдается характерное для кислой реакции изменение цвета столбика при сохранении цвета скошенной части без образования газа.

Б) трехуглеводная среда Клигlera полностью желтеет без образования газа и сероводорода.

Культуры, выросшие на щелочном агаре, проверяют на наличие индофенолоксидазы. Определяют морфологию микроорганизмов и чистоту отобранных по этим признакам культур, выросших на щелочном агаре и полиуглеводных средах с помощью мазков, окрашенных по Граму. Культуры, дающие характерные изменения на ПУС и положительные в пробе на оксидазу, проверяют в ориентировочной реакции агглютинации с холерными сыворотками 01, RO, Инаба, Огава. При отрицательных результатах с этими сыворотками ставят слайд-агглютинацию с холерной сывороткой 0139.

На основании положительных результатов агглютинации с сыворотками 01 серогруппы (01, Инаба, Огава) выдают предварительный или окончательный положительный ответ о выделении из исследуемого материала холерного вибриона 01 соответствующего серовара. Если выделенная культура реагирует с холерной 0139 сывороткой при отрицательных результатах с сыворотками 01 серогруппы, выдают ответ о выделении холерного вибриона 0139 серогруппы.

6 этап исследования (через 36-48 час от начала исследования)

Учитывают результаты идентификации и выдают окончательный ответ о выделении культуры холерного вибриона соответствующей серогруппы - 01 (серовариантов - Инаба, Огава, Гикошима) или 0139. При выделении от больного или носителя культуры холерного вибриона, не агглютинирующегося холерными сыворотками (01,0139), выдают ответ о выделении холерных вибрионов ни01, ни 0139 серогруппы (так называемых НАГ-вибрионов)

Ускоренная идентификация культур после микроскопии мазка окрашенного по Граму:

1. РА с сыворотками 01, 0139
2. Специфическая иммобилизация с О-холерными диагностическими сыворотками в капле при фазово-контрастной или темнопольной микроскопии.
3. РНГА с АТ-эритроцитарным диагностикумом.
4. Иммунофлюоресцентный метод.
5. ПЦР со специфическими праймерами
6. Чувствительность к холерным диагностическим фагам (ХДФ) с учетом результатов через 3 час.
7. Принадлежность к группе Хейберга с учетом результатов через 3 час.

Предварительный положительный ответ дают только устный, если получен положительный ответ по пунктам 1, 2, 3, 4.

Окончательный положительный ответ дают через 36-48 час письменный.

Отрицательный ответ может быть дан по окончании исследования по полной схем через 36-48 час.

Принципиальная схема лабораторного исследования на холеру

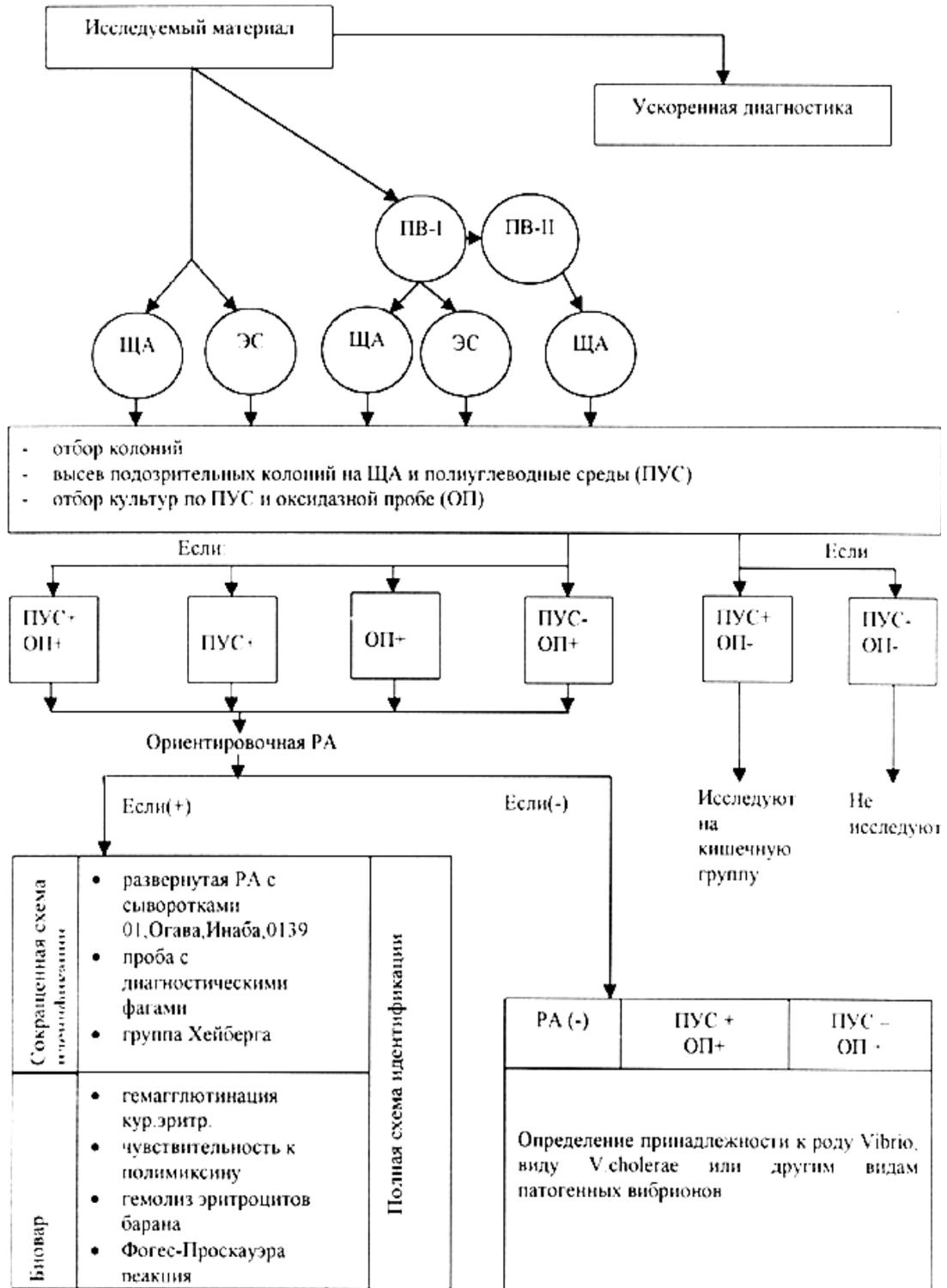
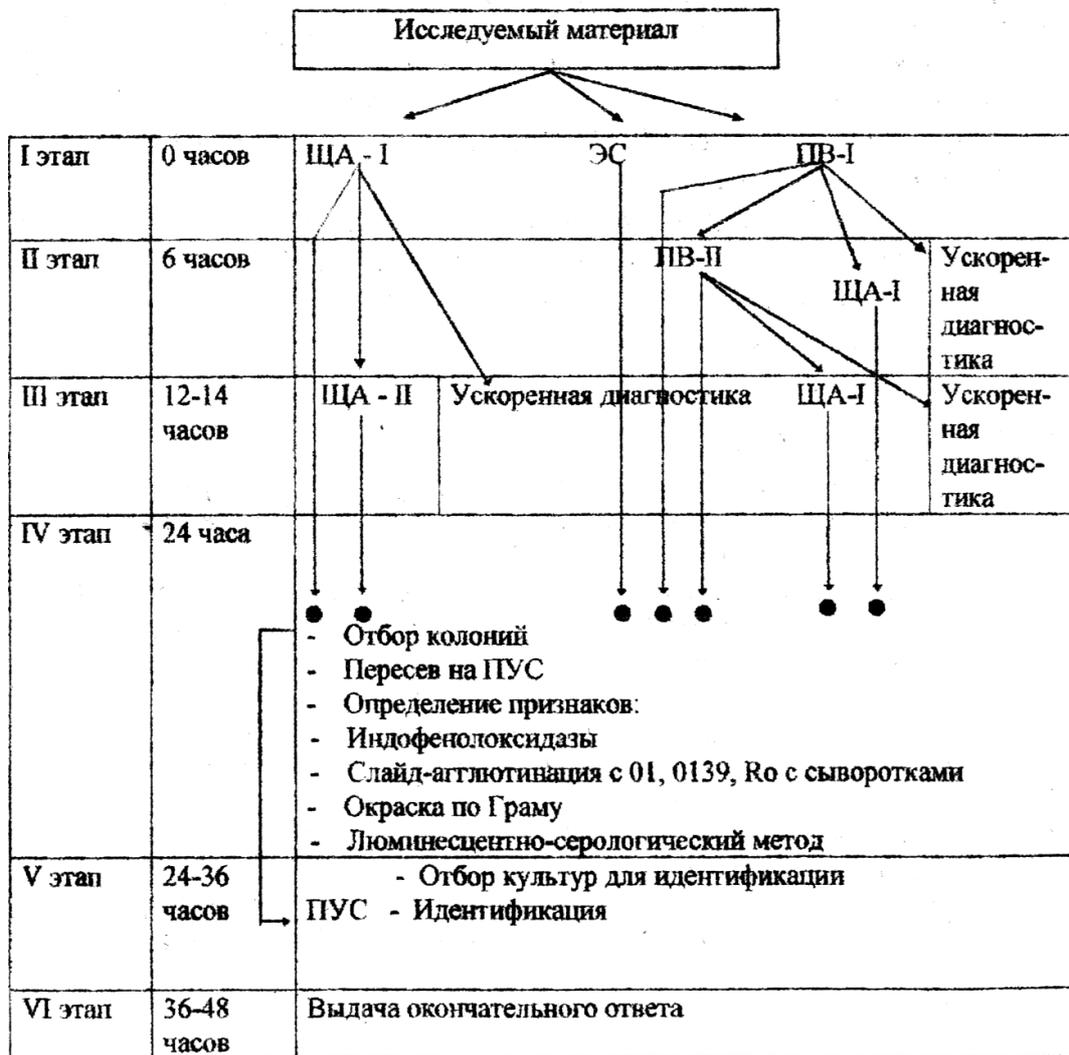


Схема лабораторного исследования на холеру с учетом времени



Серологические методы диагностики холеры

• Серологические методы исследования имеют дополнительное значение и лишь в отдельных случаях, при проведении оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа, их результаты могут быть решающими.

Для серологической диагностики холеры используют иммунологические реакции, выявляющие в сыворотке крови больных, переболевших и вибрионосителей, а также вакцинированных специфические антитела: агглютинины, антитоксины и вибриоцидные антитела.

• У больных холерой на 5—7 день от начала заболевания появляются агглютинины, антитоксины и вибриоцидные антитела в высоких титрах. Титры антитоксинов нарастают более медленно.

• Необходимо исследовать парные сыворотки с интервалом в 7—10 дней. Первая проба должна быть взята на 2—3 день болезни, а вторая - через 5—7 дней для оперативной диагностики и через 7—10 дней и более - для ретроспективной.

• Кровь для серологических исследований берут из вены (1—5 мл), а при отсутствии такой возможности из пальца. В лаборатории сыворотку инактивируют при температуре $(56,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ 30 мин.

- Если кровь забирают в день постановки реакции, пробирки со свернувшейся кровью необходимо центрифугировать 10—15 мин при 3 000 об/мин. При отсутствии возможности исследовать сыворотку немедленно ее сохраняют в ампулах при температуре $(4,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Кровь из пальца берут в объеме 0,4 мл и вносят в стерильный пенициллиновый флакон или пробирку с 1,6 мл 0,9% раствора хлорида натрия (1 : 5).

Определение агглютининов в сыворотке крови

Обнаружение противохолерных антител методом развернутой реакции агглютинации. Исследуемую сыворотку разводят 1 %-ной пептонной водой рН $7,5 \pm 0,1$ в объеме 1 мл от 1 : 10 до 1 : 640. В качестве антигена используют 3 часовую бульонную культуру, выделенную в данном очаге, или исследуют в 3 рядах с культурами холерных вибрионов (сероваров Огава, Инаба и 0139 серогруппы). В пробирку с разведённой сывороткой вносят по 1 капле культуры-антигена и ставят на 1 час в термостат, затем до утра в холодильник при температуре $(4,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, после чего отмечают результаты. Реакция сопровождается контролями антигена и сыворотки.

При определении титра реакции учитывают разведения с агглютинацией на 3—4 креста. Результат исследования сыворотки больного при реакции агглютинации в разведении 1 : 40 и выше считается ориентировочно положительным.

Диагностическое значение имеет не менее чем 4-кратное нарастание титров антител.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) с диагностикумом эритроцитарным холерным антигенным.

РНГА предназначена для выявления полных антител в сыворотке крови. Это достаточно специфичная и чувствительная двухкомпонентная реакция. По чувствительности значительно превосходит реакцию агглютинации. Необходимые ингредиенты, методика постановки в макро- и микрообъемах изложены в наставлении к «Диагностикуму эритроцитарному холерному антигенному».

Результат исследования сыворотки больного в разведении 1 : 40 и выше считается ориентировочно положительным. Диагностическое значение имеет не менее чем 4-кратное нарастание титров антител.

Реакция нейтрализации антигена (РНАг)

РНАг служит для выявления антител в сыворотке крови с использованием диагностикума эритроцитарного холерного иммуноглобулинового. РНАг - высокоспецифическая трехкомпонентная реакция. Ее принцип заключается в специфической нейтрализации добавляемого антигена полными и неполными антителами, содержащимися в сыворотке. Необходимые ингредиенты, методика постановки в макро- и микрообъемах изложены в инструкциях по применению к диагностикуму эритроцитарному холерному иммуноглобулиновому.

При использовании системы реакций РНГА и РНАг отпадает необходимость в постановке контроля специфичности с каждой исследуемой сывороткой, т. к. эти две реакции взаимно контролируют полученные результаты.

Результат исследования сыворотки больного в РНАг в разведении 1 : 50 (1 : 80) и выше считается ориентировочно положительным.

Диагностическое значение имеет не менее чем 4-кратное нарастание титров антител при исследовании парных сывороток в РНГА и РНАг.

Определение вибриоцидных антител в сыворотке крови (РВА)

Вибриоцидные антитела в крови больных обнаруживаются с 1—3 дня болезни в титрах 10^{-1} — 10^{-3} и достигают максимальных значений 10^{-4} — 10^{-8} к 10—12 дню. Принцип метода во всех его вариантах заключается в том, что в присутствии вибриоцидных антител не происходит размножения холерных вибрионов.

При проведении серологических исследований в очаге, обусловленном возбудителем холеры определенного серовара, в реакции используют один штамм соответствующего серовара, при отсутствии этих данных - два штамма обоих сероваров.

Материалы и оборудование.

- исследуемые сыворотки, инактивированные прогреванием 30 мин при температуре $(56,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$;
- сухой комплемент или свежеполученная сыворотка морской свинки в разведении 1 : 20;

- 0,9 %-ный раствор хлорида натрия рН $7,2 \pm 0,1$;
- штаммы холерных вибрионов сероваров Огава и Инаба, типичные в S-форме, не чувствительные к комплементу;
- чашки Петри со щелочным агаром;
- лоток со льдом;
- термостат на $(37,0 \pm 1,0)$ С.

Методика постановки реакции.

Комплемент, разведенный 0,9 %-ным раствором хлорида натрия 1 : 20, разливают в два ряда пробирок по 0,9 мл. В первую пробирку вносят 0,1 мл исследуемой сыворотки и после тщательного перемешивания последовательно переносят по 0,1 мл до разведения 10^{-10} , получая десятикратные разведения сыворотки в объеме 0,9 мл. Титрацию сыворотки проводят на льду, который помещают в любую емкость.

Из односуточной агаровой культуры холерного вибриона готовят взвесь в 0,9 %-ном растворе хлорида натрия, содержащего в 1 мл 10 000—20 000 м. к. Стерильной градуированной пипеткой полученную взвесь по 0,1 мл вносят в опытные пробирки с раститрованной сывороткой.

Необходимы следующие контроли: а) контроль комплемента (0,9 мл комплемента и 0,1 мл культуры); б) контроль сыворотки (0,8 мл 0,9 %-ного раствора хлорида натрия, 0,1 мл сыворотки и 0,1 мл культуры); в) контроль культуры (0,9 мл 0,9 %-ного раствора хлорида натрия и 0,1 мл культуры).

Штатив с пробирками на 1 час помешают в водяную баню или термостат при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, сделав предварительно высеив из пробирки контроля культуры на 2 пластинки щелочного агара для определения фактической концентрации живых вибрионов в опытной суспензии (контроль разведения).

Через 1 час штатив вновь ставят на лед и из каждой пробирки отдельной стерильной пипеткой 0,1 мл культуры высеивают на чашку со щелочным агаром рН $7,0 \pm 0,1$. Посев равномерно распределяют по поверхности чашки покачиванием или шпателем. Чашки помещают на 18—24 час в термостат при температуре $(37,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, после чего подсчитывают количество выросших колоний.

В посевах из контрольных пробирок с культурой должно вырастать количество колоний, близкое к контролю разведения.

Вибриоцидным титром считают максимальное разведение сыворотки, которое вызывает гибель не менее чем 50 % клеток холерного вибриона, что выявляется при посеве на агаровые пластинки в чашки Петри, по сравнению с количеством выросших колоний из пробирки контроля комплемента.

Определение вибриоцидных антител (В А) в сыворотке крови на основе ферментации углеводов.

Об отсутствии или наличии ВА судят по ферментации сахарозы, регистрируемой с помощью индикатора.

Материалы и оборудование.

- инактивированная сыворотка крови;
- штаммы холерного вибриона серовара Огава и Инаба;
- комплемент, разведенный 1 : 20 1 %-ной пептонной водой, содержащей 1 % сахарозы и 1 % индикатора Андреде.
- термостат на $(37,0 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Методика постановки реакции.

Комплемент, разведенный 1 : 20 1 %-ной пептонной водой с сахарозой и индикатором Андреде разливают в пробирки по 0,45 мл. В первую пробирку добавляют 0,05 мл исследуемой сыворотки и после тщательного перемешивания переносят 0,05 мл смеси во вторую пробирку, из второй в третью и т. д. (до разведения 10^5 — 10^9). Готовят суспензию 18—20-часовой агаровой культуры холерного вибриона и разводят 1 %-ной пептонной водой до концентрации 10^3 м.к./мл. в 1 мл. Во все пробирки вносят по 0,45 мл суспензии и помещают в термостат.

Постановку реакции сопровождают следующими контролями:

- 0,45 мл 1 %-ной пептонной воды, содержащей 1 % сахарозы и 1 % индикатора Андреде + 0,05 мл исследуемой сыворотки + 0,45 мл взвеси культуры - контроль сыворотки;

- 0,45 мл комплемента с сахарозой и индикатором + 0,45 мл культуры - контроль комплемента;
- 0,45 мл 1 %-ной пептонной воды с сахарозой и индикатором + 0,45 мл культуры - контроль культуры;
- 0,45 мл 1 %-ной пептонной воды с сахарозой и индикатором + 0,05 мл исследуемой сыворотки - контроль стерильности сыворотки.

Через 5—6 час проводят учет реакции. При этом в контроле (кроме контроля стерильности сыворотки) цвет содержимого пробирок должен перейти в красный или розовый. Изменение цвета индикатора в пробирках рабочего ряда, связанное с ферментацией сахарозы размножившимися вибрионами, свидетельствует об отсутствии вибриоцидных антител в исследуемой сыворотке. За вибриоцидный титр принимают то наибольшее разведение сыворотки, при котором цвет содержимого пробирок остается неизменным или интенсивность его значительно отличается от окраски контрольных проб. Результат выражают в виде десятичного логарифма разведения сыворотки, взятого с обратным знаком.

Определение токсиннейтрализующих антител в сыворотке крови

РНГА с эритроцитарным холерным энтеротоксическим диагностикумом (ЭХЭД) предназначена для выявления токсиннейтрализующих антител в сыворотке крови больных холерой и вибрионосителей, у которых инфицирование обусловлено холерными вибрионами 01 и 0139 серогрупп. Токсиннейтрализующие антитела появляются на 5—7 день болезни, достигая максимума на 14—21 день, затем их титр постепенно снижается. Иммуноглобулины к холерному токсину, в сравнении с вибриоцидными и другими специфическими холерными антителами, дольше циркулируют в сыворотке крови после перенесенной инфекции (до 8—10 и более месяцев). Условно положительным титром РНГА с ЭХЭД следует считать 1 : 160 и выше. Целесообразно исследовать парные сыворотки. Результат РНГА с ЭХЭД позволяет сделать заключение о токсигенности (эпидемичности) циркулирующего в очаге штамма холерного вибриона.

Таблица 16

Признаки, дифференцирующие биовары *V.cholerae* 01

Признаки	<i>V.chlorae</i> 01 biovar eltor	<i>V.cholerae</i> 01 biovar cholerae
Лизабельность монофагами: - классическим - эльтор	- +	+ -
Чувствительность к 30 ед/мл полимиксина В	- (+)	+
Агглютинация куриных эритроцитов	+ (-)	-
Образование ацетилметилкарбинола (Фогес-Проскауэра реакция)	+ (-)	-

Коклюш

Коклюш - острое инфекционное заболевание преимущественно детского возраста, основным симптомом которого являются приступы спазматического кашля.

Возбудителем коклюша является *Bordetella pertussis*. Род *Bordetella*, кроме возбудителей коклюша, включает еще два вида бактерий, патогенных для человека: *B. parapertussis* – возбудитель паракоклюша и *B. bronchiseptica* – возбудитель бронхисептикоза, заболевание которое развивается чаще у домашних животных (у человека регистрируется только в 0,5% случаев). Другие виды (*B. holmesii*, *B. hinzii*, *B. avium*) могут выделяться из крови пациентов с иммунодефицитами. Все бордетеллы имеют общие признаки, их дифференциацию проводят по определенным морфологическим, биохимическим и антигенным свойствам (табл).

Морфологические и тинкториальные свойства

Бордетеллы коклюша – небольшие палочки размером 0,5-1,0х 0,2-0,3 мкм (коккобактерии), неподвижные, спор не образуют, имеют небольшую капсулу. Анилиновыми красителями окрашиваются интенсивно по полюсам, грамотрицательны. В препарате они располагаются поодиночке или попарно.

Биологические свойства

Бордетеллы коклюша строгие аэробы, требовательны к питательным средам. Для своего размножения они нуждаются в аминокислотах, как факторах роста, а также в добавлении крови, древесного угля для нейтрализации образовавшихся жирных кислот, которые тормозят развитие бордетелл. В настоящее время для культивирования бордетелл коклюша применяют следующие питательные среды:

1. Картофельно-глицериновый агар с добавлением 20% крови (среда Борде-Жангу).
2. Полусинтетический казеиново-угольный агар без крови (среда КУА).
3. Молочно-кровяной агар, содержащий питательный агар, молоко и дефибринированную кровь.
4. Угольно-кровяной агар (5- 10% лошадиной или бараньей крови или сыворотки крупного рогатого скота).

Оптимальная температура роста 35-37°C в условиях повышенной влажности. Колонии *B. pertussis* на питательных средах появляются через 48-72 часа. Они мелкие (диаметром около 1мм), выпуклые, влажные, блестящие, на КУА имеют серовато-кремовый цвет, а на среде Борде-Жангу приобретают жемчужный или ртутный блеск. На кровяных средах культуры образуют S-форму колоний (1 фаза), при дальнейшем культивировании могут образовывать R-формы (2 фаза).

Ферментативная активность у бордетелл коклюша выражена слабо: они не расщепляют углеводы и белки, не восстанавливают нитраты, образуют каталазу и оксидазу. *B. parapertussis* вырабатывает ферменты тирозиназу и уреазу (отрицательный тест на оксидазу). Наиболее активна *B. bronchiseptica*: подвижна, вырабатывает уреазу, оксидазу, утилизирует цитраты, переводит нитраты в нитриты. *B. parapertussis* и *B. bronchiseptica* менее прихотливы и растут на простом агаре.

Вирулентные бордетеллы коклюша 1 фазы содержат токсические вещества, определяющие патогенез и клинические проявления коклюша:

- коклюшный экзотоксин (КТ), ингибирующий клеточную аденилатциклазу и приводящий к гибели клеток - мишеней, обладающий высокой иммуногенностью, приводящий к лимфоцитозу и повышению выработки инсулина, филаментозный гемагглютинин (ФГА), участвующий в адгезии бордетелл,
- белки наружной мембраны (пертактин),
- липополисахарид, содержащий два липида: А и Х,
- аденилатциклазный гемолизин, катализирующий синтез цАМФ,
- трахеальный цитотоксин, обладающий пирогенностью, артритогенностью, стимулирующий интерлейкин 1,

- дермонекротизирующий токсин, обладающий сосудосуживающей активностью и вызывающий некроз участков кожи.

Все перечисленные факторы патогенности присутствуют у свежeweыделенных штаммов, при хранении на искусственных питательных средах проявляется изменчивость возбудителя и при переходе от I фазы к IV фазе иммуногенность и вирулентность постепенно утрачиваются, меняются культуральные и биологические свойства.

Антигенная структура бактерий рода *Bordetella* сложна. У них выявлено 16 антигенов, из которых 7-й является родовым, общим для всех видов, видоспецифическим для возбудителя коклюша является антиген 1, для возбудителя паракоклюша –14, для возбудителя бронхисептикоза – 12. В зависимости от наличия 2 и 3 агглютиногена выделяют 4 серотипа *B.pertussis* : 2,0; 0,3; 2,3 ; 0,0 . Кроме того, у *B.pertussis* выделяют также 4-,5-,6-,13-,15- и 16-й агглютиногены. Агглютиногены 8-,9- и 10 - общие для *B.pertussis* и *B. bronchiseptica*, 11-й встречается только у *B. bronchiseptica*. Антигены выявляют в реакции агглютинации с моноклональными антителами к белкам фимбрий.

Таблица 17

Дифференциальные признаки бактерий рода *Bordetella*

Признак	<i>B.pertussis</i>	<i>B.parapertussis</i>	<i>B.bronchiseptica</i>
Жгутики	-	-	+
Редукция нитратов	-	-	+
Утилизация цитрата	-	+	+
Образование уреазы	-	+	+
Рост на МПА	-	+	+
Образование коричневого пигмента на МПА	-	+	-
На среде Борде-Жангу: рост за 24-48ч рост за 72-96ч	- +	+	+
Специфический термолабильный антиген: Фактор 1 Фактор 12 Фактор 14	+	+	+

Эпидемиология и патогенез

Источником инфекции является в основном больной человек, который выделяет возбудителя в течение 4-6 нед болезни. Заражение может произойти и от больного стертой формой, а также от здоровых людей, ставших временными носителями вследствие контакта с больным коклюшем.

Биотопом возбудителя являются верхние дыхательные пути больного. Передача возбудителя происходит воздушно-капельным путем. Окружающие предметы не могут играть большой роли в распространении инфекции вследствие быстрой гибели бордетелл во внешней среде. Ультрафиолетовые лучи убивают их через несколько минут, при температуре 56°C они гибнут через 20-30 минут, не переносят низкой температуры,

обычные растворы дезинфицирующих веществ инактивируют их в течение нескольких минут.

Возбудитель коклюша, попав в верхние дыхательные пути, заселяет слизистую оболочку гортани, бронхов, бронхиол, легочных артериол и размножается на реснитчатом эпителии воздухоносных путей. Выделяемый токсин вызывает раздражение нервных рецепторов слизистой оболочки, а всасываясь в кровь оказывает возбуждающее действие на дыхательный центр, следствием чего является спазм мелких бронхов, голосовой щели, сосудистый спазм и появление клонических судорог скелетных мышц.

Микробиологическая диагностика

Основным методом диагностики коклюша является бактериологический. Метод информативен в ранние сроки заболевания (период спазматического кашля), выделение культуры зависит от сроков взятия материала; на 1-й неделе заболевания положительные результаты удается получить у 95% больных, на 4-й — лишь у 50%, а начиная с 5-й недели, микроб выделить уже не удается.. Серологические методы можно использовать для ретроспективной диагностики, а также у больных с отрицательными результатами бактериологических исследований.

Бактериологический метод

Исследуемым материалом служит слизь с задней стенки глотки до начала антибактериальной терапии и не ранее чем через 3-4 ч после еды или натошак. Забор материала можно производить двумя методами: методом "кашлевых пластинок" и с помощью носоглоточного тампона. При использовании первого метода в момент появления кашля открытую чашку Петри с питательной средой подносят ко рту на расстоянии 10 см и держат в течение 6-8 кашлевых толчков.

Носоглоточный тампон представляет собой металлическую проволоку, на которую наматывается гигроскопическая вата длиной не менее 3-4 см (в целях избежания аспирации ваты). При немедленном посеве применяют сухой тампон, при отсутствии такой возможности — тампон, увлажненный полужидкой питательной средой или раствором хлорида натрия, что позволяет делать посев через 3-5 часов после взятия материала. Тампон извлекают из пробирки, сгибают конец его о край пробирки под углом 110-120°С, вводят в задние отделы ротовой полости, избегая прикосновения к слизистой оболочке щек, языка и миндалин (для чего используют шпатель) и проводят 2-3 раза по задней стенке глотки. Забор материала желателно проводить во время приступа кашля. При транспортировке в течение одних суток используют КУА или бульон Steiner-Scholte с циклодекстрином, при более длительном сроке - угольно-красной агар, оберегают от охлаждения (заворачивают в бумагу, ватку, в контейнер помещают грелку, заполненную горячей водой). Однако по частоте выделения возбудителей коклюша метод «кашлевых пластинок» значительно уступает взятию материала тампоном.

Ход исследования

1-й день. Исследуемый материал засевают на одну из специальных питательных сред: КУА, Борде-Жангу, молочно-красной агар. Для угнетения роста посторонних микроорганизмов поверхность питательной среды обрабатывают пенициллином. В каждую чашку наносят по 0,1 мл антибиотика, содержащего 7,5 МЕ и растирают стеклянным шпателем по всей поверхности питательной среды. Можно использовать цефалексин (40мг на 1л среды), он не подавляет рост бордетелл и более активен в отношении сопутствующей микрофлоры. Для получения изолированных колоний посев проводят путем втирания тампона по периферии чашки (в виде 4-5 площадок), а затем Z-образным штрихом в центре. Чашки помещают в термостат при 37° на 72 часа.

Через 72 часа выросшие колонии просматривают с помощью бинокулярного стереоскопического микроскопа или бинокулярной лупы. Из подозрительных колоний готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. При наличии в мазках грамтрицательных палочек ставят реакцию агглютинации на стекле с агглютинирующей

коклюшной сывороткой и делают пересев в пробирку или чашку Петри для получения чистой культуры бордетелл коклюша.

Выросшую культуру идентифицируют и дифференцируют от других видов рода по комплексу свойств (табл 17).

Для определения уреазы в агглютинационные пробирки вносят 0,3 мл густой суспензии исследуемого материала и 2-3 капли 0,1% спиртового раствора фенолфталеина. В положительном случае через 20-30 мин появляется малиновое окрашивание, указывающее на расщепление мочевины уреазой.

Серологическую идентификацию бордетелл проводят в реакции агглютинации с адсорбированными монорецепторными сыворотками к агглютиногенам 1,12,14.

При отсутствии роста через 72 ч чашки ставят в термостат еще на 48 ч и затем их изучают повторно. Предварительный ответ выдается через 3-5 суток, окончательный через 5-7 сут.

Высеваемость бордетелл коклюша зависит от следующих факторов:

1. Срок бактериологического исследования. Лучшая высеваемость достигается при исследовании материала, взятого в первые 2 недели заболевания.
2. Кратность обследования. При повторных, проведенных с короткими интервалами исследованиях, вероятность высева увеличивается.
3. Правильность взятия и посева исследуемого материала.
4. Качество тампонов. Нельзя использовать тампоны, предназначенные для исследования на дифтерию.
5. Срок и условия доставки материала в лабораторию.
6. Качество питательных сред.
7. Правильность применения пенициллина.

Другим методом выявления возбудителя является иммунофлюоресцентный (РИФ), который используется как дополнительный при наличии качественных реактивов (моноклональных антител к ЛПС возбудителя).

Современным и перспективным методом диагностики является полимеразная цепная реакция (ПЦР), чувствительность метода составляет несколько бактерий в образце, а специфичность приближается к 100%. Сейчас разработаны тест-системы для идентификации различных участков генома *V.pertussis*: гена КТ, аденилатциклазного гемолизина, повторяющегося участка ДНК. Забор материала осуществляется носоглоточными тампонами (сухие тампоны) или путем аспирации слизи из носоглотки. Срок получения результата - в течение одного дня.

Кроме того, разработана "сэндвич"-техника иммуноферментного анализа (ИФА) с применением очищенных аффинных антител к КТ.

Серологические методы

Серодиагностику проводят в реакции агглютинации (РА), непрямой гемагглютинации (РНГА) и связывания комплемента (РСК). Антитела в крови больных появляются на 3-4 неделе заболевания. Диагностическое значение имеет нарастание титра антител в динамике болезни в 4 раза и более, поэтому реакции ставят повторно через 10-14 дней. При обследовании непривитых против коклюша диагностическое значение имеет наличие антител в титрах 1:80. Реакции ставятся параллельно с коклюшным и паракоклюшным антигенами. Латекс-микроагглютинация, являясь модификацией РА позволяет выявлять антитела в более ранние сроки но этот метод может давать ложноположительные результаты.

Новым этапом серологической диагностики явилась разработка тест систем для ИФА с использованием очищенных антигенов бордетелл: КТ, ФГА, пертактина и комплекса этих антигенов. В последнее время успешно используют иммуноферментный метод для обнаружения антител в сыворотке (иммуноглобулины класса М) и в носоглоточной слизи (иммуноглобулины класса А). Эти антитела появляются со 2-3-й недели болезни и сохраняются в течение 3 мес.

Газовая анаэробная инфекция

Газовая анаэробная инфекция – полимикробное заболевание, возникающее после глубоко проникающих ранений мышц и других тканей, в условиях загрязнения раны патогенными клостридиями и сопровождающееся интоксикацией, поражением легочной ткани, развитием отека и гангрены в месте ранения.

В возникновении и развитии заболевания принимают участие несколько видов клостридий, относящихся к семейству Bacillaceae: *C. perfringens*, *C. histolyticum*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. bifermentans*. В патогенезе заболевания участвуют непатогенные для человека *C. sporogenes*, *C. tertium*. Основным возбудителем газовой анаэробной инфекции является *C. perfringens*, вызывающая заболевание в 70-80% случаев.

C. perfringens

Крупные грамположительные палочки размером 3-9x1,3 мкм. Жгутиков не имеют. Образуют овальную спору, располагающуюся в клетке субтерминально или центрально. В организме человека и животных образуют капсулу. Растут на всех видах питательных сред, применяемых для культивирования анаэробов. На твердых питательных средах образуют колонии S, R и M (слизистые) типов. На поверхности кровяного агара колонии круглые, гладкие, сероватые с ровными краями, плотным возвышением в центре и зоной гемолиза. В высоком столбике агара колонии имеют вид комочков ваты или чечевичек. На жидких питательных средах дают диффузное помутнение с обильным газообразованием.

Характеризуются сахаролитической и протеолитической активностью (табл. 18).

C. perfringens имеет 6 сероваров: А, В, С, D, Е, F, выделяющих различные по антигенной структуре токсины, имеющие сложный антигенный и химический состав. Токсин *C. perfringens* состоит из 12 фракций, среди которых наибольшее значение имеют: а-токсин, обладающий летальным, дерматонекротическим, гемолитическим действием, β, γ, о, δ-токсины, характеризующиеся летальным, некротическим и гемолитическим действием и вызывающие распад мышечной ткани.

C. novyi

Крупные палочки с закругленными концами размером 10-20x2,2-2,5 мкм. Перитрихи. Овальные споры располагаются в клетке субтерминально или центрально. Капсул не образуют. Грамположительны.

Строгие анаэробы. На плотных питательных средах образуют полупрозрачные, шероховатые колонии с неровными краями. На кровяном агаре дают зону гемолиза. В высоком столбике агара колонии напоминают комочки ваты. На жидких питательных средах микроб вызывает помутнение с образованием рыхлого осадка и газа.

Обладают слабыми сахаролитическими и протеолитическими свойствами. (табл. 18).

Содержат О и Н – антигены. По Н-антигену различают 3 серогруппы: А, В, С. В патологии человека значение имеют бактерии групп А и В, продуцирующие различные по антигенным свойствам токсины, обладающие гемолитическим, летальным, некротическим действием.

C. septicum

Палочки размером 3,1-14,1x1,1-1,6 мкм. В культурах встречаются нитевидные формы. Перитрихи. Овальные споры располагаются субтерминально. Грамположительны.

Строгий анаэроб. На плотных питательных средах образует блестящие полупрозрачные колонии с неровными краями. В высоком столбике агара колонии напоминают чечевицы. На кровяном агаре дают зону гемолиза. Колонии имеют тенденцию к ползучему росту. На жидких питательных средах дают помутнение с обильным газообразованием.

Характеризуются слабой протеолитической и сахаролитической активностью (табл. 18)

Имеют O и H- антигены. На основании различий H-антигена различают 6 сероваров, продуцирующих однородный токсин, характеризующийся летальными, некротическими, гемолитическими свойствами.

C. histolyticum

Небольшие палочки 1,6-3,1x0,6-1,0 мкм. Перитрихи. Капсул не имеют. Образуют субтерминально расположенные споры. Грамположительны.

Факультативные анаэробы, но в условиях аэриоза растут скудно. В анаэробных условиях на плотных питательных средах колонии полусферические, прозрачные с ровными краями, на кровяном агаре имеют зону гемолиза. В высоком столбике агара образуют колонии в виде мелких пушинок или чечевичек. В жидких средах вызывают равномерное помутнение без газа.

Обладают протеолитическими свойствами, но углеводы не ферментируют.

Продуцируют экзотоксин, оказывающий летальное и некротическое действие.

C. sordellii

Палочки размером 3,1-4,5 x 1,1-1,6 мкм. Имеют перитрихиально расположенные жгутики, субтерминально или центрально расположенные овальные споры. Грамположительны.

Анаэробы. На плотных питательных средах образуют серовато белые колонии с неровными краями, дающие на кровяном агаре зону гемолиза. В высоком столбике агара колонии имеют вид комочков ваты или чечевичек. На жидких питательных средах дают помутнение с образованием слизи.

Характеризуются сахаролитической и протеолитической активностью (табл. 18).

Продуцируют энтеротоксин, обладающий гемолитическим и летальным действием.

C. fallax

Грамположительные палочки размером 2-4 x 0,5-1 мкм, подвижны. Жгутики расположены перитрихиально. Образуют субтерминально располагающиеся споры.

Строгий анаэроб. На поверхности плотных питательных сред образуют плоские прозрачные колонии S и R типа, которые при дальнейшем культивировании становятся матовыми с возвышением в центре. На кровяном агаре колонии окружены зоной гемолиза. В высоком столбике агара напоминают мелкие зерна чечевицы. При длительном культивировании на питательных средах вирулентность микроорганизмов снижается.

Обладают сахаролитическими и протеолитическими свойствами (табл. 18)

Содержат O и H антигены, продуцируют однородный экзотоксин. Из раны выделяются редко, в 1-4% случаев.

C. sporogenes

Подвижные палочки 3-6x0,5 мкм. Жгутики располагаются перитрихиально. Образуют овальные, субтерминально расположенные споры. Грамположительны.

Строгие анаэробы. На поверхности твердых питательных сред образуют блестящие, полупрозрачные колонии S и R типа, иногда появляется тенденция к

получаему росту. На кровяном агаре дают зону гемолиза. В высоком столбике агара имеют вид пушинок или чечевицы.

Характеризуются слабыми сахаролитическими и протеолитическими свойствами (табл. 18).

В ранах обнаруживаются часто. В смешанных культурах, изолируемых в случае заболевания, *C. sporogenes* сильно повышает вирулентность *C. perfringens* и *C. septicum*.

Для культивирования клостридий газовой анаэробной инфекции применяют следующие питательные среды: Китта-Тароцци, Виллимса-Хоббс, Вильсона-Блер, кровяной агар Цейслера, бензидиновый агар, полужидкий агар.

Среда Китта-Тароцци: в пробирки помещают по 3-4 гр печени и заливают 7-8 мл бульона.

Среда Вильямса-Хоббс: бульон Хоттингера, агар, лактоза, 1% нейтральный красный, суспензия желтка куриного яйца.

Среда Вильсона-Блер: МПА, глюкоза, сульфит натрия, хлорид железа.

Бензидиновый агар: 10 мл раствора, состоящего из бензидина, 1 N раствора соляной кислоты, дистиллированной воды, смешивают с 10 мл агара.

Таблица 18

Биохимические свойства клостридий газовой анаэробной инфекции

название микроорганизма	<i>C. perfringens</i> A,B,C,D,E,F	<i>C. novyi</i> A,B	<i>C. septicum</i>	<i>C. histolyticum</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. differmentas</i>	<i>C. sordellii</i>	<i>C. fallax</i>
Разжижение желатина	+ -	+	+	+	+	+	+	-
Свертывание сыворотки	+ -	-	-	+	+	+	+	-
Свертывание яичного белка	-	-	-	+	+	+	+	-
Образование индола	-	-	-	-	-	+	+	-
Лакмусовое молоко	с	с	с	п	п	п	п	п
ф е р м е н т а ц и я	Глюкозы	+	+	+	-	+	+	+
	Левулезы	+	-	-	-	-	-	-
	Лактозы	+	-	+	-	-	-	-
	Галактозы	+	-	-	-	+	-	-
	Сахарозы	+	-	-	-	-	-	-
	Мальтозы	+	+ -	+	-	+	+	+
	Инулина	-	-	-	-	-	-	-
	Маннита	-	-	-	-	-	-	-
	Дульцита	-	-	-	-	-	-	-
	Салицина	-	-	+	-	-	+	-
	Глицерина	+ -	-	-	-	-	-	-
	Крахмала	+	+	-	+	+	-	-

ПРИМЕЧАНИЕ: с - свертывание, п - пептонизация.

Эпидемиология и патогенез.

Естественной средой обитания клостридий газовой анаэробной инфекции является кишечник животных, особенно травоядных и человека. С испражнениями клостридии попадают в почву, где их споры могут длительное время сохраняться.

Входные ворота инфекции – раневая поверхность, через которую возбудители проникают в виде спор. В развитии заболевания играет роль ряд факторов и в первую очередь характер раны. Наиболее часто анаэробная инфекция возникает при попадании спор в толщу мышечной ткани человека. Попавшие в рану споры в анаэробных условиях прорастают в вегетативные формы и размножаясь выделяют экзотоксин. В дальнейшем развитии заболевания имеет значение и действие токсинов и действие микробных клеток. Микроорганизмы после размножения, проникают за пределы раны, распространяясь по лимфатическим и кровеносным сосудам. Ферменты и токсины вызывают нарушение кровообращения, отек, разрушение мышечной и соединительной ткани, что обуславливает явления тяжелой общей интоксикации организма с вовлечением в процесс ЦНС, легких, сердца, почек, печени.

Ассоциация возбудителей газовой анаэробной инфекции и непатогенных или условно-патогенных микроорганизмов, попавших в рану, усиливает токсический эффект и значительно отягощает течение заболевания.

Исследуемый материал.

В качестве материала для исследования от больного берут отделяемое раны, экссудат, кусочки ткани из раны, перевязочный материал.

От трупа производят забор отделяемого раны, крови из сердца, фрагментов селезенки, печени, измененной ткани.

Взятие исследуемого материала

1. Пораженные и некротизированные ткани весом 10-20 г. берут на границе со здоровыми тканями.
2. Материал из раны извлекают из глубоких слоев.
3. Кровь берут из вены локтевого сгиба в количестве 5-10 мл.
4. Кусочки селезенки и печени весом 10-20 г., кровь от трупа следует брать в течение первых нескольких часов после смерти.
5. Материал помещают в стерильную посуду и немедленно пересылают в лабораторию.

Микробиологическая диагностика

В лаборатории плотный материал стерильно измельчают ножницами и растирают в ступке со стерильным песком или стеклом в равном объеме физиологического раствора. Кусочки органов оставляют для приготовления мазков отпечатков.

Кровь, экссудат, другой жидкий исследуемый материал центрифугируют при 3 тыс. об в течение 30 мин и для исследования используют осадок.

Все пробы исследуют микроскопическим методом. Из жидкого материала готовят мазки, из кусочков органов – мазки отпечатки. Окрашивают по Граму.

Выявление в препаратах грамположительных палочек, отдельных спор и особенно выявление капсул окружающих палочки при соответствующей клинической картине позволяет ориентировочно диагностировать газовую анаэробную инфекцию. При обнаружении палочек другой морфологии ориентировочного ответа не дают.

Для исследования бактериологическими методами материал делят на 2 части, одну из которых прогревают при температуре 80°C 20 мин для уничтожения вегетативной сопутствующей флоры. Посев 1 мл прогретого и непрогретого материала проводят в две пробирки со средой Китта-Тароцци и инкубируют в термостате 37°C – 48 часа.

По истечении времени инкубации изучают характер роста на среде Китта-Тароцци и культуру микроскопируют. Материал для приготовления мазка берут со дна пробирки пастеровской пипеткой и мазки окрашивают по Граму. Если в мазках выявляют грамположительные палочки, морфологически сходные с клостридиями анаэробной газовой инфекции, то для выделения чистой культуры посев культуральной жидкости проводят на среду Виллиса-Хоббс, кровяной агар Цейслера, бензидиновый агар и высокий столбик агара Вильсона-Блер. Культивирование посевов на всех средах, кроме Вильсона-Блер, ведут в анаэробных условиях при температуре 37°C, посев в высоком столбике агара Вильсона-Блер проводят в термостате от 16 час до 4 сут.

По истечении времени инкубации изучают характер роста на питательных средах. Колонии возбудителя газовой анаэробной инфекции на среде Вильсона-Блер и бензидиновом агаре имеют зону гемолиза и дают опалесценцию или покраснение на среде Виллиса-Хоббс. Из характерных колоний делают мазки, окрашивают по Граму. При выявлении в мазках грамположительных палочек, колонии пересевают на среду Китта-Тароцци для накопления чистой культуры. Посевы культивируют при температуре 37° 24ч.

Через сутки чистоту выросшей культуры контролируют бактериоскопическим методом и проводят идентификацию чистых культур по морфологическим, тинкториальным, биохимическим (табл.) свойствам и определяют наличие токсина в культуральной жидкости.

Определение токсина

0,2 мл культуральной жидкости со дна пробирки или центрифугата вводят внутривенно двум белым мышам или внутрибрюшинно двум морским свинкам. В случае гибели животного в течение первых суток или появления некроза кожи у морских свинок ставят реакцию нейтрализации токсина с диагностической сывороткой для определения типа возбудителя.

В 6 пробирок наливают по 0,9 мл исследуемого материала и в 5 из них добавляют по 0,6 мл одной из типоспецифических сывороток *S. perfringens*, *S. novyi* А и В, *S. septicum*, *S. histolyticum*, *S. sordellii*. В 6 пробирку вместо сыворотки вносят 0,6 мл физиологического раствора. Смеси выдерживают 40 мин при комнатной температуре и вводят по 0,5 мл из каждой пробирки двум белым мышам. Предварительный учет реакции проводят через 5-6 час, окончательный через 3 сут. Выживают те 2 мыши, у которых токсин был нейтрализован сывороткой соответствующего типа.

По результатам проведенного исследования выдают заключение о выделении определенного вида возбудителя газовой анаэробной инфекции.

Так как полный анализ на наличие газовой анаэробной инфекции длителен, предложены ускоренные методы лабораторной диагностики, применение которых не исключает полного исследования.

1. В случае бурного течения газовой анаэробной инфекции и возможности получения большого количества относительно чистого отделяемого из раны ставят реакцию нейтрализации антитоксином токсина по указанной схеме с центрифугатом материала.
2. Посев исследуемого материала проводят на среду Вильсона-Блер. Для этого несколько капель исследуемого материала разводят в 3-5 мл дистиллированной стерильной воды и засевают в расплавленный и охлажденный до температуры 37° агар. Учет проводится по времени появления колоний и их цвету. Колонии *S. perfringens* появляются через 4 часа после посева и имеют черный цвет, *S. septicum* и *S. sporogenes* появляются через 16-24 часа и также имеют черный цвет, колонии *S. histolyticum* через 16-24 часа имеют зеленовато-черный цвет.
3. Метод Тукаева применяется для быстрого выявления *S. perfringens* в молоке. К 1% пептонной воде добавляют 5% молока и делают посев исследуемого

материала. *C. perfringens* уже через 3-4 часа дает губкообразный сгусток, содержащий пузырьки газа, а отделившаяся жидкость прозрачна.

4. Для выявления *C. perfringens* из исследуемого материала готовят 2 мазка. Один окрашивается по Граму, а второй исследуют фазово-контрастным методом микроскопии для определения капсулы.

Ботулизм

Ботулизм – острое инфекционное заболевание, протекающее в виде токсикоинфекции и характеризующееся преимущественным поражением центральной нервной системы.

Возбудитель ботулизма – *Clostridium botulinum*, относится к семейству *Bacillaceae*.

Морфология и тинкториальные свойства.

Клостридии ботулизма – палочки с закругленными концами, длиной 4-9 мкм, шириной 0,3-1,3 мкм. Перитрихи. Капсул не имеют. Образуют субтерминально расположенные споры. По Граму окрашиваются положительно.

Биологические свойства.

Строгие анаэробы. Оптимальная температура для роста и токсинообразования от 28 до 37°C при pH 7,3 до 7,6. На среде Цейслера вырастают мелкие, серовато-мутные колонии, окруженные зоной гемолиза. В высоком столбике агара колонии напоминают комочки ваты или зерна чечевицы. В среде Китта-Тароцци, мартеновском бульоне, МПБ с 0,5% глюкозы и других жидких средах образуется диффузное помутнение с последующим выпадением компактного осадка на дно пробирки.

Характеризуются широким спектром сахаролитической и протеолитической активности (табл. 19)

Таблица 19

Биохимические свойства клостридий ботулизма

Тип ботулизма / Расщепление:	А	В	С	Д	Е	F
Глюкозы	кГ	кГ	(к)	к	кГ	кГ
Галактозы	-	-	(кГ)	(к)	-	-
Лактозы	-	-	-	к	-	-
Левулезы	кГ	кГ	-	к	кГ	кГ
Мальтозы	кГ	кГ	(кГ)	(к)	кГ	-
Маннита	-	-	-	-	-	-
Дульцита	-	-	-	к	-	кГ
Фруктозы	кГ	кГ	(кГ)	к	кГ	(кГ)
Глицерина	(кГ)	кГ	кГ	к	кГ	кГ
Салицина	кГ	кГ	-	-	кГ	кГ
Декстрина	(кГ)	(кГ)	(кГ)	к	-	+
Разжижение желатина	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
Выделение сероводорода	+	+	-	+	(+)	-

ПРИМЕЧАНИЕ: (+) – медленная или непостоянная реакция.

Возбудитель ботулизма вырабатывает экзотоксины, соответствующие 7 серологическим типам бактерий, по химической природе являющиеся протеинами.

Ботулинический токсин самый сильный из известных биологических ядов. Наиболее сильными для человека являются токсины сероваров А, В, Е. Клостридии ботулизма продуцируют лецитиназу, гемолизин.

Эпидемиология и патогенез

Возбудители ботулизма из кишечника животных попадают в почву, воду, где сохраняются длительное время в виде спор. Человек заражается алиментарным путем при употреблении в пищу продуктов, содержащих возбудителя ботулизма или токсин. Входные ворота инфекции – слизистая тонкого кишечника. При размножении клостридий в тонком кишечнике вырабатывается токсин, который через слизистую оболочку всасывается в кровь и поражает нервную систему, действуя на мотонейроны спинного мозга, ядра продолговатого мозга, угнетая функции парасимпатической нервной системы, поражает сердечно-сосудистую систему. У больных отмечается общая интоксикация, двоение в глазах, расстройство аккомодации, птоз век, расстройство глотания и дыхательной функции.

Клиническая картина заболевания, вызванного разными серотипами *C. Botulinum*, одинакова.

Исследуемый материал

Во всех случаях заболевания с симптомами, характерными для ботулизма, исследуют промывные воды желудка, рвотные массы, испражнения, кровь больного.

От трупа берут кусочки паренхиматозных органов, отрезки тонкого кишечника и желудка с содержимым. Исследованию подлежат пищевые продукты.

Взятие исследуемого материала.

1. Исследуемый материал помещают в стерильные флаконы.
2. Кровь берут из вены локтевого сгиба в объеме 8-10 мл с соблюдением асептических условий до введения больному лечебной сыворотки.
3. Для исследования производят забор 50-60 мл рвотных масс, промывных вод желудка, испражнений.
4. От трупа берут кусочки органов, отрезки желудка, тонкого кишечника с содержимым весом 50-60 г.
5. Пищевые продукты весом 100 г забирают из разных мест банки посуды. Пробы жидких или полужидких продуктов отбирают после перемешивания.
6. Собранный материал должен быть доставлен в лабораторию немедленно и подлежит исследованию в любом доставленном количестве. До проведения исследования его хранят на леднике.

Микробиологическая диагностика

Промывные воды желудка, рвотные массы освобождают от плотных масс центрифугированием при 3 тыс/об 15 мин, фильтрованием через ватно-марлевые фильтры (тальковые фильтры использовать нельзя) или отстаиванием и отсасыванием осадка. Плотный исследуемый материал растирают в ступке с двойным количеством физиологического раствора. Цитратную кровь для исследования не разводят. Жидкие продукты исследуют без предварительной обработки. Образцы проб до окончания исследования следует сохранять на леднике. Весь материал делят на 2 части: для обнаружения возбудителя и выделения токсина.

Обнаружение возбудителя

3-5 мл исследуемого материала засевают в 2 флакона с жидкими питательными средами (Китта-Тароцци, бульон Хоттингера, МПБ с 0,5 % глюкозы), залитыми сверху слоем вазелинового масла толщиной до 1 см. Перед посевом среды прогревают в кипящей водяной бане 20 мин. Один флакон с посевом прогревают при температуре 80°C 20 мин для освобождения от сопутствующей микрофлоры. Инкубируют посеvy при температуре 35-37°C. Через 4 часа посеvy исследуют на наличие клостридий ботулизма в мазках, окрашенных по Граму. При обнаружении грамположительных палочек, сходных по морфологии с *C.botulinum*, с культуральной жидкостью ставят реакцию нейтрализации токсина с поливалентной сывороткой АВСЕ. При получении положительного результата реакцию нейтрализации ставят с каждой сывороткой отдельно.

При обнаружении в исследуемом посеve грамположительных палочек, морфологически сходных с клостридиями ботулизма, а также ботулинического токсина в культуральной жидкости и исследуемом материале, дают заключение о зараженности исследуемого материала определенным типом возбудителя ботулизма. Дальнейшее исследование в данном случае не проводится.

Если через двое суток во флаконах не обнаружен рост бактерий, необходимо продолжить инкубацию в термостате, а исследование повторить на 4, 6 и 10 сут.

При отсутствии роста микроорганизмов на жидких питательных средах следует провести выделение чистой культуры клостридий ботулизма в высоком столбике агара или на чашках Петри с кровавым или печеночным агаром в термостате.

1. Выделение чистой культуры в столбике агара

Разлитый в пробирки по 15-18 мл 1% агар с 0,5% глюкозы, приготовленный на бульоне Мартена, Хоттингера, перед посевом расплавляют и охлаждают до температуры 45-50°C. Исследуемый материал набирают в капилляр пастеровской пипетки и последовательно переносят в 5-8 пробирок с агаром для получения отдельных колоний. Содержимое пробирок перемешивают путем перекачивания пробирок между ладонями. Посевы помещают в термостат при температуре 35-37°C на 48 часов. При появлении в посевах роста посторонней микрофлоры исследуемый материал прогревают при температуре 80°C 20 мин и повторяют посев.

Если через 48 часов в пробирках появляется рост комочков пушинок или правильных дисков (чечевичек) производят пересев колоний на одну из рекомендуемых жидких питательных сред под слоем вазелинового масла. После инкубации в термостате определяют наличие клостридий ботулизма и его токсина в культуральной жидкости.

2. Выделение чистой культуры на чашках Петри.

Исследуемый материал засевают на чашки Петри с кровавым или печеночным агаром и помещают в анаэроустат. Культивирование проводят при температуре 35-37°C 48 час. В посевах выявляют серовато-мутные колонии с зоной гемолиза на кровавом агаре. Из них готовят мазки, окрашивают по Граму и при выявлении грамположительных палочек, по морфологии сходных с клостридиями ботулизма, делают посев на МПБ с 0,5% глюкозы под слоем вазелинового масла. Инкубация посевов проводится при указанной температуре 1-2 сут. При появлении роста на жидкой питательной среде определяют наличие микроорганизмов в мазке, возможно изучение биохимических свойств и выявляют токсин в культуральной жидкости.

Выделение токсина

Часть пробы, исследуемой на наличие токсина, выдерживают 1-2 часа при комнатной температуре, а затем центрифугируют при 3 тыс. об 15 мин или фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

В пробирке смешивают 2,4 мл исследуемого материала или культуральной жидкости и 0,6 мл поливалентной сыворотки, в случае ее отсутствия – смесь типоспецифических противоботулинических сывороток типов А, В, С, Е. В одну пробирку вместо сыворотки добавляют 0,6 мл физиологического раствора. Пробирки выдерживают при комнатной температуре 30 минут, после чего содержимое каждой пробирки в объеме

1 мл внутривенно или внутривенно вводят 2 белым мышам. Наблюдение за животными ведут до 10 дней. В случае заболевания (учащенное дыхание, западание мышц живота, параличи, судороги) и гибели мышей, которым был введен исследуемый материал без сыворотки, сразу же ставят реакцию нейтрализации токсина антитоксином с типоспецифическими сыворотками А, В, С, Е для определения типа токсина.

В 5 пробирок наливают исследуемый материал по 2,4 мл в каждую, а затем в 4 из них добавляют по 0,6 мл одной из типовых противоботулинических сывороток, в 5-ю пробирку вместо сыворотки добавляют 0,6 мл физиологического раствора. Смесь выдерживают при комнатной температуре 30 мин и вводят по 1 мл из каждой пробирки двум белым мышам. Выживают те две мыши, у которых токсин был нейтрализован сывороткой соответствующего типа, остальные животные гибнут.

По результатам реакции делают заключение о типе выделенного токсина.

Если в посевах обнаруживаются бактерии, сходные с клостридиями ботулизма, а токсин выделить не удастся, следует произвести активацию культуральной жидкости панкреатином или трипсином для обнаружения токсина типа Е, который может находиться в исследуемом материале в виде протоксина, не токсичного для животных.

С этой целью 4 г панкреатина растворяют в 100 мл физиологического раствора и оставляют при температуре 4°C в течение двух недель. Перед употреблением жидкость фильтруют через бумажный фильтр Зейтца. Активность препарата предварительно следует проверить по отношению к музейному штамму *C. botulinum* типа Е.

4-5 суточную культуру делят на 2 части. Для активации пепсина одну часть центрифугируют при 3,5 тыс. об. 15 мин, сливают надсадок и к нему добавляют 0,5% трипсина или равное количество панкреатина. Смесь инкубируют 1 час при температуре 28-35°C. Затем активный и неактивный токсин титруют на мышах для определения минимальной летальной дозы и определяют индекс активации – отношение числа Д₀М в активированной культуральной жидкости к числу Д₀М неактивированной. Если индекс активации более 2, то культуральная жидкость содержит протоксин. Отрицательный результат указывает, что данный штамм не вырабатывает протоксина и не относится к типу Е.

Одновременно ставят реакцию нейтрализации с активированной культуральной жидкостью и противоботулинической жидкостью типа Е.

Для определения токсина в крови больных применяют метод Минервина, который основан на способности ботулинических токсинов типов А и В подавлять фагоцитарную активность лейкоцитов в связи с наличием у токсинов этих типов лейкотоксических свойств.

В 5 пробирок наливают 0,1 мл крови больного и смешивают с 0,3 мл цитратной крови человека или морской свинки (кровь кролика использовать не рекомендуется).

В одну пробирку добавляется 0,1 мл физиологического раствора, в остальные такое же количество типоспецифических противоботулинических сывороток типов А, В, С, Е. Пробирки выдерживают в термостате при температуре 35-37°C 30 мин. В каждую добавляют 0,1 мл 1 млрд взвеси *S. aureus*. Инкубируют в термостате 20 мин. Из содержимого пробирок готовят мазки, высушивают, фиксируют смесью Никифорова 15 мин или метиловым спиртом 5-6 с и окрашивают по Романовскому-Гимзе 15-40 мин.

За фагоцитарный показатель принимают среднее количество стафилококков в одном лейкоците, для этого подсчитывается количество стафилококков в 50 лейкоцитах и полученное число делят на 50. Если в крови имеется ботулотоксин, то фагоцитарный показатель будет низким, за исключением показателя той пробирки, в которой тип токсина соответствует типу добавленной сыворотки.

Столбняк - острое инфекционное заболевание, характеризующееся поражением двигательных клеток центральной нервной системы и развитием тонических судорог поперечнополосатых мышц.

Возбудитель столбняка *Clostridium tetani* относится к семейству *Bacillaceae*.

Морфология и тинкториальные свойства.

Возбудитель столбняка – палочки размером 2,4-8,9x0,5-1,1 мкм, с закругленными концами. Подвижны. Образуют круглую, терминально расположенную спору, диаметр которой превышает поперечник клетки. Грамположительны, но в старых культурах могут быть грамотрицательными.

Биологические свойства

Строгие анаэробы. Хорошо растут в жидких питательных средах при pH 6,8-7,0, содержащих редуцирующие вещества: бульон Вейнберга, среда Китта-Тароцци. Перед посевом среды кипятят для удаления кислорода и заливают слоем вазелинового масла. Для культивирования *C. tetani* на плотных питательных средах – кровяном агаре Цейслера - нужно применять анаэробостаты.

Колонии возбудителя столбняка нежные прозрачные или сероватые с ровной поверхностью и зоной гемолиза на кровяном агаре. На плотных питательных средах могут расти в виде тонких, едва заметных нитевидных отростков. Эту способность микроорганизма можно применять для выделения чистой культуры.

В высоком столбике агара через 1-2 сут вырастают плотные колонии в виде чечевичек, зерен (R-формы) или же пушинок с плотным центром (S-формы).

В столбике желатина растут в виде елочки, при это желатин разжижается.

Среда Китта-Тароцци: печень или мясо заливают питательным бульоном и кипятят. Бульон фильтруют. По 3-4 г печени распределяют по пробиркам и заливают бульоном.

Бульон Вейнберга: мясную воду из сердца быка с пептоном разливают в пробирки и заливают кусочки вареной печени.

Кровяной агар: МПА, глюкоза, свежая дефибринированная кровь человека.

Столбнячная палочка обладает протеолитическими и сахаролитическими свойствами. Разжижает желатин, медленно свертывает молоко с образованием мелких колоний. Синтезирует ферменты типа протеаз, фибринолизин.

C.tetani имеет O и H антигены. По H-антигену дифференцируют 10 сероваров, продуцирующих идентичный по антигенным свойствам экзотоксин, состоящий из двух фракций: тетаноспазмина и тетанолизина. Тетаноспазмин поражает клетки нервной ткани и вызывает тоническое сокращение поперечно-полосатой мускулатуры. Тетанолизин разрушает эритроциты.

Эпидемиология и патогенез

Входные ворота – поврежденные кожные покровы, слизистые оболочки. Попавшие в рану споры прорастают в вегетативные клетки, размножаются, выделяют экзотоксин и ферменты. Токсин продвигается по двигательным волокнам периферических нервов и гематогенным путем достигает центральной нервной системы, вызывает ее поражение. Заболевание начинается остро с тонического сокращения жевательных мышц, затем развиваются судороги мимических мышц лица. Ригидность распространяется на мышцы шеи, спины, живота, конечностей.

Исследование на присутствие *Clostridium tetani* производят:

1. для подтверждения клинического диагноза.
2. для проверки стерильности перевязочного материала, кетгута.
3. для выяснения эпидемиологических данных в местах с высокой заболеваемостью столбняком.

Взятие исследуемого материала

Для подтверждения клинического диагноза материал берут от больного и от трупа.

Наиболее перспективным является исследование материала, взятого из мест ранения: гной, кусочки ткани вокруг предполагаемых ворот инфекции, перевязочный материал, тампоны, закладываемые в рану при перевязке, обрывки одежды. У новорожденных берут выделения из пупка. При столбняке у женщин после родов или аборта исследуют выделения из влагалища, матки. В тех случаях, когда входные ворота неизвестны, необходимо тщательно осмотреть больного для выявления царапин, ссадин, воспалительных процессов, старых, длительно не заживающих ран или рубцов, в которых могут длительное время находиться *S. tetani*.

1. От трупа берут 5-10 мл крови, кусочки печени и селезенки, весом 20-30 г.
2. Перевязочный материал, кетгут, вату, марлю по 5-10 г берут из разных мест бикса (в глубине и с поверхности), помещают в стерильные флаконы.
3. Пробы почвы в количестве 25-30 г. берут в стерильные банки с огородов, рынков дворов и т.д. Слой почвы, глубиной до 20 см берут шпателем, совком, предварительно обработанным спиртом.
4. Материал для исследования помещают в стерильную посуду и немедленно после взятия отправляют в лабораторию. Если это невозможно, то его сохраняют во льду.

Микробиологическая диагностика

1. Исследование для подтверждения клинического диагноза.

Собранный для исследования материал от больного, трупа (кроме жидкого) растирают в стерильной ступке со стерильным кварцевым песком, добавляют двойной объем физиологического раствора и оставляют в ступке при комнатной температуре на 1 час

Тампоны, перевязочный материал, лоскуты одежды заливают стерильным физиологическим раствором и оставляют при комнатной температуре на 1 час

Полученные экстракты, исследуемый материал исследуют микроскопически. Наличие грамположительных бацилл заставляет настойчиво искать подтверждение бактериологическим методом.

Экстракт, жидкий исследуемый материал исследуют на наличие столбнячной палочки и столбнячного токсина.

А.) Обнаружение столбнячной палочки.

Посев материала производят в два флакона и две пробирки с одной из рекомендуемых питательных сред (бульон Мартена, бульон Вейнберга, среда Китта-Тароцци) под слоем вазелинового масла. Перед посевом из среды удаляют кислород кипячением в течение 15 мин, охлаждают до температуры 40-50° С и в нее добавляют 0,5% стерильной глюкозы.

После посева 1 флакон или пробирку прогревают на водяной бане при температуре 80°С в течение 20 мин с целью подавления или уничтожения посторонней микрофлоры, имеющейся в материале больного.

Посевы помещают в термостат при температуре 37°С на 10 дней. На 2, 4, 6, 10 сутки культивирования из посевов делают мазки и выделяют грамположительные палочки с круглыми терминально расположенными спорами.

Культуральную жидкость исследуют на наличие токсина.

Б.) Обнаружение столбнячного токсина.

Экстракт исследуемого материала фильтруют через ватно-марлевый или бумажный фильтр (тальковый фильтр использовать нельзя, т.к. он адсорбирует на себе токсин).

К 1 мл фильтрата или культуральной жидкости добавляют 0,5 мл противостолбнячной сыворотки, содержащей 200АЕ. Для контроля такое же количество исследуемого материала смешивают с 0,5 мл нормальной сыворотки. Смеси выдерживают

40 мин при комнатной температуре и в количестве 0,75 мл вводят внутримышечно в бедро задней лапки двум опытным и двум контрольным мышам. Если исследование проводится на морских свинках, то количество вводимого материала увеличивается до 1,5-3 мл. За животными наблюдают 4-5 дней.

В зависимости от количества токсина симптомы у животных, получивших исследуемый материал и нормальную сыворотку, развиваются на 1 или 2 сут после введения препарата. Первыми признаками столбняка у мышей является взъерошивание шерсти, ригидность хвоста, задних конечностей. Звуковой раздражитель, (например, постукивание по клетке) вызывает напряжение хвоста, в результате чего он поднимается вверх (столбняк I степени). Затем наступает паралич конечности, в которую вводился материал (столбняк II степени). Следующими параличу подвергаются конечности и часть мышц тела (III степень). IV степень столбняка характеризуется параличом всех мышц конечностей, искривлением позвоночника.

У животных, получивших токсин с противостолбнячной сывороткой, симптомы столбняка отсутствуют. Это доказывает, что в исследуемом материале имеется столбнячный токсин.

При обнаружении в посевах грамположительных палочек с круглыми терминально расположенными спорами и столбнячного токсина делают заключение о наличии в исследуемом материале возбудителя столбняка.

Если в посевах столбнячный токсин не обнаружен, а при микроскопии определяют грамположительные палочки сходные с возбудителем столбняка, культуральную жидкость засевают на плотные питательные среды (Цейслера, печеночный агар). Посевы помещают в анаэроустат и культивируют при температуре 35°C. Для создания строгих анаэробных условий на дно анаэроустата помещают чашку Петри с 10% щелочным раствором пирогалла.

Через 1-3 сут на чашках Петри появляются прозрачные колонии в виде капелек росы с зоной гемолиза. Колонии микроорганизма располагаются по поверхности среды и образуют прозрачную сетчатую пленку, плохо заметную невооруженным глазом, потому колонии рассматривают в лупу или под микроскопом.

При отсутствии анаэроустатов посев культуральной жидкости, прогретой на водяной бане при температуре 80°C в течение 20 мин, проводят в высокий столбик агара. Чтобы получить рост отдельных колоний посев производят запаянной пастеровской пипеткой, смоченной в посевной жидкости, а затем ее последовательно переносят в 2-3 пробирки с расплавленным и охлажденным до температуры 45° агаром. Пробирки с посевом опускают в сосуд с холодной водой для быстрого застывания. Культивируют при температуре 35°C. Через 1-2 сут в агаре появляются плотные колонии в виде чечевичек или пушинок.

Из колоний, выросших на среде Цейслера или в высоком столбике агара, готовят мазки и микроскопируют. В случае выявления бактерий, морфологически сходных с клостридиями столбняка, колонии высевают в одну из рекомендуемых жидких питательных сред. Инкубируют в термостате и испытывают на способность вырабатывать токсин.

Выявление токсина в повторных посевах является достаточным основанием для заключения о наличии возбудителя в исследуемом материале.

Исследование перевязочного материала

Каждый образец помещают в два флакона с предварительно прокипяченной питательной средой под слоем вазелинового масла (среда Китта-Тароцци, бульон Вейнберга). Один флакон прогревают при температуре 80°C 20 мин. Культивирование флаконов с посевами проводят при температуре 35°C 10-15 сут. При наличии роста из посевов делают мазки для выявления грамположительных палочек с терминально расположенными спорами и выявляют способность культуры вырабатывать токсин.

Положительное заключение выдается только в случае обнаружения токсина.

Исследование почвы.

В лаборатории образец почвы перемешивают, берут 3-5 г, растирают в ступке и добавляют 6-8 мл стерильного физиологического раствора, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 3-4 часа. Полученный экстракт делят на 2 части: одну прогревают при температуре 80°C 20 мин. Обе части экстракта засевают в 2 флакона с одной из рекомендуемых питательных сред под слоем вазелинового масла. Инкубируют посеы при температуре 35°C. Через 2, 4, 6, 10 дней выращивания в термостате готовят мазки и в случае обнаружения бактерий, похожих на столбнячную палочку, выявляют способность вырабатывать токсин.

Дифтерия

Характеристика возбудителя дифтерийной инфекции

Дифтерия - острое инфекционное заболевание, характеризующееся воспалительным процессом слизистых оболочек ротоглотки, верхних дыхательных путей, реже других органов с образованием фибриновых налетов и интоксикацией. Возбудителем дифтерийной инфекции являются токсигенные *Corynebacterium diphtheriae*. Нетоксигенные коринебактерии дифтерии не вызывают дифтерийную инфекцию. "Этиологическая" значимость этих микроорганизмов при неинфекционной патологии (фарингит, артрит, эндокардит и др.) требует специальных доказательств. При выделении нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* от больных с подозрением на дифтерийную инфекцию следует обратить внимание на правильность проведения бактериологического исследования и оценку токсигенных свойств.

В основе способности *C. diphtheriae* вырабатывать экзотоксин лежит феномен фаговой (или лизогенной) конверсии. Конверсия нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* в токсигенные и наоборот воспроизводится только в особых, экспериментальных условиях. В тех случаях, когда при первичном посеве исследуемого материала от больных дифтерией выделяют токсигенные, а при повторных обследованиях после лечения антибиотиками - нетоксигенные коринебактерии дифтерии, можно предположить, что при использовании антибиотиков в первую очередь исчезают токсигенные штаммы, как более чувствительные к их действию, а нетоксигенные штаммы продолжают выделяться. Такое же положение может создаваться и при санации антибиотиками бактерионосителей, одновременно выделяющих токсигенные и нетоксигенные коринебактерии дифтерии. Обнаружение у таких носителей при повторных обследованиях только нетоксигенных штаммов нельзя трактовать, как утрату способности штаммов продуцировать экзотоксин.

Таксономически близкими виду *C. diphtheriae* являются *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis (C. ovis)*. Данные микроорганизмы - природные патогены крупного и мелкого рогатого скота, лошадей. Отмечена способность этих видов бактерий вырабатывать токсин, подобный дифтерийному. Встречаются и "нетоксигенные" штаммы. Известны случаи выделения "токсигенных" *C. ulcerans* при клинической картине заболевания, сходной с дифтерией.

На слизистых оболочках ротоглотки и носа в норме часто встречается ложнодифтерийная палочка Гофмана (*C. pseudodiphtheriticum*). Умение выделять и идентифицировать данные бактерии служит критерием оценки качества работы бактериологов в межэпидемический период.

Морфологические и тинкториальные свойства

Возбудитель дифтерии представляет собой тонкие, слегка изогнутые или прямые полиморфные палочки размером 1-12x0,3-0,8 мкм с зернами волютина на концах,

грамположительны. Спор и капсул не образуют, на поверхности имеют фимбрии, облегчающие адгезию к эпителию слизистой оболочки.

Для *C.diphtheriae* характерен значительный полиморфизм - разнообразие размеров и формы клеток. Клетки имеют форму булавы, ракетки, овоида и т.д. Взаиморасположение клеток напоминает римские цифры X, V. При окраске часто обнаруживается выраженная внутриклеточная исчерченность, что объясняется наличием зерен волютина. Описано сродство волютина к метиленовому синему и, при обработке этим красителем, гранулы или полоски (скопления гранул) прокрашиваются в синий цвет, а протоплазма в отдельных случаях может приобрести розовый оттенок. Использование в бактериологической практике окраски по Граму является нецелесообразным, поскольку клетки *C.diphtheriae* легко обесцвечиваются спиртом и могут выглядеть в мазке грамвариабельными или даже грамотрицательными.

Для *C.ulcerans* и *C.pseudodiphtheriticum* характерна склонность к параллельному расположению клеток. 24 - 48-часовые культуры этих видов имеют чаще всего овоидную форму клеток.

Для окраски мазков обычно применяют щелочной метиленовый синий по Леффлеру, ацетат толуидинового синего, кристаллический фиолетовый, метод Нейссера.

Биологические свойства

Коринебактерии дифтерии – факультативные анаэробы, хорошо растут при температуре 36-37°C, pH 7,4-8,0. Они не размножаются на простых питательных средах, так как для своего роста требуют наличия почти всех аминокислот, солей кальция, магния, железа, цинка. Этим потребностям удовлетворяют питательные среды с добавлением крови или сывороток. Для подавления роста сопутствующей микрофлоры к среде добавляют теллурит (калия или натрия), не оказывающий влияние на рост дифтерийных бактерий. Обычно колонии микроорганизмов из рода коринебактерий на плотных питательных средах (например, на кровяном агаре) имеют серовато - белую или желтоватую окраску, непрозрачные или полупрозрачные, округлой формы, диаметром 1 - 3 мм. Чаще всего они бывают мягкой, маслянистой консистенции, хотя некоторые виды рода коринебактерии могут образовывать шероховатые R-колонии.

C.diphtheriae растут при 37° C, устойчивы к низкой температуре, чувствительны к высокой. Все дезинфицирующие вещества в обычных концентрациях (3 - 5%) уничтожают коринебактерии дифтерии в течение 20 - 30 минут. Токсигенные *C.diphtheriae* более чувствительны к антибиотикам, чем нетоксигенные. Возможно появление устойчивых к антибиотикам штаммов. Широко определять чувствительность к антибиотикам штаммов, выделенных от бактерионосителей, не следует из-за несоответствия результатов лабораторной пробы с действием антибиотиков на возбудителя дифтерии в организме человека.

Коринебактерии дифтерии – биохимически активные микроорганизмы. Они сбраживают с образованием кислоты глюкозу, мальтозу, галактозу, декстрин, способность разлагать крахмал и гликоген варьирует у различных штаммов. Восстанавливают нитраты в нитриты, продуцируют цистиназу, каталазу, гиалуронидазу, нейраминидазу, но не образуют индол, уреазу, желатиназу. Различные биовары существенно различаются по культуральным и биохимическим свойствам .

Возбудитель дифтерии продуцирует экзотоксин – термолабильный, высокотоксичный, иммуногенный белок, состоящий из фрагментов – А и В. В кислотной среде фаголизосом дисульфитные связи, объединяющие оба компонента, разрушаются, фрагмент В взаимодействует с мембраной фаголизосомы, облегчая проникновение фрагмента А в цитоплазму клетки хозяина. Токсин ингибирует белковый синтез, приводя к структурным и функциональным нарушениям чувствительных к нему клеток почек, надпочечников, миокарда, нервной системы. Способность к токсинообразованию проявляют только лизогенные штаммы, инфицированные бактериофагом, несущий ген

tox. Токсин теряет активность и переходит в анатоксин при добавлении формалина (0,3-0,4%) и выдерживании при температуре 40°C в течение 4 недель.

Антигенная структура дифтерийных коринебактерий представлена термостабильным полисахаридным O-антигеном и термолабильным белковым K-антигеном, обладающим выраженной иммуногенностью и видовой специфичностью. По K-антигенам дифтерийные бактерии разделяют на серологические варианты (58): биовар *gravis* включает 14 сероваров, *mitis*- 40, *intermedius* —4. Токсигенные *C.diphtheriae* более чувствительны к антибиотикам, чем нетоксигенные. Возможно появление устойчивых к антибиотикам штаммов. Широко определять чувствительность к антибиотикам штаммов, выделенных от бактерионосителей, не следует из-за несоответствия результатов лабораторной пробы с действием антибиотиков на возбудителя дифтерии в организме человека. По форме колоний и некоторым биохимическим свойствам

C.diphtheriae подразделяют на культурально - биохимические варианты - *gravis*, *mitis*, *intermedius*. Через 48 - 72 часа роста вариант *mitis* образует колонии S-типа - гладкие, диаметром 1 - 2 мм; S-R-колонии варианта *gravis* обычно выпуклые, с приподнятым центром, диаметром 2 - 3 мм; колонии варианта *intermedius* - S-типа, мелкие, плоские, гладкие, с ровным краем, диаметром 0,5 - 1 мм. Далее описываются только два культурально - биохимических варианта - *gravis* и *mitis*, так как биовар *intermedius* встречается редко и по биохимическим свойствам не отличается от биовара *mitis*.

На кровяных теллуритовых средах через 48 час роста колонии *C.diphtheriae* варианта *gravis*, как и колонии *C.ulcerans*, черные, матовые имеют радиальную исчерченность. Колонии

C.pseudodiphtheriticum имеют характерный светлый ободок. В бактериологической практике опираться только на морфологические свойства колоний или микробной клетки, при идентификации *C.diphtheriae*, не представляется возможным. Описаны случаи бактериологической гипо- и гипердиагностики (в 55% и 14,5% случаев соответственно), когда используется учет только морфологических признаков. При идентификации *C.diphtheriae* необходимо использовать комплекс тестов, в первую очередь, определение патогенности (токсигенности), основного признака возбудителя дифтерии.

Определение токсигенных свойств проводится бактериологами в первые сутки роста подозрительных колоний на чашках первичного посева материала. Во избежание ошибок при определении токсигенных свойств коринебактерий, необходимо изучать данный признак у максимального числа выросших колоний с чашек первичного посева. При соблюдении описанных ниже методик можно изучить токсигенность более чем у 20 подозрительных колоний из одного анализа. Нельзя изучать материал при множественном росте подозрительных колоний только в одной - двух бляшках.

Ферментативная активность микроорганизмов изучается путем определения ферментов цистиназы, уреазы, способности расщеплять до кислоты глюкозу, сахарозу, крахмал. В редких случаях, когда необходимо идентифицировать *C.ulcerans*, добавляется тест на восстановление нитратов в нитриты.

Учитывая, что при идентификации возбудителя дифтерийной инфекции ведущим элементом является определение наличия токсина, оценки других свойств имеет вспомогательное значение. Использование "длинного" углеводного ряда является излишним при идентификация *C.diphtheriae*. Практическим бактериологам, занимающимся лабораторной диагностикой дифтерии, не требуется проводить идентификацию до вида других микроорганизмов рода *Corynebacterium*. В то же время, в лабораториях, где проводится диагностика заболеваний, вызываемых "недифтерийными" коринебактериями, недостаточно использования

даже "длинного" углеводного ряда. Для точной идентификации данных микроорганизмов необходимо использовать хемотаксономические методы исследования, например, такие, как определение наличия миколовых кислот в составе клеточной стенки бактерий и некоторые другие.

Таблица 20

Сравнительная характеристика биоваров коринебактерий дифтерии

Свойства	Биовар		
	gravis	mitis	intermedius
Ферментация:			
Глюкоза	+	+	+
Сахароза	±	-	-
Крахмал	+	-	-
Гликоген	+	-	-
Мальтоза	+	+	+
Цистианаза	+	+	+
Восстановление нитратов	+	+	+
Уреаза	-	-	-
Рост на средах с теллуридом	Крупные, серо-черные колонии с радиальной исчерченностью и неровными краями (маргаритки)	Мелкие, гладкие, блестящие, черные колонии с ровными краями	Мелкие, серо-черные колонии с поднятым центром и неровными краями
Рост на бульоне	Пленка, помутнение, осадок	Равномерное помутнение, осадок	Помутнение с последующим просветлением, осадок
Гемолиз на кровяном агаре	±	+	-

Таблица 21

Биологические свойства некоторых видов коринебактерий

Вид коринебактерий	Токсигенные свойства	Разложение					Ред. нитратов
		цистина	глюкозы	сахарозы	крахмала	мочевины	
<i>C. diphtheriae</i> вариант gravis	+ (-)	+	+	-	+	-	+
вариант mitis	+ (-)	+	+	-	-	-	+
<i>C. ulcerans</i>	+ (-)	+	+	-	+	+	-
<i>C. pseudo-tuberculosis</i>	+ (-)	+	+	-	-	+	- (очень редко +)

(C.овис)							
C.pseudo-diphtheriticum (C.hofmani)	-	-	-	-	-	+	+(очень редко -)

Примечания в тексте

Таким образом, выделенный микроорганизм является возбудителем дифтерии, если он обладает токсигенными свойствами, определенным спектром ферментативной активности (расщепление глюкозы, крахмала, отсутствие разложения сахарозы, наличие фермента цистиназы, отсутствие фермента уреазы) и характерными морфолого - культуральными признаками (образование колоний черного или серого цвета на кровяно - теллуритовых средах, с учетом, при необходимости, морфологии клеток - полиморфные, не образующие спор палочки).

Эпидемиология и патогенез

Резервуар инфекции – человек (больной, бактерионоситель), наибольшую эпидемическую опасность представляют больные люди. Основной механизм передачи возбудителя дифтерии воздушно-капельный, возможно заражение через предметы, используемые больными, и инфицированные пищевые продукты. Выделяясь в окружающую среду со слюной, пленками, дифтерийные палочки сохраняют жизнеспособность в течение нескольких дней на посуде, игрушках, других предметах. Эти микроорганизмы хорошо переносят высушивание – в пыли могут сохраняться несколько недель. К дезинфицирующим растворам чувствительны: 3% раствор хлорамина и 5% раствор фенола инактивируют бактерии в течение 5-10 минут.

На месте внедрения возбудителя (ротоглотка, гортань, трахея, нос, реже – ухо, половые органы девочек, конъюнктивы глаза, кожа) развивается местный воспалительный процесс, характер которого зависит от строения слизистых оболочек: в однослойном цилиндрическом эпителии дыхательных путей формируется крупозное воспаление, некрозу подвергается лишь эпителиальный слой, и образующаяся пленка прочно связана с подлежащей тканью; на многослойном плоском эпителии ротоглотки развивается дифтеритическое воспаление и образуется плотная желто-серая фибринозная пленка, плотно спаянная с подлежащей тканью, при удалении ее обнажается эрозированная поверхность

Размножающиеся коринебактерии дифтерии выделяют экзотоксин, который играет ведущую роль в развитии клинических проявлений дифтерии: интоксикация, поражение сердечно-сосудистой системы, нервной системы, почек и надпочечников. Особенно характерны поражения миокарда и проводящей системы сердца с возможным развитием паралича сердечной мышцы.

Микробиологическая диагностика

Бактериологическое исследование проводят с целью лабораторной диагностики дифтерийной инфекции, выявления источников инфекции и наблюдения за распространенностью токсигенных коринебактерии дифтерии.

Взятие и доставка материала

1. Успех бактериологического исследования в значительной степени зависит от своевременного и правильного взятия материала.

2. Взятие материала должны производить специально обученные медицинские работники лечебно - профилактических учреждений.

3. При исследовании на дифтерию обследуют ротоглотку и нос. При дифтерии редких локализаций (глаз, ухо, рана, кожа, влагалище) помимо пораженных участков, следует брать материал также с миндалин и из носа.

4. Взятие материала осуществляют с помощью стерильных ватных сухих тампонов. Для их приготовления используют деревянные или металлические (из нержавеющей металла) палочки, на один из концов которых плотно накручивается слой гигроскопической ваты (примерно 120 мг ваты на тампон). Тампоны должны иметь форму "капли", а не "веретена". Тампоны монтируют в пробирки с корковыми или ватными пробками так, чтобы конец тампона не касался дна и стенок пробирки. Стерилизуют тампоны в сухожаровом шкафу при температуре 140⁰ С в течение часа или в автоклаве при 0,5 атм. 30 мин.

5. Материал из ротоглотки и носа берут отдельными тампонами, натошак или не ранее, чем через два часа после еды, при хорошем освещении, с использованием шпателя, не касаясь тампоном языка и внутренних поверхностей щек и зубов. Одним тампоном собирают материал с пораженных участков ротоглотки - миндалин, а при необходимости - с дужек мягкого неба, небного язычка или задней стенки глотки. При наличии налетов, материал следует брать с границы пораженных и здоровых тканей, слегка нажимая на них тампоном. Для взятия материала из носа используют другой тампон, который вводят сначала в один, а потом в другой носовой ход, не касаясь крыльев носа снаружи.

6. При ларингоскопии материал (слизь, пленка) собирают непосредственно из гортани. Материал с пораженных участков кожи следует собирать сухим тампоном после удаления корочек или струпа.

7. Тампоны должны быть доставлены в лабораторию не позднее 3-х часов с момента взятия материала. При проведении обследования контингентов в отдаленных от бактериологических лабораторий районах, рекомендуется засеивать материал на чашки с питательной средой или использовать транспортную среду.

8. В случае использования транспортной среды материал собирают сухим тампоном, опускают в пробирку со средой и следят за тем, чтобы пробка тампона не намокла. Следует учитывать, что применение транспортной среды увеличивает срок выдачи окончательного ответа на одни сутки.

9. Чашки (или пробирки с транспортной средой) с посевом исследуемого материала можно поместить для подращивания в термостат при 37⁰С на 15 - 18 часов, после чего доставить в лабораторию.

10. При транспортировке на дальние расстояния также можно использовать тампоны, предварительно пропитанные раствором глицерина. Тампон пропитывают 5-процентным раствором глицерина в дистиллированной воде, отжимают о стенки сосуда с раствором, укрепляют в пробирке так же, как сухой тампон и автоклавируют при 0,5 атм. в течение 30 мин.

11. Холодное время года исследуемый материал доставляют в баклабораторию в сумках - термосах, во избежание его замерзания.

12. В случае необходимости проведения постмортальных исследований на коринебактерии дифтерии, материал целесообразно брать с миндалин, гортани и полости носа, поскольку во внутренних органах возбудитель обнаруживается редко.

13. Каждой пробирке с исследуемым материалом (зев, нос или другая локализация) придается номер. В прилагаемом списке указывается номер пробирки, фамилия, имя (или инициалы), возраст, название учреждения, направляющего материал, или домашний адрес обследуемого, цель обследования (диагностическая с указанием диагноза, по эпидпоказаниям, профилактическое обследование), дата и время взятия материала.

Ход исследования

1 день исследования - посев материала.

Материал для исследования из ротоглотки, носа или других пораженных мест засевают раздельно на поверхность одной из рекомендуемых плотных питательных сред, разлитых в чашки Петри.

Посев от одного лица производят на одну чашку, используя при этом половину поверхности среды для посева материала из ротоглотки, а вторую - для посева материала из носа. При посеве материала с кожи или других мест добавляют еще одну чашку. Не допускается посев материала от нескольких лиц на одну чашку.

При посеве материал втирают в среду со всех сторон тампона на участке площадью $2 \times 1 \text{ см}^2$ - формирование такой "площадки" является обязательным. Затем этим же тампоном засевают оставшуюся поверхность 1/2 чашки. Посев производят частыми перекрывающимися штрихами, не отрывая тампон от поверхности питательной среды и не изменяя положения тампона. Такой метод посева позволяет засеять весь материал с тампона, получить изолированные колонии (чистую культуру) для дальнейшей идентификации непосредственно на чашке первичного посева, что сокращает длительность анализа на одни сутки. Засеянные чашки или пробирки с транспортной средой помещают в термостат при 37°C . Высев из транспортной среды производят на следующие сутки на плотную питательную среду тампоном, отжатым о стенки пробирки, или петлей, забирая материал из осадка.

Посев следует производить на чашки со средой, согретые при комнатной температуре или в термостате (15 - 20 минут).

2 день исследования

1. Колонии, выросшие на чашках, просматривают через 24 часа, после посева материала (если материал заседали во второй половине дня, то просмотр осуществляется ровно через 24 часа, т.е. тоже во второй половине дня) визуальнo или с помощью микроскопа бинокулярного стереоскопического (МБС).

2. Чашки с колониями, похожими на дифтерийные, отбирают для дальнейшей идентификации культуры по всем тестам. Микроскопии препаратов - мазков из "подозрительных" колоний можно не проводить. "Подозрительные" колонии на кровяно - теллуритовых средах через 24 часа роста светло - серого цвета, выпуклые, с ровными краями, через 48 часов - серые с металлическим оттенком, с ровными или слегка изрезанными краями, крошащиеся при прикосновении петлей или мягкой консистенции. Из "сомнительных" колоний готовят препараты - мазки.

Клетки коринебактерий дифтерии из культуры, выросшей на средах с ингибиторами роста (теллурит калия, хинозол) могут быть укорочены, утолщены, однако присущее им расположение и полиморфизм сохраняются. Оценка морфологических признаков не позволяет установить видовую принадлежность микроорганизма, но дает возможность предположительно отнести его к роду коринебактерий.

Если при микроскопии обнаруживают палочки, характерные для рода коринебактерий, то эти колонии отбирают для дальнейшей идентификации по всем тестам. В случае обнаружения других форм микроорганизмов (кокков, дрожжей, споровых палочек), дальнейшее изучение этих колоний прекращается.

3. В случае роста "подозрительных" однотипных колоний, необходимо сразу же приступить к изучению их токсигенных свойств. Токсигенные свойства изучают не менее чем у 2 изолированных колоний путем посева одной половины каждой колонии на среду для определения токсигенности и, необожженной петлей, - на среду Пизу, а другой половины колонии - в пробирку со скошенным сывороточным агаром для сохранения и накопления культуры. При невозможности снять 1/2 колонии для посева на токсигенность и на среду Пизу используется материал целой колонии; посев на скошенный агар исключается и, в дальнейшем, используется культура из пробирки с

пробой Пизу. Учитывая, что через 24 часа роста колонии имеют небольшие размеры и материала 1/2 или 1 колонии может быть недостаточно для накопления дифтерийного токсина в пробе на токсигенность, а также то, что в исследуемом материале могут находиться одновременно токсигенные и нетоксигенные разновидности коринебактерий дифтерии, крайне важно изучить токсигенные свойства, по возможности, у максимального числа выросших колоний (20 и более), смешивая по 5 - 7 однотипных колоний в одну бляшку.

4. При невозможности постановки пробы на токсигенность классическим способом из-за недостаточной величины колоний, их изучают, смешивая однотипные колонии в нескольких бляшках. Не прожигая петли, производят посев в среду Пизу. Чашки с первичным посевом исследуемого материала вновь помещают в термостат на 24 часа и просматривают их повторно (на третьи сутки).

5. Если вырастает только одна колония, ее можно засеять на среду для определения токсигенности и, не обжигая петли, в столбик среды Пизу для определения цистиназы. Для дальнейшей идентификации можно использовать культуру из пробирки с пробой Пизу или с бляшки через 48 часов роста, или через 24 часа роста при выявленных токсигенных свойствах культуры.

6. С целью выдачи предварительного ответа, в случае множественного роста подозрительных колоний, можно произвести посев нескольких колоний на жидкую питательную среду для постановки РНГА, пополнить дополнительную пробу Заксе (3 - 5 однотипных колоний, учет через 30 мин. инкубации) и пробу Пизу (5 - 6 однотипных колоний, учет через 3 часа инкубации). При характерной для коринебактерий дифтерии морфологии колоний в МБС, морфологии клеток при микроскопии, отрицательной пробе Заксе, положительных результатах пробы Пизу, РНГА, можно выдать предварительный ответ об обнаружении культуры, подозрительной на коринебактерии дифтерии через 48 часов (на третьи сутки) с момента первичного посева исследуемого материала.

3 день исследования

1. Через 24 часа, при появлении специфических линий преципитации на среде для определения токсигенности, положительной пробе на цистиназу, изучаемую культуру идентифицируют как коринебактерий дифтерии токсигенные и выдают документированный ответ. При отсутствии специфических линий преципитации на среде для определения токсигенности, чашки инкубируют еще 24 часа.

2. Культуру, выросшую на скошенном сывороточном агаре или с пробы Пизу (после оценки ее чистоты), засевают на среды для определения биохимического варианта (сахароза, глюкоза, крахмал) и фермента уреазы (гидролиз мочевины).

3. Чашки с первичным посевом исследуемого материала просматривают визуально или с помощью МБС повторно через 36 - 48 часов инкубации в термостате. При наличии "подозрительных" колоний изучают их токсигенные свойства, цистиназную активность и выделяют чистую культуру на скошенный сывороточный агар (см. второй день исследования, п. 3).

При отсутствии колоний, подозрительных на коринебактерии дифтерии, выдают окончательный ответ, что коринебактерии дифтерии не выявлены. При отсутствии роста на чашках первичного посева через 48 часов инкубации, в ряде случаев требуется повторное взятие и исследование материала. Полное отсутствие роста чаще всего свидетельствует о нарушении правил бактериологического обследования (взятия, доставки, посева и культивирования исследуемого материала).

4 - 5 день исследования

1. При появлении специфических линий преципитации на среде для определения токсигенности (через 24 часа инкубации пробы на токсигенность 48-часового роста

первичного посева), положительной пробе на цистиназу выдают документированный ответ о выделении токсигенных коринебактерий дифтерии.

2. Культуру, выросшую на скошенном сывороточном агаре или с пробы Пизу, после определения ее чистоты, засевают на среды для изучения биохимических свойств (среды Гисса с сахарозой, глюкозой, крахмалом, проба Заксе или бульон с мочевиной).

3. Повторно (через 48 часов) учитывают результаты пробы на токсигенность, поставленной во 2 день исследования. Одновременно производят учет сахаролитических свойств и уреазной активности в пробах, поставленных в 3 день исследования. При отсутствии специфических линий преципитации через 48 часов после постановки пробы на токсигенность, но при положительных результатах проб на цистиназу, глюкозу, отрицательных результатах проб на уреазу и сахарозу, культуру идентифицируют как коринебактерии дифтерии нетоксигенные, с указанием биохимического варианта.

При выделении токсигенных коринебактерий дифтерии дополнительно выдают ответ о биохимических свойствах (через 72 или 96 часов с момента первичного посева исследуемого материала).

Бактериологическое заключение

1. Наличие специфических линий преципитации при определении токсигенных свойств, положительная проба на цистиназу, отрицательная проба на уреазу, характерные культуральные и биохимические свойства (сахароза, глюкоза, крахмал) позволяют заключить, что выделенная культура относится к виду коринебактерий дифтерии, токсигенная, биохимического варианта гравис или митис.

2. Отсутствие специфических линий преципитации при определении токсигенных свойств, положительная проба на цистиназу, отрицательная проба на уреазу, характерные культуральные и биохимические свойства позволяют заключить, что выделенная культура

относится к виду коринебактерий дифтерии, нетоксигенная, биохимического варианта гравис или митис.

3. При наличии линий преципитации, идентичных специфическим линиям контрольного штамма коринебактерий дифтерии, положительных проб на уреазу, цистиназу, ферментации глюкозы и крахмала, отсутствии ферментации сахарозы, отсутствии редукции нитратов в нитриты, культуру относят к виду коринебактерий ульцеранс, токсигенный вариант.

При отсутствии линий преципитации при определении токсигенных свойств и наличии всех других признаков, характерных для коринебактерий ульцеранс, нетоксигенный вариант, и бактериологический ответ считают отрицательным.

4. При выделении коринебактерий Гофмана или других дифтероидов, бактериологический ответ считают отрицательным.

5. В некоторых случаях, при диагностическом обследовании и по эпидпоказаниям, может быть выдан предварительный ответ. Это требует постановки дополнительных проб, наличия качественных питательных сред, тест - системы для постановки РНГА и специально обученного персонала. Предварительный ответ может быть выдан при наличии множественного роста однотипных "подозрительных" колоний на чашках первичного посева после 24 часов инкубации (см. второй день исследования).

Предварительный ответ может быть изменен после окончания бактериологического исследования.

6. Штаммы коринебактерий дифтерии с атипичными морфологическими, биохимическими, токсигенными свойствами и штаммы коринебактерий ульцеранс следует направлять в федеральную референс - лабораторию по диагностике дифтерийной инфекции при Московском НИИ эпидемиологии и микробиологии им Г.Н. Габричевского для дальнейшего изучения,

Схема бактериологического исследования

1 день исследования

Посев исследуемого материала на селективную дифференциально - диагностическую или, при необходимости, в транспортную среду. Инкубирование в термостате при 37⁰С.

2 день исследования (24 часа)

1. Изучение выросших колоний, при возможности - постановка пробы на токсигенность, цистиназу и посев культуры на скошенный сывороточный агар.

2. При использовании транспортной среды необходимо произвести пересев на селективную дифференциально - диагностическую среду.

3. При множественном росте, в случае необходимости, можно провести исследования для выдачи предварительного ответа - дополнительные пробы Пизу, Заксе и посев "подозрительных" колоний в жидкую питательную среду для выявления дифтерийного токсина в РНГА

3 день исследования (48 часов)

1. Учет результатов проб на токсигенность и на цистиназу, поставленных во второй день исследования. В случае наличия специфических линий преципитации и при положительной пробе Пизу выдают документированный ответ о выделении токсигенных коринебактерий дифтерии.

2. Посев чистой культуры, выделенной во второй день исследования, на среды Гисса для изучения биохимических свойств (сахароза, глюкоза, крахмал, мочевины).

3. Повторный просмотр (через 48 часов) чашек первичного посева визуально или с помощью МБС. Постановка проб на токсигенность, цистиназу и отсев колоний на скошенный сывороточный агар.

4. В случае использования транспортной среды, ход исследования см. начиная с п. 1 второго дня и далее по схеме.

5. Выдача бактериологического ответа об отсутствии коринебактерий дифтерии.

6. При постановке РНГА для выявления дифтерийного токсина, при наличии положительного результата в этой реакции и обнаружении у исследуемой культуры фермента цистиназы, отсутствии фермента уреазы, можно выдать предварительный ответ о выделении возбудителя дифтерии.

4 день исследования (72 часа)

1. Учет токсигенных свойств культуры, выделенной на 3 день исследования (через 48 часов роста первичного посева), и выдача документированного ответа о выделении токсигенных коринебактерий дифтерии. Посев выделенной культуры для определения биохимических свойств (сахароза, глюкоза, крахмал, мочевины).

2. Учет биохимических свойств культуры (токсигенной или нетоксигенной), выделенной во второй день исследования (через 24 часа инкубации первичного посева).

Выдача бактериологического ответа о выделении нетоксигенных коринебактерий дифтерии с указанием биохимического варианта и дополнительного ответа о биохимических свойствах токсигенных коринебактерий дифтерии, выделенных ранее.

5 день исследования (96 часов)

Выдача бактериологического ответа о выделении (через 48 часов инкубации первичного посева) токсигенных или нетоксигенных коринебактерий дифтерии с указанием биохимического варианта.

Методики идентификации возбудителя дифтерийной инфекции

Определение токсигенных свойств коринебактерий дифтерии с помощью реакции преципитации в геле

В основе метода определения токсигенности коринебактерий дифтерии (тест Элека) лежит процесс встречной иммунодиффузии токсина и антитоксических антител в плотной питательной среде. В местах оптимального количественного соотношения между токсином, продуцируемым коринебактериями, и антитоксином, нанесенным на фильтровальную бумагу, происходит их взаимодействие с образованием преципитата в виде белой линии или "усов".

Токсигенность коринебактерий дифтерии определяют, как правило, в чистой культуре (отдельные колонии или культура со скошенного агара, или с пробы Пизу). Смесь колоний или культуры, загрязненные посторонней микрофлорой, также могут быть испытаны на токсигенность. При отсутствии, в этом случае, преципитатов в агаровом геле, опыт следует повторить с выделенными чистыми культурами.

Для постановки пробы на токсигенность необходимо иметь:

- стерильные чашки Петри с ровным дном;
- питательную среду - агар Мартена или сухую коммерческую питательную среду;
- нормальную сыворотку крови крупного рогатого скота,
- стерильные полоски из фильтровальной бумаги размером 1,5 см x 8 см;
- очищенный ферментализом и специфической сорбцией дифтерийный антитоксин (в дальнейшем именуется антитоксин);
- противодифтерийную антитоксическую сыворотку лошадиную, лечебную (в дальнейшем именуется антитоксическая сыворотка), или готовые бумажные диски с нанесенным на них антитоксином;
- контрольный токсигенный штамм коринебактерий дифтерии 24 - 48-часового роста.

Приготовление чашек для постановки пробы на токсигенность

Питательный агар для определения токсигенности целесообразно разливать в пробирки по 10 мл (количество, необходимое для приготовления одной чашки). При большом объеме работы питательный агар разливают во флаконы по 70 - 80 мл (на 7 - 8 чашек пробы на токсигенность). Питательный агар следует расплавлять только 1 раз; многократное плавление ухудшает свойства среды. Питательный агар расплавляют в водяной бане при 90⁰С, тотчас же вынимают из бани, охлаждают до 50⁰С и добавляют 20% сыворотки крупного рогатого скота. Так, к 10 мл питательного агара добавляют 2 мл сыворотки крупного рогатого скота, перемешивают и выливают, соблюдая правила асептики, в стерильную чашку Петри, распределяют соседу по дну осторожным вращением чашки.

В центр чашки на поверхность застывающего агара обожженным пинцетом помещают полоску из фильтровальной бумаги, пропитанную антитоксином (или антитоксической сывороткой). Чашку подсушивают в термостате при 37⁰С в течение 15 - 20 мин., повернув ее вверх дном. При использовании бумажных индикаторных дисков, чашку с питательным агаром подсушивают до нанесения дисков на поверхность среды.

Чашки со средой для определения токсигенности хранить не рекомендуется.

Приготовление бумажных полосок

Полоски фильтровальной бумаги нарезают размером 1,5 см x 8 см, заворачивают по 2 - 4 штуки в пакетик и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм в течение 30 мин. Пакетики с бумажными полосками хранят в стерильной чашке Петри до 3 недель.

Перед постановкой пробы на токсигенность содержимое ампулы с антитоксином растворяют в 1 мл стерильного физиологического раствора, переносят в стерильную пробирку и указывают на ней данные этикетки (растворенный антитоксин хранят при температуре 4 - 6⁰С не более 10 дней). Фильтровальные бумажки обожженным пинцетом помещают в стерильную чашку Петри. На каждую полоску наносят 0,25 мл антитоксина, содержащего 500 МЕ в 1 мл. Для удаления избытка сыворотки смоченную полоску прикладывают к стерильной крышке чашки Петри.

При использовании антитоксической сыворотки (вместо антитоксина), требуется ее разведение до 500 МЕ в 1 мл.

Разведение антитоксической сыворотки

Соблюдая правила асептики, антитоксическую сыворотку переносят из ампулы в стерильную пробирку. На пробирке указывают данные этикетки и срок хранения. Хранят сыворотку при температуре 4 - 6⁰С.

Сыворотка должна быть разведена стерильным физиологическим раствором до содержания 500 МЕ в 1 мл. Коммерческий препарат может иметь разную активность (5000 МЕ, 10000 МЕ, 20000 МЕ) и различный объем.

Например, в ампуле содержится 10000 МЕ (в объеме 4,8 мл, как указано на этикетке коробки с ампулами) антитоксической сыворотки.

Для упрощения расчетов общий объем сыворотки можно принять за 5 мл. Следовательно, в 1 мл сыворотки содержится 2000 МЕ (10000 МЕ: 5 = 2000 МЕ). Чтобы получить 500 МЕ в 1 мл, следует к 1 мл сыворотки добавить 3 мл стерильного физиологического раствора. При необходимости можно развести сыворотку в меньших объемах: к 0,1 мл сыворотки добавить 0,3 мл физиологического раствора или к 0,2 мл сыворотки добавить 0,6 мл физиологического раствора, или к 0,3 мл сыворотки добавить 0,9 мл физиологического раствора и т.д.

Разведение сыворотки можно выполнить другим способом. Если, например, в ампуле содержится 5000 МЕ сыворотки в объеме 2,5 мл, то 500 МЕ содержится в 0,25 мл сыворотки. К этому объему добавляют 0,75 мл стерильного физиологического раствора и получают разведение сыворотки 500 МЕ в 1 мл.

Разведенную сыворотку можно хранить до 7 дней при температуре 4 - 6⁰С.

Постановка реакции

Культуру засевают в виде "бляшек" диаметром 0,6 - 0,7 см на расстоянии 0,7 - 0,8 см друг от друга и 0,5 см от края полоски фильтровальной бумаги. На одну чашку следует засеять не более 10 "бляшек". Из них 6 "бляшек" испытываемой культуры, 4 - контрольного штамма. При небольшом количестве испытываемого материала засевают 6 контрольных "бляшек" и 4 - испытываемых. Чашки с посевом помещают в термостат при 37⁰С.

Учет результатов

Результат учитывают через 18 - 24 часа и 48 часов роста. Следует иметь в виду, что препарат антитоксической противодифтерийной сыворотки, помимо антител к дифтерийному антитоксину, содержит антитела к антигенам микробной клетки. Поэтому при постановке пробы на токсигенность с использованием данного препарата преципитаты могут образовываться не только в результате связывания токсина с антитоксином (специфические преципитаты), но и при взаимодействии антибактериальных антител с компонентами клетки коринебактерий дифтерии (неспецифические преципитаты). Последние могут формироваться как у токсигенных, в том числе и у контрольного штамма, так и у нетоксигенных коринебактерий дифтерии. Иногда отмечается появление множественных линий преципитации. Неспецифические преципитаты, как правило, слабо выражены, имеют нечеткие контуры, появляются чаще через 48 - 72 часа, в редких случаях могут появляться и на первые сутки.

Критерием оценки специфичности преципитатов является слияние линий преципитации испытуемого штамма со специфическими линиями контрольного токсигенного штамма. В тех случаях, когда у контрольного штамма формируется несколько линий преципитации, специфическими следует считать более четкие и рано появляющиеся преципитаты. Поэтому просмотр чашек с пробой на токсигенность осуществляют через 18 - 24 часа от момента ее постановки. Если в течение данного времени у контрольного штамма линии преципитации не обнаруживаются, это свидетельствует о нарушении условий постановки реакции.

Варианты оценки результатов реакции:

1. Испытуемые культуры коринебактерий дифтерии являются токсигенными, если образуемые ими линии преципитации сливаются или имеют тенденцию к слиянию с соответствующими специфическими линиями контрольного токсигенного штамма.

2. Испытуемые культуры коринебактерий дифтерии являются нетоксигенными, если:

а) линии преципитации, образуемые испытуемой культурой, отсутствуют, при наличии специфических линий преципитации у контрольного штамма;

б) линии преципитации не могут слиться со специфическими линиями преципитации контрольного штамма, а скрещиваются или имеют тенденцию к скрещиванию с ними (неидентичные, неспецифические линии);

в) линии преципитации испытуемой культуры сливаются с неспецифическими линиями контрольного штамма;

г) линии преципитации испытуемой культуры перекрещиваются со специфическими линиями и сливаются с неспецифическими линиями контрольного штамма.

Очищенный ферментололизом и специфической сорбцией антитоксин не содержит антител к компонентам микробной клетки. При использовании этого препарата неспецифические линии преципитации не образуются.

Методика определения токсигенных свойств коринебактерий дифтерии с использованием индикаторных бумажных дисков с анатоксином

На поверхность чашки Петри со средой для определения токсигенности дифтерийных микробов помещают индикаторные диски с дифтерийным антитоксином. Вокруг каждого диска с антитоксином формируют 5 "бляшек": две "бляшки" - контрольного штамма и три - испытуемые (из одного анализа с подозрительными колониями формируют минимум две "бляшки" из изолированных колоний и одну - из смеси 3 - 6 однотипных колоний; материалом из этого же анализа можно занять места вокруг другого диска с антитоксином). Все пять "бляшек" располагают симметрично вокруг диска на расстоянии 0,8 см от его края. Диаметр каждой "бляшки" 0,8 см. На одной чашке Петри можно разместить до четырех дисков с антитоксином и, соответственно, до 20 "бляшек" с культурами. Чашки с посевами помещают в термостат при 37⁰С.

Результат реакции учитывают через 18 - 24 часа, а также - через 48 часов. Наличие линий преципитации между диском с антитоксином и испытуемой культурой свидетельствует о ее токсигенности. Исследуемая культура считается токсичной, если линия преципитации данной культуры сливается под углом с линией преципитации контрольного штамма. Отсутствие линий преципитации у испытуемых культур через 48 часов, при наличии их у контрольных штаммов, указывает на отсутствие токсигенности у изучаемых культур. Линии преципитации у контрольных штаммов должны появляться через 18 - 24 часа. Более позднее появление линий преципитации требует проверки качества питательной среды или замены контрольного штамма.

Хранение контрольного штамма в лаборатории

Для хранения контрольного штамма в лаборатории можно использовать полужидкий сывороточный агар, приготовленный на бульоне Мартена или другом питательном бульоне (рН 7,6). Хранить в холодильнике, пересев один раз в 2 - 3 месяца. Полуужидкий агар разливают по 8 мл в пробирки и добавляют по 1 мл сыворотки крупного рогатого скота.

Контрольный токсигенный штамм коринебактерий дифтерии, варианта гравис получают в Государственном НИИ стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича. В пробе на токсигенность нельзя использовать, в качестве контрольного, производственный штамм РW-8 и его варианты.

Контрольный штамм необходимо периодически пассировать на кровяном агаре. Для успешной идентификации коринебактерий дифтерии контрольный токсигенный штамм пересеивается каждые 1 - 2 суток.

Определение цистиназной активности (проба Пизу)

Коринебактерий дифтерии и коринебактерий ульцеранс, в отличие от ложнодифтерийной палочки Гофмана и других коринеформных бактерий, обладают ферментом цистиназой.

Испытуемую культуру засевают петлей "уколом" в питательную среду для определения цистиназы, разлитую в узкие пробирки столбиком высотой 3 см. В составе питательной среды имеется цистин и уксусно - кислый свинец. В процессе роста культура продуцирует цистиназу, расщепляющую цистин; а образующийся при этом сероводород вступает в реакцию с уксусно - кислым свинцом, который превращается в серно - кислый свинец - соединение темно-коричневого цвета. Коринебактерий дифтерии и коринебактерий ульцеранс вызывают не только почернение среды по ходу укола, но и образуют вокруг него облачко темно - коричневого цвета на расстоянии примерно 1 см от поверхности среды.

Результат реакции учитывают через 24 часа. При наличии множественного роста, для получения ускоренного ответа (через 3 часа), среду инокулируют большим количеством культуры. Одновременно с испытуемыми культурами, производится посев контрольного штамма в отдельную пробирку.

Методики определения биохимических признаков

• Определение уреазной активности

Ложнодифтерийные палочки Гофмана, коринебактерии ульцеранс и некоторые другие микроорганизмы рода *Corynebacterium* обладают способностью продуцировать в процессе роста фермент уреазу и расщеплять мочевины. Коринебактерии дифтерии такой способностью не обладают.

Пробу на уреазу можно ставить в 2-х вариантах - по методу Заксе (а) и путем посева на бульон с мочевиной (б).

а) Для определения уреазы по методу Заксе extempore смешивают 1 часть реактива А и 19 частей реактива В. Смесь разливают в узкие пробирки по 0,1 мл и вносят одну петлю испытуемой чистой культуры со скошенного агара или из пробирки со средой Пизу. Для выдачи ускоренного ответа, при наличии множественного роста однотипных колоний на чашке первичного посева, допускается внесение нескольких колоний в одну пробирку с пробой на уреазу. Результат учитывают после инкубации в термостате при 37° С в течение 30 мин.

б) Чистую культуру коринебактерий дифтерии засевают в бульон с мочевиной, разлитый в пробирки по 2 - 3 мл и помещают в термостат, результат учитывают через 24

часа инкубации при 37 С. Фермент уреазы расщепляет мочевину с образованием аммиака и углекислоты. При этом повышается рН среды и происходит изменение цвета индикатора (покраснение). При отсутствии у исследуемой культуры этого фермента, окрашивания среды не происходит. Рекомендуется одновременно, в отдельную пробирку, засеять контрольный штамм.

- *Определение сахаролитической активности*

Для идентификации коринебактерий дифтерии используют также оценку сахаролитической активности выделенных культур на средах Гисса с углеводами - сахарозой, глюкозой, растворимым крахмалом.

Каждую пробирку со средой Гисса инокулируют 1 петлей чистой культуры. Результат учитывают через 24 часа, а при отрицательном крахмальном признаке - через 48 часов культивирования посевов в термостате при 37⁰С.

При сбраживании того или иного углевода образуется кислота, происходит восстановление обесцвеченного фуксина и среда приобретает малиновую окраску. Рекомендуется одновременно ставить пробу с контрольным штаммом коринебактерий дифтерии варианта гравис.

- *Определение нитратредуктазной активности*

Способность коринебактерий дифтерии восстанавливать соли азотной кислоты (нитраты) в соли азотистой кислоты (нитриты) является дополнительным признаком, позволяющим дифференцировать коринебактерий ульцеранс.

Производят посев исследуемой культуры в пробирку с нитратным бульоном, инкубируют в течение 24 часов при температуре 37⁰С. Затем добавляют 2 - 3 капли реактива на нитриты (Грисса или Касаткина). В случае если произошло образование нитритов, среда окрашивается в красный цвет. Если микроорганизм не обладает нитратредуктазой, изменения окраски среды не происходит. Одновременно с опытными пробирками, инкубируют контрольную пробирку со стерильной средой.

Методика постановки реакции непрямой гемагглютинации для выявления дифтерийного токсина (РНГА)

РНГА не является методом, обязательным к постановке в практических бактериологических лабораториях. Вместе с тем, использование его позволяет выявлять слаботоксигенные штаммы *C.diphtheriae*, определять уровень токсинообразования циркулирующих штаммов и, в некоторых случаях, сокращать сроки индикации дифтерийного токсина.

В настоящее время данный метод может использоваться для выдачи предварительного ответа в ходе бактериологического исследования при наличии в лаборатории тест - системы и специально обученного персонала. В дальнейшем, при накоплении опыта работы с РНГА, усовершенствовании тест - системы возможно включение этой реакции в схему бактериологической диагностики дифтерийной инфекции для ускоренного выявления дифтерийного токсина.

РНГА - двухкомпонентная реакция, предполагающая использование диагностикума эритроцитарного дифтерийного антительного, действующим началом которого являются связанные с эритроцитами очищенные специфической сорбцией поликлональные антитоксические противодифтерийные антитела (антитоксин), вступающие во взаимодействие лишь с дифтерийным токсином (анатоксином). При наличии в исследуемой пробе токсина образуется специфический комплекс: дифтерийный токсин + сенсibilизированные антитоксином эритроциты. В результате формируется осадок в виде агглютината эритроцитов.

Для проведения РНГА необходимы:

- коммерческий набор "Диагностикум эритроцитарный дифтерийный антительный жидкий для определения токсина в РНГА" (изготовитель НИИЭМ им. Л. Пастера, С. Петербург);

- капельницы, петли из набора Такачи объемом 0,025 мл (возможна постановка реакции петлями объемом 0,05 мл, что предполагает увеличение расхода диагностикума и других компонентов реакции в 2 раза) или автоматические пипетки, установленные на объем 25 мкл (или 50 мкл);

- мерная посуда;

- дистиллированная вода;

- 0,85% раствор хлорида натрия с 0,5% содержанием нейтрального формалина, рН 7,2 (раствор 1);

- полистироловые планшеты "U" образные (со сферическим дном) из набора Такачи или отечественного производства для иммунологических реакций (многократного использования).

Набор диагностикума содержит:

1. Диагностикум эритроцитарный жидкий 3-процентный.

2. Положительный контроль - дифтерийный анатоксин, жидкий,

3. Нормальная кроличья сыворотка (НКС), сухая, 10-процентная.

Накануне тестирования исследуемого материала.

1. Приготовление раствора 1.

К 79 мл 0,85-процентного раствора хлорида натрия с рН 7,2 добавляют 1 мл нейтрального 40-процентного раствора формалина, размешивают. Хранят при температуре 4⁰С без ограничения срока.

1.1. Приготовление 0,85-процентного раствора хлорида натрия, рН 7,2. Навеску хлорида натрия 8,5 г растворяют в 1000 мл свежеперегнанной дистиллированной воды, тщательно перемешивают.

Доводят рН до 7,2 с помощью гидроксида натрия 4-процентной концентрации.

1.2. Приготовление 4-процентного раствора гидроксида натрия (NaOH).

4 г гидроксида натрия растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Хранят в плотно закрытой склянке или полиэтиленовом флаконе при температуре 4 С в течение 1 месяца.

1.3. Приготовление нейтрального формалина.

Коммерческий 40-процентный раствор формалина нейтрализуют добавлением углекислого кальция или углекислого магния в соотношении 3:1. Оставляют в темном месте при комнатной температуре на 2 - 3 дня, периодически взбалтывая. Затем дают раствору отстояться. Перед употреблением, с помощью индикатора бромтимоловый синий, проводят контроль рН, значение которого должно быть 7,0. По мере надобности, надсадочную жидкость используют для приготовления раствора 1.

2. Подготовка исследуемого материала, положительного и отрицательного контролей.

Накануне постановки РНГА исследуемый материал с чашки первичного посева, контрольные токсигенный и нетоксигенный штаммы коринебактерий дифтерии засевают в жидкую питательную среду (см. раздел "Питательные среды") и инкубируют при 37 С в течение 18 часов. Параллельно инкубируют пробирку с жидкой питательной средой (без материала).

В день постановки реакции готовят рабочие разведения всех компонентов реакции.

1. Приготовление рабочего разведения дифтерийного анатоксина 1:100.

Раствор готовят методом последовательных разведений. Разведение анатоксина 1:10: из флакона, содержащего 10 Лf/мл, переносят 0,2 мл в пробирку, содержащую 1,8 мл раствора 1, тщательно перемешивают. Разведение анатоксина 1:100: 0,1 мл анатоксина в разведении 1:10 вносят в 0,9 мл раствора 1, тщательно перемешивают (содержит 0,1 Лf/мл).

Раствор хранению не подлежит!

2. Приготовление 1-процентного раствора нормальной кроличьей сыворотки.

Во флакон "Нормальная кроличья сыворотка, 10-процентная, сухая" вносят 2 мл раствора 1, тщательно перемешивают (раствор сыворотки 10-процентной концентрации можно хранить при температуре 4 С до 1 месяца), затем переносят в мерную емкость и доводят объем до 20 мл раствором 1. Раствор НКС 1-процентной концентрации имеет вид слегка опалесцирующей жидкости, который можно хранить при комнатной температуре не более 10 часов.

3. Приготовление раствора диагностикума в рабочем разведении (0,5-процентной концентрации).

Диагностикум эритроцитарный 3-процентной концентрации при хранении образует два слоя: прозрачная бесцветная надосадочная жидкость и осадок коричневого цвета, разбивающийся при встряхивании. Разгерметизированный 3-процентный раствор

диагностикума можно хранить при 4 С в течение месяца. Для приготовления 0,5-процентного раствора диагностикума к содержимому флакона (после встряхивания) добавляют 4 мл раствора 2, тщательно перемешивают, переносят в мерную емкость, добавляют еще 8 мл раствора 2, получая, таким образом, рабочее разведение диагностикума. Раствор 0,5-процентной концентрации может храниться при комнатной температуре не более 10 часов.

4. Подготовка планшетов и петель.

Лунки планшетов протирают тампоном, смоченным раствором 1; петли прожигают. В дальнейшем обработку петель проводят в соответствии с "Наставлением" к аппарату Такачи. Старые петли, имеющие дефекты от постоянного прокаливания, не пригодны к употреблению, так как они не могут удерживать нужный объем жидкости.

Постановка РНГА

1. Внесение раствора 1.

Во все лунки планшетов вносят по 0,025 мл раствора 1.

2. Внесение раствора дифтерийного анатоксина в рабочем разведении (1-ый положительный контроль - для оценки чувствительности диагностикума).

В первую лунку 1-го вертикального ряда планшета (А1) вносят 0,025 мл дифтерийного анатоксина (в разведении 1:100 или 0,1 Лf/мл) и титруют с двукратным шагом до 8-ой лунки (Н1) включительно. Разведения анатоксина в лунках: 1-ой - 1:200 или 0,05 Лf/мл, 2-ой - 1:400 или 0,025 Лf/мл, 3-ей - 1:800 или 0,012 Лf/мл, 4-ой - 1:1600 или 0,006 Лf/мл, 5-ой - 1:3200 или 0,003 Лf/мл, 6-ой - 1:6400 или 0,0015 Лf/мл, 7-ой - 1:12800 или 0,0007 Лf/мл, 8-ой - 1:25600 или 0,0003 Лf/мл.

3. Внесение надосадочной жидкости среды культивирования контрольного токсигенного штамма коринебактерий дифтерии (2 положительный контроль - для оценки качества питательной среды и условий культивирования штаммов).

В 1-ую лунку 2-го вертикального ряда (А2) вносят 0,025 мл этой пробы и титруют с двукратным шагом до 8-ой лунки (Н2) включительно (от 1:2 до 1:256).

4. Внесение надосадочной жидкости среды культивирования контрольного нетоксигенного штамма коринебактерий дифтерии (1-й отрицательный контроль - для оценки специфичности диагностикума).

В 1-ую лунку 3-го вертикального ряда (А3) вносят 0,025 мл этой пробы и титруют с двукратным шагом до 8-ой лунки (Н3) включительно (от 1:2 до 1:256).

5. Внесение пробы жидкой питательной среды, без материала (2-й отрицательный контроль - на отсутствие способности среды культивирования вызывать агглютинацию диагностикума).

В 1-ую лунку 4-го вертикального ряда (А4) вносят 0,025 мл среды культивирования и титруют с двукратным шагом до 5-ой лунки (Е4) включительно (от 1:2 до 1:32).

6. Внесение исследуемых проб.

В первые лунки оставшихся рядов (с 5 по 12) вносят по 0,025 мл насадка среды культивирования исследуемого материала и титруют с двукратным шагом до 8-ой лунки включительно (от 1:2 до 1:256).

Пробирки с исследуемыми и контрольными пробами перед взятием материала не встряхивать!

7. Внесение рабочего разведения диагностикума (0,5-процентной концентрации).

а) В 2 - 3 лунки, содержащие только раствор 1, вносят по 0,025 мл диагностикума (3-й отрицательный контроль - на отсутствие неспецифической агглютинации диагностикума. Контроль ставят на каждом планшете!).

б) Во все лунки с исследуемым материалом (см. пункт 6), положительными (см. пункты 2, 3) и отрицательными (см. пункты 4, 5) контролями вносят по 0,025 мл диагностикума.

Содержимое лунок перемешивают легким постукиванием пальца по краю планшета. Планшеты закрывают крышками и оставляют на ровной поверхности при температуре 20 С (перемещение пластин до учета результатов реакции исключается). Через 2,5 - 3,5 часа производят учет результатов реакции. Допускается учет результатов реакции через 18 - 24 часа.

Учет и интерпретация результатов

Учет результатов осуществляется визуально - по степени агглютинации эритроцитов:

++++ гемагглютинат тонким слоем выстилает все дно лунки;

+++ агглютинировавшие эритроциты ровным слоем выстилают дно лунки, но размер агглютината меньше, может наблюдаться фестончатое утолщение края осадка;

++ части лунки, окружены слоем эритроцитов в виде кольца;

+ на дне лунки образуется широкое, плотное кольцо с незначительной агглютинацией по краю;

- осадок в центральной части лунки в виде дискет или кольца с ровным краем.

Чувствительность диагностикума определяется тем максимальным разведением дифтерийного анатоксина, которое еще вызывает агглютинацию сенсibilизированных эритроцитов не менее, чем на три плюса (+++). Диагностикум должен быть по чувствительности не ниже 0,003 Лf/мл (титр анатоксина не ниже 1:3200 - 5 лунка). При более низкой чувствительности (4 лунка и менее) диагностикум бракуется.

Диагностикум не должен давать реакции агглютинации с раствором 1, насадочной жидкостью среды культивирования контрольного нетоксигенного штамма, средой культивирования без материала.

Качество жидкой питательной среды, используемой для культивирования исследуемого материала и контрольных штаммов, считается удовлетворительным, если положительная реакция (на ++) в ряду разведений контрольного токсигенного штамма коринебактерий дифтерии наблюдается в лунке с разведением не менее 1:32 (5 лунка, Е2).

Положительными считаются пробы, давшие реакцию агглютинации с сенсibilизированными эритроцитами не менее, чем на два плюса (++) . Содержание токсина в исследуемой пробе выражается величиной титра (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 и т.д.) .

Данный метод позволяет определить относительное (условное) количественное содержание токсина в исследуемых пробах. Для этого необходимо умножить выраженное в Lf/мл значение чувствительности тест - системы на обратную величину титра исследуемой пробы.

Например, чувствительность тест - системы 0,0015 Lf/мл (реакция агглютинации на +++ в 6-ой лунке ряда разведений дифтерийного анатоксина, или F1). Титр исследуемой пробы 1:4 (реакция агглютинации на ++).

Относительное количество токсина в этой пробе равно 0,006 Lf/мл (0,0015 Lf/мл \times 4 = 0,006 Lf/мл).

Неспецифическая гемагглютинация в отрицательных контролях

1. В случае появления агглютинации в лунках контроля диагностикума (диагностикум + раствор 1) следует обратить внимание на правильность приготовления и хранения этого раствора.

2. В случае регистрации положительной реакции в разведениях жидкой питательной среды без материала (в лунках А4 - Е4) следует проверить среду культивирования (рецептура, рН, сроки хранения), качество сыворотки крупного рогатого скота (СКРС) и изучить их в РНГА для исключения неспецифической реакции диагностикума с компонентами среды культивирования. Для этого готовят ряд серийных разведений питательного бульона от 1:2 до 1:32. Затем в лунки вносят по 0,025 мл диагностикума в рабочем разведении. При регистрации положительной реакции (гемагглютинации) в лунках питательная основа бракуется. Также готовят ряд серийных разведений от 1:2 до 1:32 раствора 1, содержащего 15% СКРС, используемой в опыте. В лунки вносят по 0,025 мл диагностикума в рабочем разведении. При регистрации положительной реакции данная серия СКРС бракуется.

3. В случае регистрации положительной реакции в разведениях среды культивирования контрольного нетоксигенного штамма коринебактерий дифтерии (лунки А3 - Н3), но при отрицательной реакции диагностикума с раствором 1 и жидкой питательной средой данная серия диагностикума бракуется из-за его неспецифичности.

Если происходит агглютинация диагностикума во всех отрицательных контролях, то диагностикум бракуется из-за спонтанной агглютинации сенсibilизированных эритроцитов.

Меры безопасности при постановке РНГА

1. Все ингредиенты тест - системы для РНГА не инфекционны.

2. Работа с исследуемым патогенным материалом, контрольными токсигенным и нетоксигенным штаммами проводится согласно требованиям эпидрежима бактериологических лабораторий при работе с микроорганизмами III группы.

3. При работе с автоматическими пипетками, использованные наконечники помещают в дезраствор на ночь, затем выдерживают в течение суток в мыльном растворе или "Моющем средстве" (жидком), промывают проточной водой в течение 8 - 10 часов. После этого промывают в дистиллированной воде в течение 1 часа и высушивают.

4. И использованные петли аппарата Такачи помещают в дезраствор на 15 - 20 минут, затем промывают в смеси Никифорова. Перед употреблением - прожигают.

5. Обработка планшетов. Планшеты после работы помещают в 3-процентный раствор перекиси водорода на 2 - 3 часа, затем промывают водопроводной водой. Ватно - марлевым тампоном, смоченным мыльной пеной, вращательными

движениями промывают каждую лунку планшета. Ополаскивают планшеты теплой водой, затем погружают на 24 часа в дистиллированную воду. Планшеты вынимают и высушивают. Планшеты пригодны для повторных исследований.

***Методика постановки реакции пассивной
гемагглютинации для выявления дифтерийных
антитоксических антител (РПГА)***

Для изучения напряженности противодифтерийного иммунитета проводят определение уровня антитоксических противодифтерийных антител в сыворотке крови человека в РПГА.

РПГА - двухкомпонентная реакция, предполагающая взаимодействие диагностикума эритроцитарного дифтерийного антигенного, который представляет собой эритроциты с адсорбированным на них дифтерийным анатоксином, и антитоксических противодифтерийных антител, находящихся в сыворотке крови обследуемых. При наличии в исследуемой сыворотке антитоксина образуется специфический комплекс: антитоксин + сенсibilизированные анатоксином эритроциты.

В результате формируется осадок в виде агглютината эритроцитов.

РПГА рекомендуется ставить одновременно с двумя диагностикумами - дифтерийным и столбнячным. Данную реакцию ставят микрометодом, при котором используются малые количества сыворотки крови, растворов и реактивов. Также, по сравнению с макрометодом, микрометод более чувствителен и специфичен. Описанная в данном разделе методика постановки РПГА содержит основные требования, предъявляемые к этой реакции.

Взятие крови для постановки РПГА осуществляют обученные медицинские работники ЛПУ. Кровь берут из пальца в объеме 0,7 - 1,0 мл. Не допускается взятие крови из вены специально для постановки РПГА. Вместе с тем, возможно использование крови, взятой из вены для проведения комплексных исследований.

Постановку РПГА должен осуществлять специально обученный персонал.

Правила сбора и обработки проб крови для определения антитоксических противодифтерийных антител

Обследуемый тщательно моет руки с мылом в теплой воде. Подушечку концевой фаланги безымянного пальца левой руки обрабатывают 70% спиртом, место сгиба у концевой фаланги прижимают для лучшего кровенаполнения и наносят два укола стерильным одноразовым скарификатором на расстоянии 2 мм один от другого или один укол двумя скарификаторами взятыми вместе. Массируя опущенный палец капли крови собирают в стерильную центрифужную пробирку, направляя их "одной дорожкой". Собирают не менее 0,7 - 1,0 мл крови. Ранку обрабатывают настойкой йода. Пробирку закрывают ватно-марлевой пробкой и оставляют в наклонном положении для образования "скошенного" сгустка. На

пробирке должен быть указан номер, соответствующий записи в журнале регистрации. Через час пробирку переводят в вертикальное положение. При этом сгусток остается на стенке пробирки, а свободная от эритроцитов сыворотка собирается на дне. Сыворотку переносят в другую пробирку.

В лабораторию для постановки РПГА доставляют либо пробирку со сгустком, либо пробирку с сывороткой. Сыворотка может быть заморожена, и храниться при температуре -20⁰С. Замораживать и оттаивать сыворотку крови рекомендуется не более одного раза.

Оснащения для проведения РПГА

(На примере коммерческой тест - системы производства АО "Биомед" им. Мечникова, п. Петрово - Дальнее Московской обл.)

Для проведения реакции микрометодом необходимы:

- коммерческий набор для определения противодифтерийных антитоксических антител "Диагностикум эритроцитарный дифтерийный жидкий для РПГА";
- мерная посуда;
- капельницы, петли из набора Такачи объемом 0,025 мл (возможна постановка реакции петлями объемом 0,05 мл, что предполагает увеличение расхода диагностикума и других компонентов реакции в два раза) или автоматические пипетки, установленные на объем 25 мкл (или 50 мкл);
- полистироловые планшеты "U" - образные (со сферическим дном) из набора Такачи или отечественного производства для иммунологических реакций (многократного использования);
- дистиллированная вода;
- 0,85-процентный свежеприготовленный раствор хлорида натрия - для разведения испытуемых сывороток.

Коммерческая тест - система содержит:

1. Фосфатно - солевой буферный раствор концентрированный, без твина (ФБР без твина) - для разведения диагностикума и контрольных эритроцитов.
2. Фосфатно - солевой буферный раствор концентрированный с твином (ФБР с твином) - для разведения сыворотки противодифтерийной контрольной и проведения РПГА.
3. Диагностикум эритроцитарный дифтерийный 3-процентный.
4. Эритроциты барана формализированные 50-процентные - для адсорбции гетерогемагглютининов в испытуемых сыворотках.
5. Эритроциты барана контрольные 3-процентные.
6. Сыворотка противодифтерийная контрольная, содержащая 10 МЕ/мл.

Подготовительные работы при исследовании материала в РПГА

1. Подготовка планшетов и др.

Перед проведением реакции протирают каждую лунку тампоном, смоченным разведенным ФБР с твином.

2. Приготовление раствора ФБР без твина.

Содержимое флакона "ФБР без твина" разводят до объема 62,5 мл дистиллированной водой (рН готового раствора 7,2). Приготовленный раствор используют в день проведения реакции.

3. Приготовление раствора ФБР с твином.

Содержимое флакона "ФБР с твином" разводят до объема 125 мл дистиллированной водой (рН готового раствора 7,2). Разведенный раствор можно разлить по флаконам, герметически укупорить и хранить при температуре 4ё С в течение 72 часов.

4. Приготовление раствора противодифтерийной контрольной сыворотки (СДК).

Сыворотку противодифтерийную контрольную (10 МЕ/мл) разводят в 100 раз до содержания 0,1 МЕ/мл с помощью ФБР с твином. СДК должна быть использована в течение суток.

5. Приготовление рабочего разведения диагностикума эритроцитарного дифтерийного (ДЭД).

Диагностикум эритроцитарный дифтерийный 3-процентный разводят ФБР без твина до 0,3-процентной концентрации.

6. Приготовление рабочего разведения эритроцитов барана контрольных (КЭ).

Контрольные эритроциты 3-процентные разводят до 0,3-процентной концентрации с помощью ФБР без твина.

7. Подготовка исследуемых сывороток.

Исследуемую сыворотку человека перед определением уровня дифтерийного антитоксина разводят 1:5 или 1:10 0,85-процентным свежеприготовленным раствором хлорида натрия. Разведенную сыворотку прогревают в течение 30 мин. в водяной бане или инактиваторе при температуре 56 С. Разведенную и прогретую сыворотку адсорбируют эритроцитами барана, формализированными 50-процентными, которые перед использованием встряхивают до получения гомогенной взвеси. Эритроциты добавляют из расчета 0,05 мл на 0,5 мл разведенной сыворотки, выдерживают 15 - 20 часов при температуре 4 С. После сорбции прозрачная надосадочная жидкость готова к исследованию (без предварительного центрифугирования). При срочном исследовании адсорбцию проводят в течение 30 мин. в термостате при 37 С, центрифугируют и работают с надосадочной жидкостью.

Постановка РПГА

1. Внесение ФБР с твином.

Во все лунки планшета вносят по 0,025 мл разведенного ФБР с твином.

2. Внесение испытуемых сывороток.

Петлей вместимостью 0,025 мл в 1 лунку ряда вносят 0,025 мл разведенной 1:5 прогретой, адсорбированной испытуемой сыворотки, тщательно перемешивают, получают разведение 1:10 и, перенося по 0,025 мл раствора из предыдущей лунки в последующую, делают двукратные разведения до 10 лунки включительно. Из 10 лунки, после перемешивания, удаляют 0,025 мл. Для экономии всех ингредиентов титрование сывороток можно проводить в 8 лунках по короткому ряду планшета.

Если испытуемые сыворотки разведены 1:10, то в 1 лунку планшета вносят по 0,025 мл разведенной 1:10 испытуемой сыворотки.

Внесение сыворотки в этом случае осуществляют мерной пипеткой (с наконечником). Титрование сыворотки начинают со 2 лунки. Для контроля на отсутствие агглютининов к эритроцитам барана, при постановке РПГА "по длинному ряду", в 11 лунку петлей вносят 0,025 мл испытуемой сыворотки, прогретой, адсорбированной, разведенной 1:10 (или 1:5), перемешивают и переносят 0,025 мл в 12 лунку. Из 12 лунки, после перемешивания, удаляют 0,025 мл. При титровании "по короткому ряду" этот контроль для испытуемых сывороток ставят на специально выделенных рядах этого же планшета (в редких случаях - в отдельном планшете).

3. Внесение сыворотки противодифтерийной контрольной (для оценки чувствительности эритроцитарного диагностикума).

В 1 лунку ряда вносят 0,025 мл разведенной СДК, получают разведение 1:200, содержимое лунки тщательно перемешивают петлей и, перенося по 0,025 мл раствора из предыдущей лунки в последующую, делают двукратные разведения до 10 лунки включительно. Из десятой лунки, после перемешивания, удаляют 0,025 мл, 11 и 12 лунки, содержащие по 0,025 мл разведенного ФБР с твином, являются контролем диагностикума на отсутствие спонтанной агглютинации.

В 1 лунку ряда, так же как и при титровании испытуемых сывороток, лучше не вносить 0,025 мл разведенного ФБР с твином.

При этом, в 1 и 2 лунки мерной пипеткой с наконечником вносят по 0,025 мл СДК, разведенной 1:100. Титрование СДК начинают со 2 лунки.

Контроль на чувствительность диагностикума следует ставить при каждом опыте!

4. Внесение контрольных эритроцитов барана.

При постановке РПГА "по длинному ряду", в 11 и 12 лунки с испытуемой сывороткой вносят по 0,025 мл рабочего разведения контрольных эритроцитов барана. При постановке РПГА "по короткому ряду", контрольные эритроциты барана вносят в две специально выделенные лунки для каждой испытуемой сыворотки (см. п. 2).

5. Внесение эритроцитарного диагностикума.

Флакон с разведенным диагностикумом тщательно встряхивают до образования однородной взвеси эритроцитов и капельницей вносят по 0,025 мл (одна капля) диагностикума в каждую лунку до конца ряда с разведениями контрольной сыворотки и с 1 до 10 лунки включительно с разведениями испытуемых сывороток (или с 1 до 8 лунки с разведениями испытуемых сывороток при постановке реакции "по короткому ряду").

Разведенный диагностикум может быть использован в течение недели, если его активность соответствует требуемой.

Равномерное распределение эритроцитов в лунках пластин достигается путем постукивания по углам пластины. Пластины остаются на ровной поверхности в течение 2,5 - 3,5 часов при температуре 20 С (перемещение пластин до учета результатов реакции исключается). Допускается учет результатов реакции через 18 - 24 часа.

Примечание. Титрование сывороток можно проводить в объеме 0,05 мл, диагностикум при этом добавляют по 0,025 мл в каждую лунку.

Учет и интерпритация результатов

Результаты РПГА оценивают визуально - по степени агглютинации эритроцитов:

++++ гемагглютинат тонким слоем выстилает все дно лунки;

+++ агглютинировавшие эритроциты ровным слоем выстилают дно лунки, но размер агглютината меньше, может наблюдаться фестончатое утолщение края осадка;

++ агглютинировавшие эритроциты располагаются в центральной части лунки, окружены слоем эритроцитов в виде кольца;

+ на дне лунки образуется широкое, плотное кольцо с незначительной агглютинацией по краю;

- осадок в центральной части лунки в виде диска или кольца с ровным краем.

Реакция в контролях на отсутствие в испытуемой сыворотке агглютининов к эритроцитам барана и на отсутствие спонтанной агглютинации диагностикума должна быть отрицательной. Если испытуемая сыворотка в лунках с контрольными эритроцитами дает гемагглютинацию, нужно повторно адсорбировать из нее гетерогемагглютинины: то есть повторно провести обработку сыворотки 50-процентными формализированными эритроцитами.

За титр испытуемой и контрольной сывороток принимают последнее разведение, дающее агглютинацию эритроцитов на два плюса (++)

При определении специфической активности (чувствительности) диагностикума, агглютинация на два плюса с сывороткой противодифтерийной контрольной должна быть не ниже 1:3200 и не выше 1:12800, что соответствует 5 - 7 лункам. В противном случае диагностикум бракуется и реакция не учитывается. (Активность столбнячного диагностикума с противостолбнячной контрольной сывороткой должна быть не ниже, чем 1:1280.)

Условно - защитным титром как противодифтерийных, так и противостолбнячных антител принимается титр 1:20.

Испытуемые сыворотки с титром противодифтерийных антитоксических антител 1:20 и менее подлежат повторному исследованию в РПГА с использованием уже разведенной 1:5 или 1:10, прогретой, адсорбированной эритроцитами барана сыворотки. При наличии достаточного количества нативной сыворотки, ее вновь разводят 1:5 или 1:10, прогревают, сорбируют эритроцитами барана и исследуют в РПГА. За окончательный результат исследования принимают более высокий титр.

Сравнение количественных показателей содержания антитоксических противодифтерийных антител в сыворотке крови, полученных с помощью титрования в РПГА и в коже кролика, не представляется возможным.

Не рекомендуется использовать РПГА для дифференциальной диагностики дифтерийной инфекции и носительства токсигенных коринебактерий дифтерии, поскольку нарастание титра анитоксических антител может иметь место как в том, так и в другом случае. Кроме того, 4-кратного нарастания титра реакции, которое некоторыми исследователями трактуется как критерий наличия дифтерийной инфекции, может не наблюдаться, поскольку РПГА является полуколичественным методом, с допустимой ошибкой метода +/- одно разведение. Однако РПГА позволяет оценить состояние анитоксического противодифтерийного иммунитета у больного и, в некоторой степени, прогнозировать течение и исход заболевания.

Туберкулез

Туберкулез – инфекционное заболевание, вызываемое микобактериями и характеризующееся образованием специфических гранул в различных тканях и органах (легких, почках, лимфатических узлах, суставах и т.д.), а так же полиморфной клинической картиной.

Возбудителем туберкулеза является *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium bovis* вызывает туберкулез как у крупного рогатого скота, так и у человека. В Африке известны случаи туберкулеза людей, вызванные *M. africanum*.

Микобактерии относятся к роду *Mycobacterium*, семейству *Mycobacteriaceae*, порядку *Actinomycetales*.

Биологические свойства

Mycobacterium tuberculosis имеют форму тонких, коротких или длинных, прямых или искривленных палочек, длиной 1,0 – 4,0 мкм, диаметром 0,3 – 0,6 мкм. Неподвижны, спор и капсул не образуют. Обладают большим полиморфизмом. В старых культурах наблюдаются нитевидные, ветвящиеся формы, нередко зернистые формы (зерна Муха), как в виде свободно лежащих зерен, так и содержащихся внутриклеточно.

Кислотоустойчивы, что объясняется высоким содержанием в клеточной стенке липидов и миколовой кислоты. Грамположительны, анилиновыми красителями воспринимают плохо, по Цилю-Нильсену окрашиваются в красный цвет.

M. tuberculosis - аэробы, но способны расти в факультативно анаэробных условиях. Размножаются делением, но процесс происходит очень медленно, в среднем 14 – 18 часов. Температурный оптимум 37⁰С-38⁰С, рН 7,0 – 7,2 (растет в пределах от 4,5 до 8,0). Для роста нуждаются в присутствии белкового субстрата и глицерина, а также углерода, хлора, серы, фосфора, азота, факторов роста (биотина, никотиновой кислоты, рибофлавина), ионов: Mg, K, Na, Fe. Для культивирования микобактерий туберкулеза предложены различные питательные среды: глицериновые, картофельные с желчью, яичные, полусинтетические, синтетические. Наилучшей считается среда Левенштейна-Йенсена. В ее состав входит аспарагин, крахмал, магний, калий. В качестве вещества подавляющего рост сопутствующей микрофлоры добавлена малахитовая зелень.

На жидких средах рост наблюдается через 5 – 7 сут в виде сухой морщинистой пленки, поднимающийся через края пробирки.

На плотных питательных средах рост отмечают на 14-40 сут в виде сухого морщинистого налета кремового цвета, колонии с приподнятым центром напоминают цветную капусту, крошковатые, плохо снимаются со среды.

На щелочном альбуминате (или на стекле, помещенном в цитратную лизированную кровь) размножающиеся туберкулезные бактерии образуют структуру, напоминающую жгут, веревку, женскую косу.

Основным фактором патогенности микобактерий туберкулеза является токсический гликолипид – корд-фактор (трегалоза-6,6-димиколат), который располагается на поверхности и в толще клеточной стенки. Он оказывает не только токсическое действие на ткани, но и защищает микобактерии от фагоцитоза. Будучи поглощенными фагоцитами, они размножаются в них, вызывая их гибель. Также содержащиеся в клеточной стенке миколовая, фтиодная и др. жирные кислоты оказывают токсическое действие на ткани и органы.

Антигенная структура микобактерий туберкулеза однородна, сероваров не выявлено. Для внутривидовой дифференцировки разработана классификация, основанная на фаготипировании штаммов с помощью набора из 10 микобактериофагов.

Наиболее чувствительны к микобактериям туберкулеза морские свинки. При любом способе заражения туберкулезная палочка вызывает генерализованную форму туберкулеза, от которой свинка погибает на 4 – 6 неделе. Кролики к *M.tuberculosis* мало восприимчивы.

Микобактерии туберкулеза достаточно устойчивы к различным воздействиям: в молоке погибают через 15 – 20 мин при температуре 60⁰С, при аналогичной температуре в мокроте сохраняются до часа, при кипячении погибают через 5 мин. Прямой солнечный свет убивает палочку Коха через 40 – 45 минут, рассеянный свет через 8 – 10 сут. Хорошо сохраняется при высушивании (до нескольких недель). Обычные химические дезинфектанты обычно мало эффективны, например 5% раствор фенола убивает микобактерии туберкулеза через 5 – 6 час, так же способен вырабатывать устойчивость ко многим препаратам.

Mycobacterium bovis: морфологические отличия от микобактерий туберкулеза не выражены, микобактерии бычьего типа несколько короче, с менее выраженной склонностью к ветвлению. Культуральные свойства сходны, однако на искусственных средах растут медленно и только при температуре 37⁰С, в глицерине не нуждаются. Основным методом дифференциальной диагностики с *M. tuberculosis* считают ниациновый тест и биологическую пробу на кроликах (микобактерии бычьего типа вызывают заболевание и гибель кроликов).

Mycobacterium africanum морфологически и культурально сходен с *M. bovis*.

Основные культуральные и биохимические свойства микобактерий представлены в таблице 22.

Эпидемиология и патогенез

Заражение туберкулезом происходит при контакте с больным человеком, реже животным, микобактерии проникают в организм аэрогенным путем, реже через кожу слизистые. В редких случаях возможно трансплацентарное инфицирование плода. Заражение туберкулезом возможно при употреблении инфицированного сырого молока, сливочного

масла, сыра, а так же плохо обработанного мяса. Входными воротами являются слизистые дыхательного и желудочно-кишечного тракта.

Проникая в альвеолы, туберкулезные микобактерии вызывают специфическое воспаление и формирование специфической гранулемы – бугорка, первичного очага. В центре располагаются микобактерии, а вокруг них вал из эпителиоидных, макрофагальных клеток, клеток Пирогова-Ланганса. Специфические воспаления в легких сопровождаются воспалением региональных лимфатических узлов. Судьба гранулемы может быть различна: при снижении резистентности организма очаг может увеличиваться, подвергаться казеозной пневмонии или генерализации туберкулеза. Чаще всего, при высокой резистентности гранулема через некоторое время окружается соединительнотканной капсулой, которая впоследствии пропитывается солями кальция - кальцифицируется. На этом заканчивается первичный туберкулезный процесс и формируется нестерильный инфекционный иммунитет. Микобактерии туберкулеза в

очаге сохраняются многие годы, и вторичное заражение туберкулезом может происходить как из вне, так и изнутри организма.

В случае заражения алиментарным путем туберкулезные палочки попадают в кишечник, захватываются фагоцитами слизистой оболочки и заносятся по лимфатическим путям в регионарные кишечные лимфатические узлы, вызывая их характерные поражения. Через правые отделы сердца микобактерии могут попасть в легкие и стать причиной легочного туберкулеза.

Туберкулезные микобактерии могут поражать практически любой орган и любую ткань с развитием соответствующей клиники.

Лабораторная диагностика

Микобактерии туберкулеза обнаруживаются бактериоскопически, бактериологически, биологическим методом, серологически и с помощью туберкулиновой пробы.

Сбор материала для исследования. Материал для исследования на туберкулез собирают в стерильную плотно закрывающуюся посуду – склянки с завинчивающимися крышками и т.п. Это нужно для того, чтобы не загрязнить окружающую больного среду и чтобы в исследуемый материал не попали кислотоустойчивые бактерии, вегетирующие в окружающей среде.

Материалом для исследования могут служить: мокрота, моча, гной, ликвор, испражнения, сыворотка крови, промывные воды бронхов, кусочки тканей, взятые во время операции.

Чаще всего объектом исследования является мокрота. Для посева лучше доставлять утреннюю порцию мокроты в тот же день. Если у больного мало мокроты, то можно собирать ее в течение суток при условии, что собранное в течение дня количество будет храниться в холодном месте (но нельзя допускать замерзания), а утром вместе с утренней порцией будет доставлена в лабораторию. При необходимости транспортировать мокроту на далекие расстояния применяют консервацию мокроты. Консервантами служат: глицерин, 2% борная кислота, трехзамещенный фосфат натрия. Мокроту заливают двойным объемом консерванта, закрывают плотно крышкой сосуд и доставляют в лабораторию.

Более ценным материалом для исследования является промывные воды бронхов. Для бактериоскопии и посева также используют осадок, полученный при центрифугировании материала.

В моче, особенно мужской, могут находиться *M. smegmatis* и другие атипичные микобактерии, которые по морфологии и культуральным свойствам очень похожи на туберкулезные. Поэтому для посева следует собирать в стерильную посуду утром среднюю порцию мочи после тщательного туалета наружных половых органов растворами антисептиков (слабым раствором перманганата калия, риванола и т.п.). Осадок мочи перед посевом обрабатывают 5 – 10% серной кислотой, но не щелочью.

Кусочки ткани, взятые во время операции, помещают в ступку, измельчают сначала ножницами, а затем растирают пестиком, добавляя 5 – 10 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия постепенно. Полученную взвесь переносят в склянку с бусами и обрабатывают перед посевом 6 – 10% серной кислотой, или щелочью.

Бактериоскопическое исследование

Является основным и наиболее распространенным. Мазки для окрашивания готовят, растирая извлеченные из мокроты гнойные комочки или кусочки гноя из другого материала между двумя стеклами. Получают два препарата-близнеца. Промывные воды бронха, желудка, мочу, пунктаты и другие материалы центрифугируют, осадок помещают на предметные стекла. Мазки высушивают, фиксируют на огне и окрашивают. Окрашенные по Цилю — Нильсену мазки микроскопируют с иммерсионной системой не менее 10 мин. Микобактерии туберкулеза обнаруживаются при этом в виде тонких,

прямых или слегка изогнутых красных палочек, иногда расположенных под углом в виде римской цифры V, часто кучками или небольшими скоплениями. Нередко в палочках можно видеть одно или несколько темных зерен.

В препарате можно обнаружить единичные палочки, если в 1 мл мокроты их содержится не менее 500 000, поэтому применяют различные методы «обогащения» или «накопления» туберкулезных микобактерий. Наибольшее распространение получил метод флотации, при котором туберкулезные микобактерии извлекают из водной суспензии при помощи углеводов или других жидкостей с меньшей, чем у воды, относительной плотностью. Для этого 10—15 мл исследуемого материала помещают на дно эрленмейеровской колбы или бутылки с покатыми плечиками вместимостью 250 мл и добавляют равный объем 0,5% раствора едкого натра или кали.

Если исследуемый материал очень густой (гнилая мокрота, кал и т. п.), то можно добавить двойной объем щелочи. Бутылку (или колбу) закрывают плотно резиновой пробкой, обернутой вощаной бумагой. Смесь материала со щелочью встряхивают несколько раз для гомогенизации материала, затем добавляют около 50 мл дистиллированной воды и 1 мл какого-либо углеводорода (толуол, ксилол, бензин), встряхивают и снова добавляют дистиллированной воды до половины бутылки. Встряхивают в течение 10—15 мин (во встряхивателе или руками). Добавляют в бутылку дистиллированной воды до горлышка и оставляют стоять при комнатной температуре 1—2 ч. Взвешенные в смеси жидкостей микобактерии прилипают к поверхности пузырьков углеводорода и увлекаются ими наверх, где эти пузырьки образуют сливкообразный слой в виде кольца. Это кольцо отсасывают пипеткой с баллончиком и наносят на предметные стекла. Мазки подсушивают, фиксируют и окрашивают по Цилю — Нильсену.

В последние годы довольно широко применяют люминесцентную микроскопию туберкулезных микобактерий. Светящиеся микобактерии хорошо видны при исследовании мазка сухим объективом (объектив 40X при окуляре 10X). При этом увеличивается поле зрения, что позволяет быстро просмотреть весь препарат, и, следовательно, повышается число находок, особенно при большом количестве производимых в лаборатории анализов.

Бактериоскопические методы не дают возможности отдифференцировать патогенные микробы от многочисленных сапрофитных и атипичных представителей семейства *Mycobacteriaceae*, которые широко распространены в природе (в воде, почве и т. п.). По морфологии клеток некоторые из них очень сходны с туберкулезными, и подчас даже опытный лаборант не может отличить их друг от друга. В некоторых случаях отдифференцировать туберкулезные микобактерии от кислотоупорных сапрофитов помогает длительное (в течение 45—60 мин и более) обесцвечивание в 3% солянокислом спирте окрашенных по Цилю — Нильсену мазков. Часть нетуберкулезных микобактерий в этих условиях может утратить красную окраску. Однако у устойчивых к нескольким противотуберкулезным препаратам микобактерий туберкулеза при длительном обесцвечивании может тоже снижаться интенсивность окрашивания, а некоторые сапрофитные и атипичные микобактерии не обесцвечиваются и при более длительной (в течение нескольких часов) обработке солянокислым спиртом. В связи с тем, что некоторые сапрофитные микобактерии хорошо вегетируют в склянках с дистиллированной водой и в водопроводных трубах, существует большая вероятность принять их за микобактерий туберкулеза при флотации.

Бактериоскопическое исследование материала на туберкулез, таким образом, не дает уверенности ни при положительном, ни при отрицательном ответе.

Бактериологический метод

Имеет большие преимущества перед бактериоскопическим. Он позволяет выявить 20—100 микобактерий в исследуемом материале. Выросшие культуры могут быть подробно изучены и идентифицированы. Наконец, может быть определена чувствительность выделенных туберкулезных микобактерий к этиотропным

химиотерапевтическим препаратам.

Первичное выделение микобактерий туберкулеза из патологического материала производят на элективно-селективных яичных средах. Наибольшее распространение получила среда Левенштейна в модификации Йенсена, рекомендованная инструкцией ВОЗ в качестве стандартной среды для выделения и определения чувствительности микобактерий туберкулеза. На этой среде рост получают на 8—15—25-й день после посева положительного (имеющего туберкулезные микобактерии при бактериоскопическом исследовании) материала. В последнее время многие противотуберкулезные центры рекомендуют среду Финна-П. Она отличается от среды Левенштейна — Йенсена тем, что вместо L-аспарагина в ней используется глутамат натрия. На этой среде рост туберкулезных микобактерий появляется иногда даже несколько раньше, чем на среде Левенштейна — Йенсена; процент выделения культур такой же (по данным некоторых авторов, даже выше на 6—8%), но селективность ее меньше. Для увеличения вероятности получения культуры туберкулезных микобактерий рекомендуется засеивать патологический материал на две среды, например, на 2 пробирки со средой Левенштейна—Йенсена и 2 пробирки со средой Финна-П.

Перед посевом патологический материал нужно сконцентрировать и освободить от сопутствующей флоры. Для этого мокроту, гной и другой материал помещают в стерильную склянку с бусами или битым толстым стеклом и обрабатывают щелочью или кислотой. Жидкие материалы (моча, экссудат и т. п.) предварительно центрифугируют и обрабатывают осадок. При обработке серной кислотой к 15—20 г исследуемого материала добавляют равное количество 10% серной кислоты. Склянку энергично встряхивают в течение 5—7 мин; полученную взвесь центрифугируют 5 мин при 2000 об/мин. Осадок засеивают на 4 пробирки с яичными средами, тщательно втирая материал двойной платиновой петлей в поверхность питательной среды. Вся процедура обработки, включая центрифугирование и посев, не должна длиться более 15 мин. Более длительная экспозиция материала с серной кислотой может понизить у микобактерий туберкулеза способность к росту на средах. При большом количестве посевов удобнее пользоваться для обработки материала 4—6% раствором едкого натра. Щелочь обладает способностью растворять белковые частицы, что способствует быстрой гомогенизации материалов, содержащих гной, слизь и т.п., и высвобождение из этих белковых частиц туберкулезных микобактерий. В склянку с бусами, содержащую исследуемый материал, добавляют двойной объем щелочи и оставляют на 15—30 мин, периодически встряхивая. Затем нейтрализуют 50% хлористоводородной кислотой, в которую добавлен спиртовый раствор лакмуса. Кислоту добавляют каплями до появления фиолетово-розового окрашивания всей взвеси. Взвесь центрифугируют 5—10 мин при 2000 об/мин, сливают центрифугат, а осадок полностью засеивают на 4 пробирки с яичными средами. Обработка материала щелочью более громоздка, чем серной кислотой, но в практической работе более удобна.

Хорошие результаты получают при обработке материалов трехзамещенным фосфатом натрия. Этот метод допускает длительную экспозицию материала с фосфатом натрия без нарушения жизнеспособности микобактерий туберкулеза, что особенно ценно в тех случаях, когда доставка материалов затруднена. Трехзамещенный фосфат натрия достаточно хорошо угнетает сопутствующую флору и даже при 2—3-дневном хранении материала не повреждает или мало нарушает способность микобактерий к росту на питательных средах. Метод состоит в добавлении равного объема 10% раствора трехосновного фосфата натрия к патологическому материалу и инкубации его при 37°C в течение 24 ч. Затем смесь нейтрализуют хлористоводородной кислотой и центрифугируют (как при обработке едким натром). Осадок засеивают на питательные среды.

Можно обойтись без нейтрализации кислотой; в этом случае к осадку после центрифугирования нужно добавить 1 мл среды Школьниковой и полученную взвесь полностью засеять на 4 пробирки с яичными средами. Обработку мокроты фосфатом

натрия можно проводить и другим способом, который удобен тогда, когда мокроту для посева нужно доставить в лабораторию издалека. В этом случае больной собирает мокроту в стерильную плевательницу или широкодонную банку с завинчивающейся пробкой, в которую налито 10 мл 10% раствора трехосновного фосфата натрия. При доставке в лабораторию содержимое плевательницы переливают в стерильные «сахарные стаканчики» или широкие пробирки, центрифугируют, центрифугат сливают, а осадок промывают с соблюдением стерильности 10—15 мл стерильного изотонического раствора хлорида натрия. После повторного центрифугирования жидкость сливают, осадок нейтрализуют или разводят средой Школьников и используют для посева.

Для предотвращения высыхания засеянных сред поверх углубленной на 1—0,5 см внутрь пробирки ватной пробки наливают смесь воска с парафином. При первичном посеве бактериоскопически отрицательного материала на плотные среды средняя продолжительность роста составляет 20—46 дней. Отдельные штаммы растут 60 и даже 90 дней. Это заставляет выдерживать посева в термостате в течение 2—3 мес, еженедельно проверяя появление роста.

Обычно вирулентные культуры туберкулезных микобактерий растут на плотных питательных средах в виде R-форм колоний различной величины и вида. Некоторые штаммы образуют слабый розовато-желтый пигмент, который резко отличается от оранжевого или желтого пигмента сапрофитных или атипичных микобактерий. Последние растут обычно в S-форме. После курса химиотерапии от больных могут выделяться гладкие культуры с влажным ростом (S-формы). Гладкие колонии характерны также для *Myc. bovis*, которые также патогенны для человека. Положительный ответ дают только после бактериоскопии мазка из выросших колоний, окрашенного по Цилю — Нильсену. В мазках обнаруживаются ярко- и темно-красные палочки, лежащие одиночно и группами, образующие переплетения в виде «войлока» или «кос», часто видны темные зерна, особенно в длительно растущих культурах. Интенсивность роста обозначают по 4-балльной системе: плюс — единичные колонии; 2 плюса — от 20 до 100 колоний; 3 плюса — от 100 до 200 колоний и 4 плюса — несчитываемое число колоний. В двух последних случаях имеет место обильное бактериовыделение, которое является показателем активности процесса и (или) неэффективности лечения.

Дифференциация выделенных культур.

В настоящее время идентификация микобактерий представляет большие трудности. С одной стороны, в результате интенсивной и длительной химиотерапии, проводимой туберкулезным больным, изменились биологические и морфологические свойства возбудителя туберкулеза; с другой стороны, участились случаи выделения из патологического материала атипичных микобактерий. Некоторые из атипичных микобактерий могут обусловить патологические процессы в легких, лимфатических узлах и других внутренних органах человека. Это значит, что идентификация выделенных из патологических материалов микобактерий имеет не только теоретическое, но и существенное практическое значение.

Различают:

- 1) микобактерии человеческого типа (*Mycobacterium tuberculosis*);
- 2) микобактерии бычьего типа (*Mycobacterium bovis*);
- 3) микобактерии птичьего типа (*Mycobacterium avium*)
- 4) атипичные микобактерии, которые делят на 4 группы (по Раньону):

Группа I — фотохромогенные бактерии, которые растут в темноте (в термостате) в течение 21—46 дней в виде беспигментных колоний, но после освещения дневным или электрическим светом приобретают желтую или оранжевую окраску. Патогенны для людей.

Группа II — скотохромогенные бактерии; растут медленно (60—90 дней), образуют желто-оранжевый пигмент в темноте. Некоторые из них патогенны: вызывают поражения лимфатических узлов и легких у детей.

пигмента на свету															
Образование пигмента в темноте	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	±	—	+	±	
Рост при 22°C на яичной среде	—	—	±	+	+	+	±	+	+	±	—	+	+	+	
Рост на мясо-пептонном агаре	—	—	—	—	±	±	—	—	—	—	—	+	+	+	
Каталазная активность	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Пероксидазная активность	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Термостабильность каталазы	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Примечание: М — медленный рост на яичных средах (от 15—17 до 90 дней). Б — быстрый рост на яичных средах (от 1 и < до 10 дней).

Определение термостабильности каталазы позволяет отдифференцировать вирулентные для человека микобактерии (человеческого и бычьего типов), у которых она термолабильна, от кислотоупорных сапрофитов и атипичных микобактерии, которые образуют термостабильную каталазу. Для этого 3 мг (3 платиновых лопатки) культуры растирают, добавляя постепенно 3 мл дистиллированной воды; 1,5 мл взвеси переносят в центрифужную пробирку и прогревают на водяной бане при 68°C 10 мин. Затем пробирку охлаждают. На один край предметного стекла наносят каплю прогретой взвеси бактерий, на другой — непрогретую (контроль способности штамма образовывать каталазу). К обеим каплям добавляют по 1 капле 2% пергидроля. Образование пузырьков кислорода в прогретой культуре свидетельствует о термостабильности фермента, отсутствие их в прогретой культуре и наличие в непрогретой — о термолабильности. В табл. 22 представлены результаты комплексного исследования наиболее часто встречающихся видов кислотоустойчивых микобактерий.

Определение чувствительности микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным химиотерапевтическим препаратам.

Чувствительность микобактерий определяют методом серийных разведений. Материалом для посева может служить как исходный материал, так и выделенная из него культура. Исходный материал можно непосредственно засеивать на среды для определения чувствительности бактерий, если в мазке из него, окрашенном по Цилю — Нильсену, содержится не менее 5 микобактерий в поле зрения.

Комитет по химиотерапии ВОЗ предлагает всем координационным лабораториям проводить определение лекарственной устойчивости микобактерий на среде Левенштейна — Йенсена (без крахмала), в которую перед свертыванием добавляют различные концентрации препаратов. Минимальный набор состоит из 2—3 пробирок с различными концентрациями каждого из используемых в данной клинике препаратов, одной контрольной пробирки со средой без препарата.

Для приготовления набора сред с препаратами среду Левенштейна— Йенсена (без крахмала) разливают в колбы по 100 мл и в каждую колбу добавляют 1 мл соответствующего раствора препарата (табл.).

Среду с препаратом тщательно перемешивают, разливают по пробиркам и свертывают при 86°C в течение 1 ч.

Патологический материал перед посевом для определения чувствительности микобактерий обрабатывают трехзамещенным фосфатом натрия или щелочью (6—8% NaOH), как указано выше. Полученный осадок петлей втирают в поверхность среды, стараясь вносить в каждую пробирку одинаковое количество материала.

При определении устойчивости ранее выделенной культуры готовят гомогенную взвесь бактерий в изотоническом растворе хлорида натрия, содержащую 5 единиц в 1 мл (500 млн. микробных тел) по оптическому стандарту. В каждую пробирку вносят 0,1 мл бактериальной взвеси, держа пробирку в горизонтальном положении так, чтобы вся скошенная поверхность равномерно покрывалась взвесью бактерий. Пробирки выдерживают в горизонтальном положении при 37°C 2—3 ч, после чего обжигают в пламени горелки верхушки ватных пробок, которые затем погружают пинцетом в пробирку, заливают смесью воска с парафином и помещают в термостат. Рост обычно появляется на 12—14-й день инкубации, но окончательную проверку производят на 20—21-й день. Интенсивность роста отмечают плюсами: 4 плюса — сплошной сливной рост, 3 плюса — более 100 колоний, 2 плюса — от 50 до 100 колоний, плюс — от 20 до 50 колоний, Е. К. — единичные колонии.

Наибольшая концентрация, при которой микобактерий туберкулеза хорошо растут, является мерой устойчивости штамма. Однако наличие даже единичных колоний, растущих на средах с высокими концентрациями препаратов, означает, что в популяции имеются особи, которые при селективном действии примененного больному препарата могут быстро дать начало высокоустойчивому штамму. Поэтому единичные колонии, хотя они и не характеризуют клиническую устойчивость данного штамма, следует отмечать и при назначении препаратов учитывать.

Критерии устойчивости для микобактерий туберкулеза устанавливают в зависимости от концентрации препаратов в очаге поражения, которая обычно ниже, чем в крови, а также от величины средней и максимальной терапевтической дозы каждого препарата и особенностей его фармакокинетики.

Туберкулезные микобактерии считают устойчивыми, если они растут при концентрациях: стрептомицина — 10 мкг/мл, изониазида — 1 мкг/мл, ПАСК — 10 мкг/мл, этионамида и протионамида — 30 мкг/мл, циклосерина — 50 мкг/мл, теризидона — 50 мкг/мл, канамицина — 30 мкг/мл, вио-мицина — 30 мкг/мл, тибона — 2 мкг/мл, этамбутола — 5 мкг/мл, рифампицина — 20 мкг/мл.

Таблица 22

Схема приготовления растворов противотуберкулезных препаратов для определения чувствительности микобактерий

Препарат	Разведение	Приготовление растворов препарата	Концентрация раствора	Количество, добавляемое к среде, мл	Концентрация препарата в среде, мкг/мл
Стрептомицин	Исходный	200 000 ЕД+2 мл воды*	100	0	0
	1	1 мл(исх.)+9 мл воды	000	1	100
	2	1 мл(1)+9 мл воды	10000	1	10
	3	1 мл(2)+9 мл воды	1000	1	1
ПАСК	Исходный	100 мг+10 мл воды	10000	1	100
	1	1 мл (исх.)+9 мл воды	1000	1	10
	2	1 мл (1)+9 мл воды	100	1	1

Изониазид	Исходный	15 мг+6 мл воды	2500	1	25
	1	1 мл (исх.) +4 мл воды	500	1	5
	2	1 мл (1) + 4 мл воды	100	1	1
Этионамид	Исходный	50 мг+5 мл этилового спирта (растереть)	10000	—	—
	1	3 мл (исх.) + 3 мл воды	5000	1	50
	2	3 мл (1)+2 мл воды	3000	1	30
Протионамид	Исходный	50 Мг+5 мл этилового спирта (растереть)	10000	—	—
	1	3 мл (исх.)+3 мл воды	5000	1	50
	2	3 мл(1)+2 мл воды	3000	1	30
Циклосерин	Исходный	20 мг + 4 мл воды	5000	1	50
	1	3 мл (исх.)+2 мл воды	3000	1	30
Теризидон	Исходный	20 мг + 4 мл воды	5000	1	50 30
	1	3 мл (исх.)+2 мл воды	3000	1	
Канамицин	Исходный	200 мг + 2 мл воды	100000	—	—
	1	1 мл (исх.)+19 мл воды	5000	1	50
	2	3 мл (1) + 2 мл воды	300	1	30
Тибон	Исходный	10 мг 4- 10 мл этилового спирта	1000	—	—
	1	2 мл (исх.) + 2 мл воды	500	1	50
	2	2 мл (1)+3 мл воды	200	1	20
Рифампицин	Исходный	150 мг + 15 мл спирта	10000		
	1	3 мл (исх.) + 3 мл воды	5000	1	50
	2	2 мл (1) + 3 мл воды	2000	1	20
Этамбутол	Исходный	10 мг + 20 мг воды	500	1	5
	1	20 мл (исх.)+3 мл воды	200	1	2

Примечание: * - для приготовления растворов берется дистиллированная вода.

Биологическая проба.

Заражение животных патологическим материалом с целью выявления в нем микобактерий в настоящее время почти полностью вытеснено методом посева. Это связано с тем, что самые чувствительные к туберкулезу животные — морские свинки — оказались резистентными к штаммам, которые приобрели устойчивость к гидразидам изоникотиновой кислоты. Однако заражение различных лабораторных животных и изучение морфологических реакций в их органах и тканях на внедрение микобактерий и продуктов их жизнедеятельности являются основным критерием вирулентности и одним из дифференциальных тестов при определении видовой принадлежности микобактерий. В последнем случае используют различия в патогенности для белых мышей, кроликов, морских свинок и цыплят. Перед заражением морским свинкам массой тела 200—250 г ставят реакцию Манту, вводят 0,02 мл альтотуберкулина Коха внутрикожно в наружную поверхность бедра и столько же бульона в другую лапку. Через 48 ч при отрицательной реакции морскую свинку можно брать в опыт. Заражение производят подкожно, обычно в паховую область. Через 2—3 нед зараженную морскую свинку взвешивают, определяют наличие и размеры регионарных (паховых) лимфатических узлов (пальпаторно) и повторно ставят реакцию Манту. То же повторяют через 6 нед и далее. При отрицательных

реакциях животное забивают через 4 мес и исследуют печень, селезенку, легкие, лимфатические узлы гистологически и бактериологически. О вирулентности штамма судят по количеству специфических изменений в органах, продолжительности жизни животного, падению массы тела и т. п. Помимо подкожного, можно применить интратестикулярное заражение морских свинок патологическим материалом. При таком способе заражения удастся чаще выявить туберкулезные микобактерии, если даже они изониазидоустойчивые и слабовирулентные. Ежедневное введение кортизона снижает иммунореактивность морских свинок и повышает частоту выделения микобактерий туберкулеза.

Серологические исследования

Предложено большое количество реакций направленных на выявление либо антигенов микобактерий туберкулеза либо антител к ним (например реакции агглютинации, непрямой гемагглютинации, преципитации в геле, реакция связывания комплемента), однако они либо не обладают необходимой специфичностью, либо дают ложноположительные результаты на антитела и антигены других микобактерий.

Кожные пробы с туберкулином являются наиболее значимыми, т.к. позволяют проводить широкомасштабные скрининговые исследования.

Осуществляется введением небольших доз (5 Ед) туберкулина внутрикожно. Результат учитывают через 48 – 72 часов, в месте внедрения формируется папула с гиперемизированными краями. Положительная реакция указывает на инфицирование человека, т.е. на его контакт с антигенами туберкулезных микобактерий. Отрицательная реакция – отсутствие папулы (показания к ревакцинации). Положительная реакция:

нормергическая – папула 5 мм и более

гиперергическая – папула 12 – 17 мм

ЛИСТЕРИОЗ

Листерииоз – природно-очаговое заболевание с множественными источниками инфекции, протекающее в большинстве случаев с поражением нервной системы или в виде ангинозно-септической формы.

Семейство *Corynebacteriaceae*, род *Listeria* включает несколько видов, среди которых наибольшее значение в патологии человека имеет *L. monocytogenes*.

Морфология и тинкториальные свойства.

Листерии – короткие палочки, морфологию и размеры которых определяют условия культивирования. В молодых культурах листерии представлены палочками или коккобациллами 1 – 2х 0,5 мкм, в старых достигают в длину 5 мкм или принимают нитчатую форму. Спор, капсул не образуют, кислотоустойчивы. Перитрихи.

Молодые культуры, выращенные при 20-25⁰С, подвижны. В старых культурах листерии теряют жгутики. Культивирование при 37⁰С приводит к резкому снижению подвижности, вплоть до ее полной потери. Грамположительны, но через 2 – 5 сут. начинают терять устойчивость к окрашиванию и в старых культурах грамотрицательны.

Биологические свойства.

Листерии – аэробы, требовательны к условиям культивирования. В настоящее время для культивирования применяют следующие питательные среды:

1. Глюкозо-глицериново-сывороточный агар и бульон
2. Глюкозо-печеночно-мясной агар и бульон
3. Печеночный бульон
4. Кровяной агар
5. Бульон, агар приготовленный на мартеновском пептоне с 0,1% глюкозы.

Температурный диапазон роста микроорганизмов 18⁰С - 40⁰С, при оптимуме 30⁰С - 37⁰С, способны медленно развиваться при температуре 4⁰С, рН 7,2 – 7,4.

Изолированные колонии мелкие 1 – 2 мм, на средах с глюкозой могут достигать больших размеров. Гладкие, выпуклые, прозрачные, бесцветные или нежно-голубые, в падающем свете серовато-молочные. На кровяном агаре окружены зоной β-гемолиза.

S – колонии диссоциируют в R колонии. R – колонии шероховатые с утолщенным зубчатым краем. S-R переход сопровождается снижением гемолитической активности и потерей вирулентности.

На жидких питательных средах дают диффузное помутнение с последующим выпадением осадка.

На полужидких средах дают рост по уколу, более обильный у поверхности с отходящим помутнением.

Листерии продуцируют эндотоксин. Образуют листериолизин O, фосфолипазы.

Основным фактором вирулентности листерий является листериолизин, вызывающий повреждение мембран фаголизосом. Фосфолипазы вызывают растворение клеточных мембран, чем облегчают проникновение *L. monocytogenes* в клетки, в том числе и в макрофаги, что и защищает возбудителя от действия антител. Этот процесс нарушает подвижность макрофагов и приводит к их аккумуляции в крови и наблюдается моноцитоз.

У листерий выявлены O и H – антигены. 5 термолabileных жгутиковых и 14 термостабильных углеводных соматических. По антигенной структуре выделено 16 сероваров. Три из них 4b, 1/2b, 1/2a вызывают 90% всех случаев листериоза человека.

Эпидемиология, патогенез

Основным природным резервуаром являются грызуны, насекомоядные и птицы, а также большинство сельскохозяйственных и домашних животных. Из организма животных возбудитель выделяется с мочой, испражнениями, молоком, околоплодной жидкостью.

Основные пути заражения для человека - контактный, алиментарный, аэрогенный, трансмиссивный. Заболевание чаще носит спорадический характер, и регистрируется во всех возрастных группах, чаще у лиц с иммунодефицитами, новорожденных. У женщин листерии выделены из влагалища и шейки матки. Доказана возможность бессимптомного носительства возбудителя. Наибольшую опасность представляет носительство у беременных, т.к. возможно трансплацентарное заражение плода.

Входные ворота миндалина, слизистые оболочки глаз, дыхательных путей, полости рта, кишечника. Из входных ворот листерии попадают в лимфатические узлы, кровь, с нею в органы, в том числе и паренхиматозные, где размножаются, образуя милиарные узелки с некрозом в центре. Развивается интоксикация эндотоксином, кроме того листерии секретируют α – и β – гемолизин, имеют связанный с клеткой моноцитостимулирующий фактор. По характеру проявлений различают следующие клинические формы: ангинозно-септическую, септико-тифозную, листериоз ЦНС, листериоз беременных, сепсис новорожденных и др.

Внутриутробное заражение плода обычно приводит к выкидышам.

Микробиологическая диагностика

Материалом для исследования являются: кровь, СМЖ, слизь из зева, пунктаты лимфатических узлов, секционный материал, у новорожденных миконий, пупочная кровь. Забор материала необходимо производить в первые 7 – 10 сут. болезни.

Применяются следующие методы микробиологической диагностики:

- Бактериологический
- Серологический
- Биологический

Бактериологический метод

Основной метод диагностики листериоза. Материал от больного микроскопируют и после выявления Гр+ палочек засевают на глюкозо-печеночный или глюкозо-красный агар. Через 24 часа культивирования при 37⁰С отбирают типичные колонии и пересевают на скошенный агар с последующей идентификацией.

Возможно пересевать колонии на триптозный агар, на котором суточные колонии листерий при косом освещении имеют сине-зеленую окраску.

Для предупреждения прорастания контаминирующей микрофлоры в питательную среду вносят 0,05% теллурида К, либо загрязненный материал засевают в триптозно-фосфатный бульон с нитрофуразоном (1:40000) с последующим посевом на фенилэтаноловый агар с 7% лошадиной сывороткой и нитрофуразоном (1:40000).

10 мл крови засевают на 100 мл глюкозного, глюкозо-печеночного или глюкозо-глицеринового бульона и инкубируют при температуре 37⁰С до 3 недель с ежедневным просматриванием посевов. При изменении питательной среды пересевают на твердые питательные среды с последующей идентификацией выросших колоний.

Листерии идентифицируют по следующим признакам:

восстановление нитратов -- , подвижность + , каталаза + , гидролиз эскулина + , β – гемолитиз + , сбраживание и окисление глюкозы + , маннит - , рамноза + , ксилоза - , крахмал - , гидролиз гиппурата + , патогенность для мышей +.

Биологический метод

Используются белые мыши, иммуносупрессированные введением кортизона (4 – 5 мг в/м за 4 часа до заражения). После гибели животных (обычно на 2 – 6 сут) проводят посев крови, материала из печени, селезенки на питательные среды с последующей идентификацией. Листерии размножаются в мертвых тканях и для избежания диагностических ошибок часть патологического материала помещают в стерильную пробирку и хранят в течение 5 – 10 сут при 4 - 6⁰С, а затем подвергают повторному исследованию.

Серологический метод

Специфические антитела определяют в реакции агглютинации (РА), РНГА, РСК. Реакции положительны и специфичны со 2 недели заболевания с последующим нарастанием титров антител. Последние сохраняются до 2 лет после выздоровления и РА с листериозными антигенами может быть использована для ретроспективного анализа.

Кампилобактериоз

Возбудители кампилобактериоза, чаще протекающего в виде острых гастроэнтеритов, относятся к семейству *Campylobacteriaceae* , роду *Campylobacter*, включающему 13 видов, из которых наибольшее значение в патологии человека имеют *C.jejuni*, *C. coli*, *C.lari*, *C. fetus* подвид *fetus*.

Морфология и тинкториальные свойства

Кампилобактеры- спиральные бактерии (могут иметь один или несколько завитков), чаще изогнуты S-образно или в виде крыльев чайки. В стареющих культурах представлены кокковыми и гиперспирализованными формами. Средние размеры 0,5-5х 0,2-0,8 мкм. Подвижны. Монотрихи или амфитрихи. Спор и капсул не образуют. Грамотрицательны, легко окрашиваются спиртовыми и водными растворами анилиновых красителей; в тоже время в природных субстратах, главным образом фекалиях, плохо окрашиваются по Граму.

Биологические свойства

Кампилобактеры – микроаэрофилы и капнофилы, т.е. микроорганизмы, требующие для культивирования пониженного содержания кислорода и повышенного содержания углекислого газа. Способны к росту при температуре 37⁰С-44⁰С, но не при 25⁰С.Оптимальная температура роста 42⁰С, рН 7,0-7,2, газовая среда – смесь из 5% кислорода, 85% азота и 10% углекислого газа.

Требовательны к составу питательных сред, в которых обязательно должны содержаться 7%- 10% эритроцитов и смесь антибиотиков. Для культивирования применяют железо- эритрит-кровяной агар, эритрит агар, среда АГВ, а также транспортная среда и среда для культивирования кампилобактеров – мясо-пептоно-печеночный агар. Для подавления роста сопутствующей микрофлоры в питательные среды необходимо добавлять смесь антибиотиков:

Смесь 1 – рифампицин 20 мг/л, фузидин 10 мг/л, цефалотин 15 мг/л.

Смесь 2 – полимиксин В 2мг/л, рифампицин 10 мг/л, амфотерицин В 3 мг/л, ристомидин 10 мг/л.

Антибиотики вносят во флакон с дистиллированной водой и 5-7 каплями этилового спирта и растворяют при обязательном перемешивании.

На плотных питательных средах кампилобактеры образуют два типа колоний. Первые встречаются чаще и имеют плоскую округлую форму, 2-8 мм в диаметре, ровные края, бесцветные или светло-серые, прозрачные, не вызывают гемолиза. На полужидких средах растут в виде диска, расположенного на глубине 1-2 мм от поверхности питательной среды. На жидких средах образуют равномерное помутнение с выраженным осадком.

Кампилобактеры оксидазоположительны, большинство каталазоположительны, инертны к углеводам, большинство восстанавливают нитраты, образуют сероводород, реакция <<Фогес-Проскауэра>> отрицательна.

Бактерии образуют термолабильный и термостабильный энтеротоксин. Термолабильный энтеротоксин по механизму действия напоминает диареогенные токсины эшерихий и холерного вибриона, повышая уровень внутриклеточного цАМФ. Термостабильный энтеротоксин высвобождается после гибели кампилобактеров и проявляет все свойства эндотоксинов грамотрицательных бактерий.

К группе факторов патогенности относятся жгутики, поверхностные специфические адгезины.

Эпидемиология и патогенез

Кампилобактеры обнаружены практически у всех видов диких и домашних животных, многие из которых являются их естественными резервуарами.

Основной путь передачи – алиментарный, реже бытовой.

Инкубационный период 2-5 сут. Кампилобактеры резистентны к действию желчи и быстро колонизируют слизистую кишечника, легко проникают через мембрану эпителиальных клеток и межклеточные пространства. Колонизация кишечника приводит к развитию воспалительных изменений, отеку, гиперплазии слизистой оболочки, появлению эрозий, образующихся при слиянии крупных изъязвлений. Основные проявления инфекции- гастроэнтерит, острый колит.

Абсолютным показанием к исследованию кампилобактериоз является гемоколит.

Исследуемый материал

С целью обнаружения кампилобактеров исследуются испражнения (0,8-1,0г), содержимое прямой кишки, полученное путем ректального мазка с глубины не менее 8см, выполненного с помощью петли с внутренним диаметром 0,8-1,0 см. После забора материала петля помещается в пробирку с транспортной средой. Забор материала производят сразу после дефекации в ранние сроки заболевания до начала антибиотикотерапии и далее в течение всего срока заболевания при появлении крови в стуле.

При обследовании резервуаров исследуются фекалии, фрагменты кишечника погибших животных, корм, вода, смывы с поддонов.

Допускается хранение исследуемого материала в течение 1 час при температуре 4⁰С. При необходимости транспортировки исследуемого материала в течение времени превышающего 1 час следует применять транспортные среды:

Физиологический раствор (срок хранения исследуемого материала 3-5 час)

0,1% пептонная вода (срок хранения исследуемого материала 3-48 час) ТГС

(срок хранения исследуемого материала до 3 сут)

Соотношение исследуемого материала и транспортной питательной среды 1:3, 1:5.

Перед исследованием материал разводят 1:10 стерильным физиологическим раствором и тщательно имульгируют.

Микробиологическая диагностика

Применяют бактериоскопический, бактериологический и серологический методы диагностики.

Бактерископический метод

Проводят исследование тонкого мазка, окрашенного 1% раствором фуксина в течение 10-30 сек, что позволяет обнаружить спиралевидные или S-образные бактерии, а также применяют фазово-контрастную микроскопию суспензии испражнений в жидкой среде.

Бактериологический метод

Является основным методом диагностики кампилобактериозов.

Выделение чистых культур осуществляется шпателем или с помощью мембранных фильтров. В первом случае 0,1 мл эмульсии фекалий наносят на питательные элективные среды и растирают шпателем. Посевы инкубируют при 42⁰ С в течение 72 час. Во втором случае используют мембранные фильтры «Владипор» №6 с диаметром пор 0,55-0,65 мкм, уложенные на поверхность питательной среды не содержащей антибиотиков. На поверхность фильтров пипеткой Пастера наносят 4-5 капель исследуемого материала. На одну чашку Петри может быть засеян материал 3 образцов. После экспозиции в течение 30 мин при 37⁰ фильтры удаляют с поверхности питательной среды и посевы инкубируют при 37⁰С 72час. Инкубация посевов проводится в микроаэрофильных условиях, которые создаются применением анаэростата и газовой смеси заводского изготовления (5% кислорода, 10% углекислого газа, 85% азота), сжиганием бытовой свечи в стеклянном эксикаторе с плотно притертой крышкой или в пространстве анаэростата с одновременным откачиванием воздуха до «- 0,8 атм» шкалы манометра микроанаэростата.

Посевы ежедневно просматривают с помощью бинокулярной оптической системы в проходящем и падающем свете. Из колоний, типичных для кампилобактера, готовят мазки и окрашивают 1% раствором фуксина или генцианвиолета. При обнаружении в мазках бактериальных клеток, типичной для кампилобактера морфологии, проводят пересев колонии на скошенный агар с элективной средой. Посевы инкубируют при 42⁰С в течение 48 час в микроаэрофильных условиях.

Выросшую культуру идентифицируют (табл. 24).

Дифференциальные признаки рода Кампилобактер

Вид	Подвижность в раздавленной капле	Температурные условия роста		Гидролиз гиппурат	Образование	Образование	Восстановление нитратов	Чувствительность к	
		25 ⁰ С	42 ⁰ С					цефалот	Налидок
<u>C. coli</u>	+	--	+	-	+	±	+	--	+
<u>C. fetus</u>	+	+	±	+	+	--	--	+	--
<u>C. jejuni</u>	+	--	+	+	+	--	+	--	+
<u>C. lari</u>	±	--	+	--	±	+	+	+	--

Серологический метод

Для выявления специфических антител применяют РА, РСК, РНГА. Через 10 сут после инфицирования титр антител составляет 1:8-1:32.

Внутрибольничные инфекции

Внутрибольничными или госпитальными инфекциями считают такие инфекционные заболевания, которые возникают у человека в результате пребывания и лечения в стационаре или обращения его в лечебное учреждение за медицинской помощью, а также у сотрудников медицинских учреждений, инфицирующихся во время проведения лечебных и диагностических процедур.

Внутрибольничные заболевания снижают эффективность лечения в стационаре, увеличивают сроки госпитализации, повышают летальность, наносят значительный экономический ущерб. По данным различных авторов, частота внутрибольничных инфекций варьирует от 6% до 27% в зависимости от специфики стационара. Наиболее восприимчивыми к больничным инфекциям являются больные хирургических и урологических стационаров, а также родовспомогательных учреждений.

Внутрибольничные инфекции присоединяются к основному заболеванию и характеризуются высокой контагиозностью, широким спектром возбудителей и разнообразием путей их передачи, возможностью вспышек в любое время года.

Этиология внутрибольничных инфекций

Спектр возбудителей внутрибольничных инфекций широк и включает: вирусы, бактерии, грибы, простейшие. В настоящее время наиболее часто выделяются среди бактериальных инфекций золотистый и эпидермальный стафилококки, грамотрицательные энтеробактерии, протей, псевдомонады, клебсиеллы, бактероиды, грибы рода *Candida*. Заболевания могут быть вызваны патогенными микроорганизмами: гепатит В, С, D; ВИЧ, грипп, сальмонеллез, энтеровирусные, аденовирусные, герпетические и цитомегаловирусные инфекции, хламидиозы (таблица 25).

Указанные микроорганизмы обуславливают как спорадические случаи заболевания, так и вспышки внутрибольничных инфекций. Штаммы бактерий, выделенные от больных, характеризуются высокой вирулентностью и обладают множественной химиорезистентностью.

Основные причины внутрибольничных заболеваний

Выделяют следующие основные причины возникновения и роста внутрибольничных инфекций:

1. Медицинские манипуляции и их характер. Возрастает роль инвазивных лечебных и диагностических процедур, особенно плановые и экстренные хирургические вмешательства.
2. Создание больших клинических комплексов, скученность в стационаре, замкнутость помещения создают условия для формирования госпитальных штаммов микроорганизмов, обладающих высокой лекарственной устойчивостью
3. Нахождение в стационаре бактерионосителей среди больных и медицинского персонала.
4. Нарушение санитарно-гигиенического режима в лечебном учреждении, связанного с неправильной обработкой помещений, с соблюдением чистоты воздуха в операционных, реанимационных, перевязочных, родильных отделениях. Нарушение персоналом правил асептики и антисептики, личной гигиены.
5. Нерациональная терапия антибиотиками, гормональными препаратами и другими химиотерапевтическими препаратами, снижающими иммунореактивность больных.

Таблица 25

Основные возбудители внутрибольничных инфекций

Бактерии	Вирусы	Простейшие	Грибы
Стафилококки	HBV, HCV, HDV	Пневмоцисты	Кандида
Стрептококки	HIV		Аспиргиллы
Синегнойная палочка	Вирусы гриппа и Другие ОРВИ	Криптоспоридии	
Энтеробактерии	Вирус кори		
Эшерихии	Вирус краснухи		
Сальмонеллы	Вирус эпидемиологического		

	паротита		
Шигеллы			
Иерсинии	Ротавирус		
Мистерия			
Камбиллобактерии	Энтеровирусы		
Легионеллы	Вирус герпеса		
Клостридии	Цитомегаловирус		
Неспоробразующие анаэробные бактерии			
Микоплазмы			
Хламидии			
Микобактерии			
Бордетеллы			

Характеристика источников внутрибольничных инфекций

1. Основными источниками внутрибольничных инфекций являются больные или бактерионосители различных видов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов.
2. Медицинский персонал (врачи, медицинские сестры, санитарки).
3. Матери в акушерских стационарах и отделениях для детей раннего возраста - носители или больные со стертыми формами.
4. Лица, привлекающиеся к уходу за больными, а также посетители, навещающие больных.

Пути передачи возбудителей внутрибольничных инфекций

1. Воздушно-капельный.
2. Контактно-бытовой через предметы ухода за больным, белье, медицинский инструментарий, аппаратуру, руки персонала.
3. Парентеральный – при введении препаратов крови, растворов, а также при прямом переливании крови от доноров.
4. Алиментарный (продукты питания, лекарства, растворы, некачественно изготовленные или неправильно хранимые).
5. От матери к плоду в акушерских отделениях.

Ворота проникновения возбудителя внутрибольничных инфекций

Дыхательные пути, желудочно-кишечный тракт, нарушенные кожные покровы и слизистая оболочка.

Эпидемиология

Внутрибольничную инфекцию регистрируют повсеместно, в виде вспышек или спорадических случаев. Практически любой пациент стационара предрасположен к развитию инфекционных процессов. Внутрибольничные инфекции характеризуются высокой контагиозностью, широким спектром возбудителей и разнообразными путями их передачи: возможность вспышек в любое время года, наличие пациентов с повышенным риском заболевания и возможность рецидивов. Особенности эпидемиологического процесса зависят от свойств возбудителя, типа учреждения, контингента больных, качества организации медицинской помощи, санитарно-гигиенического и противоэпидемического режимов. Большую роль играет значительное обсеменение объектов окружающей среды вследствие активной циркуляции госпитальных штаммов условно патогенной микрофлоры между больными и персоналом, способствующего

формированию нового контингента носителей. В связи с этим очень важно контролировать эпидемиологическую обстановку в конкретном стационаре и соответствующим образом корректировать практику лечения внутрибольничных инфекций.

Основные варианты внутрибольничных инфекций и их этиология

Бактериемия и септицемия.

Спектр возбудителей данных заболеваний довольно широк, и согласно рекомендациям ВОЗ все микроорганизмы разделены по уровням приоритетности:

Микроорганизмы высокого уровня приоритетности:

- Сальмонеллы
- Грамотрицательные энтеробактерии
- Менингококки
- Стрептококки – пиогенный пневмококк, зеленающие.

Микроорганизмы среднего уровня приоритетности:

- Гемофильная палочка
- Бактероиды
- Синегнойная палочка

Микроорганизмы низкого уровня приоритетности:

- Candida albicans и Cryptococcus neoformans
- Бруцеллы
- Pseudomonas pseudomallei
- Другие неферментирующие грамотрицательные бактерии.

Клинически сепсис, бактериемия проявляется как сильный озноб, лихорадка, токсикоз. Для установления этиологической роли в данном заболевании необходимо выделение микроорганизма из крови больного.

Гнойно-воспалительные инфекции.

Микроорганизмы, вызывающие гнойно-воспалительные процессы, весьма разнообразны и зависят от места локализации очага, причины возникновения. Наиболее часто возбудителями гнойно-воспалительных инфекций кожи являются стафилококки, бета-гемолитические стрептококки; при перитоните в материале больного обнаруживаются грамотрицательные бактерии, анаэробные палочки (*Bacteroides fragilis*) и клостридии. Послеоперационные гнойные осложнения обусловлены следующими возбудителями: стафилококки, стрептококки, бактероиды, клостридии и т.д. В воспалительных процессах участвуют, как правило, несколько микроорганизмов, но ведущее значение следует отдавать тем видам, количество которых преобладает в данной ассоциации, для этого используют критерии количественной оценки микробного роста.

Ожоговые инфекции.

Основными возбудителями ожоговой инфекции являются *St.aurens*, *P.aeruginosa*. Инфицирование ожоговых поверхностей происходит бактериями, содержащимися в одежде больного, медицинского персонала, в воздухе, а также микроорганизмами, являющимися обитателями кожи и слизистых больного. Наибольшую опасность для больного представляют госпитальные штаммы микроорганизмов, обладающие высокой устойчивостью к антибиотикам.

Заболевания дыхательных путей.

Основными вариантами внутрибольничных инфекций с поражениями верхних дыхательных путей являются пневмония, бронхит, ринит, фарингит, абсцессы легких.

Возбудителями данных заболеваний чаще всего являются вирусы (риновирусы, аденовирусы, вирус гриппа, парамиксовирусы и другие). Внутрибольничные пневмонии могут быть вызваны *H.influenzae*, *S.aureus*, *S.pneumoniae* и другими микроорганизмами. При длительном стационарном лечении могут присоединяться другие микроорганизмы, в том числе «госпитальные» штаммы.

Урогенитальные инфекции.

Возбудителями гнойно-воспалительных процессов мочевого тракта являются грамотрицательные бактерии: *E.coli*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus*, *Candida*, хламидии, которые могут вызвать заболевания пиелонефрит, простатит, уретрит, в тяжелых случаях – уросепсис.

Профилактика внутрибольничных инфекций

Для профилактики и борьбы с противооперационными инфекциями и гнойными осложнениями организуют и проводят комплекс санитарно-гигиенических мероприятий, направленных на выявление и изоляцию источников инфекции, и перерыв путей передачи. Комплекс включает: своевременную изоляцию в специальные отдельные палаты больных, у которых послеоперационный период осложнился гнойно-септическими заболеваниями, своевременное выявление носителей патогенных микроорганизмов и санацию, применение высокоэффективных методов обеззараживания рук медицинского персонала и кожи операционного поля, организацию централизованной стерилизации белья, перевязочного материала, инструментов, использование методов и средств дезинфекции обработки различных объектов среды (постельные принадлежности, личный инвентарь, одежда, обувь, посуда и т.д.), имеющих эпидемиологическое значение в механизме передачи внутрибольничной инфекции. Кроме того, важное место в организации профилактики внутрибольничных инфекций уделяется выделению возбудителей заболеваний, их состава, степени вирулентности, чувствительности к антибиотикам.

В профилактике внутрибольничных инфекций большое значение имеет организация работы медицинского персонала. При общении с больными все сотрудники должны использовать специальную одежду, маски и перчатки, выполнять все установленные правила гигиены, асептики и антисептики. Особое внимание им уделяют при работе в перевязочных, операционных и процедурных кабинетах.

Общие меры профилактики имеют большое значение в предотвращении распространения внутрибольничных инфекций. В стационарах должен проводиться микробиологический контроль, который включает бактериологическое обследование объектов внешней среды на наличие микроорганизмов, способных вызвать внутрибольничные инфекции.

Лидирующее место в структуре профилактических мер занимает контроль за использованием антибиотиков в стационаре, в том числе ограничение использования антибиотиков широкого спектра действия.

Среди специфических средств профилактики и лечения внутрибольничных инфекций разработаны вакцины (вакцина поликомпонентная из антигенов условно патогенных микроорганизмов, вакцина стафилококковая, анатоксин стафилококковый, вакцина протейная, стафило-протейно-синегнойная вакцина, анатоксин синегнойной палочки, синегнойная вакцина).

Краткая характеристика грамотрицательных бактерий – часто вызывающих внутрибольничные инфекции.

Протей.

Род *Proteus* относится к семейству Enterobacteriaceae и включает в себя три вида, два из них (*P. Vulgaris* и *P. mirabili*) являются возбудителями гнойно-воспалительных заболеваний.

Морфологически – все виды рода *Proteus* грамотрицательные палочки размером 0,4-0,6×1,3×3,2 мкм, спор и капсул не образуют, имеют перетрихально расположенные жгутики. Иногда встречаются варианты протей, лишенные жгутиков.

Протей хорошо культивируется на простых питательных средах при температуре 37 градусов, рН 7,2-7,4. На плотных средах протей, имеющие жгутики характеризуются ползучим ростом (феномен роения) голубовато серого цвета. Неподвижные протей (О-форма) растет на МПА в виде крупных колоний с ровными краями.

Род *Proteus* ферментирует глюкозу с образованием кислоты и газа. *P. vulgaris* разлагает мальтозу, сахарозу, арабинозу с образованием кислоты и газа, продуцирует уреазу, образует индол. Виды протей дифференцируют по дополнительным биохимическим тестам (табл.).

Антигенная структура характеризуется наличием у протей термостабильного соматического О-антигена (49 серотипов) и жгутикового термолабильного Н-антигена (19 серотипов).

Патогенез. Протей является условно-патогенным микроорганизмом и при снижении резистентности организма может вызвать различные формы гнойно-воспалительных и септических заболеваний: цистит, пиелит, гнойное осложнение ран и ожоговых поверхностей, отиты, конъюнктивиты, плевриты, абсцессы, пневмонию, сепсис.

Протей может быть самостоятельным возбудителем гнойных процессов или участвовать в ассоциации с другими микроорганизмами (*E. Coli*, *S. aureus*, *Klebsiella*). Патогенное действие протей на организм обусловлено следующими ферментами: лецитиназой, гиалуронидазой, протеиназой, гемолизином, эндотоксином.

Источником заболевания является больной человек или носитель. Путь передачи – контактный или алиментарный. Поражает – слизистые кишечника, мочеполовой системы, а также кожа при нарушении ее целостности. При массивном инфицировании макроорганизма болезнь протекает по типу пищевой токсикоинфекции. Протей распространяется по организму лимфогенным или гематогенным путем с возникновением вторичных очагов и степень тяжести заболевания зависит от дозы попавшего возбудителя и состояния макроорганизма. Для диагностики протейной инфекции используют бактериологический метод с выделением чистой культуры из мочи, испражнений, гнойного отделяемого из ран.

Клебсиеллы.

Род *Klebsiella* относится к семейству Enterobacteriaceae и существует несколько видов. Важную роль в патологии человека играет вид *Klebsiella pneumoniae*, который подразделяется на три вида: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* и *K. rhinoscleromatis*. Клебсиеллы по морфологии представляют собой прямые неподвижные эллипсоидные палочки размером 0,3-5×5-8 мкм, имеют выраженную капсулу, которая обнаруживается у штаммов микроорганизма, непосредственно выделенных от человека. После культивирования на питательной среде, под воздействием низкой температуры, сыворотки, антибиотиков-бактерии могут терять способность к капсулообразованию. Спор не образуют, жгутики отсутствуют.

Клебсиеллы хорошо растут на простых питательных средах, хемоорганотрофы, оксидаза – отрицательные и каталаза – положительные. Оптимальная температура роста 35⁰ – 37⁰ С, рН 7,2 – 7,4. На плотных питательных средах образуют мутные слизистые колонии, на МПА вызывают интенсивное помутнение – иногда со слизистой пленкой на поверхности.

Клебсиеллы ферментируют глюкозу до образования кислоты и газа (*K. pneumoniae*, *K. ozaenae*) лактозу до кислоты, не разжижают желатин, не продуцируют индол и сероводород. *K. rhinoscleromatis* не ферментирует глюкозу, не выделяет индол и сероводород.

В клебсиеллах выделены капсульные (K) и соматическое (O) антигены, безкапсульная форма не содержит K антигена. По O антигену выделяют 11 сероваров, по K – 82.

Патогенез. Клебсиеллы являются возбудителями внутрибольничной инфекции. Источником заболевания является больной человек или бактерионоситель. Путь передачи алиментарный, контактный, воздушно-капельный.

Входными воротами являются верхние дыхательные пути, мочевыводящие пути, ЖКТ. В зависимости от подвида клебсиелл развивается соответствующее заболевание. Так *K. pneumoniae* вызывает поражение дыхательных путей (пневмонии, бронхиты и бронхопневмонии), *K. ozaenae* поражает слизистую оболочку и его придаточные пазухи с последующей атрофией слизистой, образование плотных корок, *K. rhinoscleromatis* вызывает хроническое грануломатозное заболевание дыхательных путей. На слизистой носа, гортани, трахеи развиваются специфические гранулемы с последующим склерозированием и развитием хрящевидных инфильтратов.

Микробиологическая диагностика предусматривает выделение чистой культуры возбудителя из мокроты, слизи, мочи, крови, испражнений и последующей дифференциацией по культуральным, биохимическим и серологическим свойствам.

Синегнойная палочка

Род *Pseudomonas* относится к семейству *Pseudomonadaceae* и содержит более 20 видов. Возбудителем внутрибольничных инфекций чаще всего из рода псевдомонад является синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*), которая вызывает гнойное – воспалительное заболевание (сепсис, остеомиелит, артрит, плеврит, воспаление мочеполовой системы) и различные осложнения после операционных ран и ожогов.

Синегнойная палочка размером 1 – 3×0,5 – 1 мкм, имеет жгутики. Спор не образует, капсулы не имеет, но продуцирует слизь, которая тонким слоем окружает бактерию. Синегнойная палочка хорошо растет на простых питательных средах в аэробных условиях при температуре 30 – 37⁰ С, а также при 42⁰ С, рН 7,2 – 7,5. На плотных питательных средах через сутки образует крупные колонии (3 – 5 мм) с волнистыми краями сероватого цвета с перламутровым оттенком и имеет специфический запах жасмина или карамели. Характерным свойством синегнойной палочки является появление в процессе роста синезеленого цвета культуры и питательной среды за счет выделения пигмента пиоционина.

Синегнойная палочка ферментирует глюкозу с образованием кислоты без газа, оксидаза – положительная, разжижает желатин, свертывает сыворотку крови, гидролизует казеин.

Патогенез. Синегнойная палочка относится к числу условно – патогенных микроорганизмов и у лиц со сниженной резистентностью может вызвать воспалительные процессы в области дыхательных путей, органов пищеварения, мочеполовой системы, ожоговой поверхности, травмированной ткани. Источником заболевания является больной человек или бактерионоситель. Путь передачи – контактный, реже алиментарный. Входными воротами является раневая поверхность ожоговой, механической или операционной травмы. Основными факторами патогенности синегнойной палочки является комплекс экзотоксинов (гемотоксин, лейкоцидин, энтеротоксин) и эндоксинов выделяющихся при гибели бактерий. Из других токсических субстанций играет роль в патогенезе – ферменты: нейроминидаза, протеаза, коллагеназа. Для диагностики синегнойной инфекции используется бактериологический метод с последующей идентификацией по биохимическим и культуральным свойствам (табл).

Диагностика внутрибольничных инфекций

Бактериологический контроль за объектами в лечебных стационарах осуществляется Санэпиднадзором не реже одного раза в квартал, бактериологические лаборатории лечебных учреждений контролируют соблюдение противоэпидемического режима не реже одного раза в месяц. По эпидемическим показаниям при возникновении внутрибольничных инфекций бактериологический контроль проводят внепланово.

Объектами исследования являются:

- воздушная среда
- предметы обихода
- аппаратура
- кожа рук обслуживающего персонала
- патологический материал

Отбор проб на исследование и выделение грамтрицательных потенциально патогенных бактерий.

Исследование воздушной среды проводят в операционных, перевязочных, палатах, отделениях реанимации и интенсивной терапии. Пробы воздуха отбирают аспирационным методом с помощью прибора ПАБ-1. Объем исследуемого воздуха должен составлять от 500 до 1000 литров. При отсутствии прибора исследование воздуха на грамтрицательную микрофлору проводят методом седиментации. Чашки Петри с селективными средами без крышек помещают на стол, тумбочку, подоконник и выдерживают 2-4 часа. Посев воздуха проводится на модифицированную среду Эндо или жидкие среды накопления: мясопептонный бульон, 1% пептонную воду с последующим подращиванием в термостате в течение 16-18 часов при температуре 37°C. Далее осуществляется пересев из жидких сред накопления на среду Эндо, которую выдерживают 18-24 часа при температуре 37°C. Для дальнейшего исследования отбирают не менее двух колоний одного вида.

Отбор проб с предметов обихода, аппаратуры, кожи рук обслуживающего персонала.

Бактериологическому контролю подлежат следующие объекты:

- в операционных и перевязочных: операционный и перевязочный стол, стол медицинской сестры, поверхность раковин, таз для мытья рук, край раковины, перчатки, кожа рук персонала.
- наркозная аппаратура
- в палатах для больных: кровати, тумбочки, дверные ручки.

Отбор проб осуществляется методом смывов. Смывы с поверхностей обихода, кожи рук обслуживающего персонала проводят стерильным ватным тампоном, помещенным в пробирку с 5мл стерильной 1% пептонной воды. Посевы с объектов в среде накопления инкубируют при 37°C в течение 16-18 часов и осуществляют пересев на модифицированную среду Эндо. Бактериологическое исследование проводят не позднее, чем через 2-4 часа с момента отбора проб. До исследования пробы хранят при температуре + 4-8°C.

Отбор патологического материала.

Материалом для бактериологического исследования является гной, экссудаты, пунктаты, выпот, биоптаты, ткани, мазки из ран, фекалии, моча, рвотные массы и т.д. Отбор жидких материалов производят с помощью шприца, при невозможности взятия шприцем, материал забирают тампоном. Биоптаты ран получают путем иссечения участка ткани из грубых слоев раны после тщательной ее обработки физиологическим раствором и 70°C этиловым спиртом. Патологический материал доставляют в лабораторию не позднее, чем через 1-1,5 часа с момента взятия. Посев патологического материала производят на модифицированную среду Эндо, 5% кровяной агар, питательный агар.

Посевы выдерживают в термостате при 37°C в течение 18-24 часов. Для дальнейшего исследования выделенных микробов отбирают не менее трех колоний одного вида.

Идентификация грамотрицательных микроорганизмов

Грамотрицательная потенциально патогенная микрофлора, являющаяся причиной внутрибольничных инфекций, разделяется на две большие группы. Первая группа микроорганизмов ферментирует углеводы и относится к семейству Enterobacteriaceae, вторая - принадлежит к группе неферментирующих бактерий. Из семейства Enterobacteriaceae существенное значение в этиологии гнойно-септических заболеваний имеют бактерии родов Klebsiella, Citrobacter, Serratia, Escherichia, Proteus, Providencia. Группу неферментирующих бактерий при госпитальных инфекциях представляют микроорганизмы родов: Pseudomonas, Acinetobacter, Flavobacterium и другие.

Идентификация микроорганизмов начинается с изучения их морфологии в мазках, приготовленных из колоний и окрашенных по Граму.

При обнаружении грамотрицательных мелких палочек, а также коккобактерий их отсеивают на скошенный мясопептонный агар с целью накопления посевного материала и одновременно в среду OF (среда Хью-Лейфсона) Посевы выдерживают в термостате в течение 18-24 часов при 37° С. Затем учитывают результаты посева на среде OF (рис).

Грамотрицательные бактерии, оксидирующие и ферментирующие глюкозу, изменяют первоначальный зеленый цвет среды OF на желтый. В таком случае результат учитывают как ++ и данные микроорганизмы относят к семейству Enterobacteriaceae с последующей идентификацией.

Грамотрицательные микроорганизмы, оксидирующие, но не ферментирующие глюкозу (+/-) или не оксидирующие и не ферментирующие ее (-/-), относятся к группе неферментирующих бактерий с последующей идентификацией.

Идентификация грамотрицательных патогенных микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae

Идентификацию проводят в два этапа.

Первым этапом определяют родовую принадлежность бактерий по минимальному набору тестов. Культуру с поверхности скошенного агара исследуют на наличие цитохромоксидазы.

Далее цитохромоксидазоотрицательные колонии засевают в короткий пестрый ряд из 7 тестов. Определяют подвижность, утилизацию цитрата, продукцию индола, реакцию с метиловым красным, ферментацию рамнозы, дезаминирование фенилаланина и декарбоксилирование фенилаланина (табл)

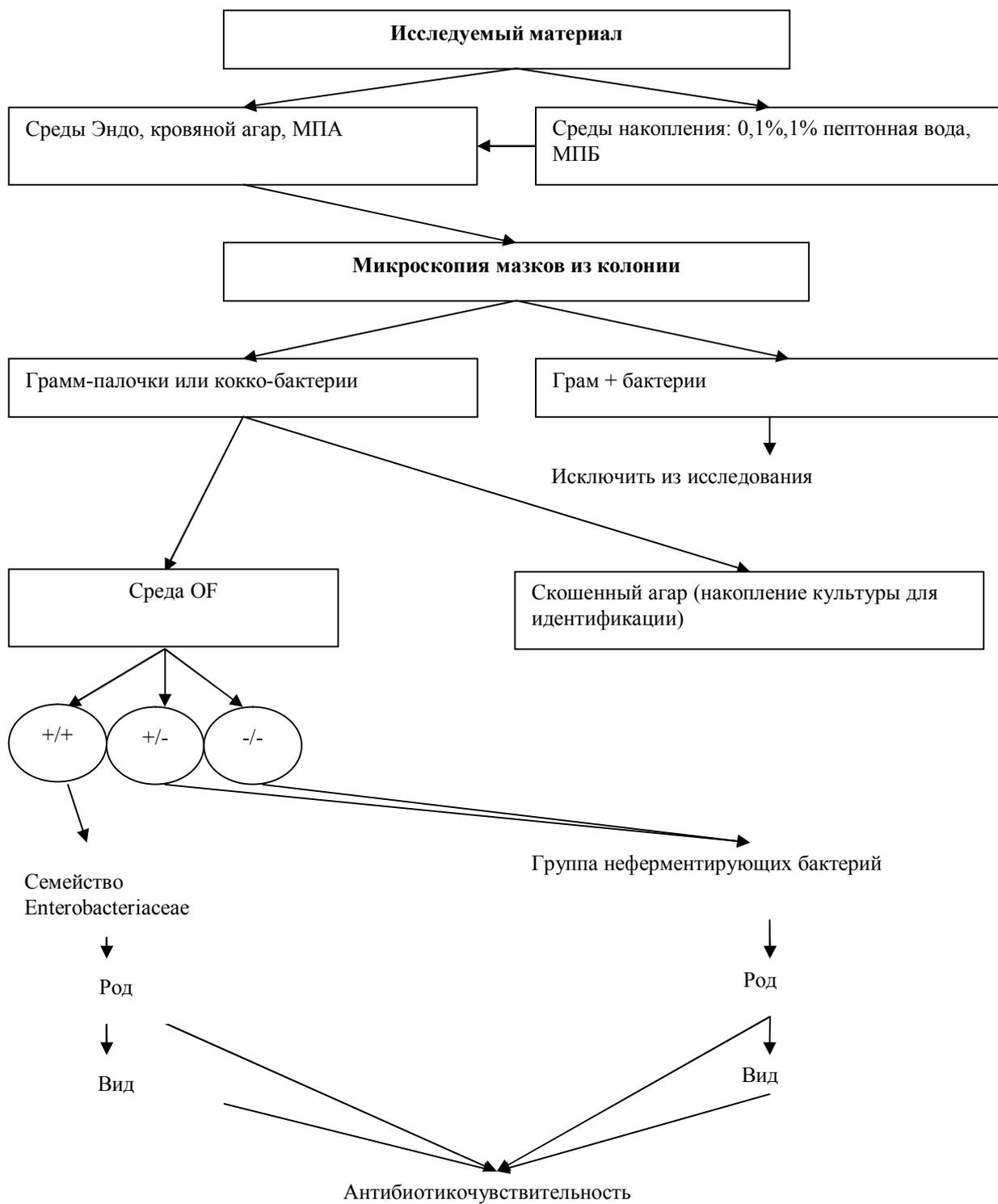


Рис. 5 Выделение граммотрицательных патогенных микроорганизмов.

**Родовая дифференциация потенциально патогенных микроорганизмов семейства
Enterobacteriaceae**

Микроорганизмы	Тесты						
	Подвижность	Цитратный признак	Индол	Метилловый красный	Орнитиндекарбоксилиза	Фенилаланин (или триптофан) дезаминаза	Ферментация рамнозы
Escherichia	+	-	+	+	+	-	+
Klebsiella	-	+	-	-	-	-	+
Enterobacter	+	+	-	-	+	-	+
Citrobacter	+	+	+	+	+	-	+
Proteus-Providencia	+	+	+	+	+	+	-
Serratia	+	+	-	+	+	-	-

Таблица 27

**Видовая дифференциация потенциально патогенных микроорганизмов семейства
Enterobacteriaceae**

Микроорганизмы	Орнитиндекарбок西兰за	Лизиндекарбок西兰за	Аргининдегидролаза	Ферментация сорбита	Ферментация арбинозы	Ферментация инозита	H2S	Индол	Уреаза	Желатиназная	Ацетонин	Ферментация мальтозы	Адонит
Citrobacter freundii	+/-	-	-/+	+	+	-	+/-	-	-	-	-	+	-
Citrobacter diversus	+	-	-/+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-
Klebsiella pneumonia	-	+	-	+	+	+	-	-	+/-	-	-	+	+
Enterobacter aerogenes	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	В
Enterobacter cloacae	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	(+)
Enterobacter agglomerans	-	-	-	-/+	+	-	-	-	-	-	+	В	В
Hafnia alvei	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+(22)	+	-
Serratia liquefaciens	+	+	-	+	+	+/-	-	-	-	-	-/+	+без газа	(+без) газа
Serratia marcescens	+	+	-	-	-	+/-	-	-	-/+	+	+	+	+
Serratia rubidaea	-	+/-	-	-	+	-/+	-	-	-	+/-	+	-	-
Proteus mirabilis	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-/+	-	-
Proteus vulgaris	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-
Providencia alcalifaciens	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	(-/+)	+
Providencia stuartii	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	(-/+)	-
Morganella morganii	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Идентификация неферментирующих грамотрицательных бактерий (НГОб)

Идентификация НГОБ проводится по двухэтапной схеме (Рис 6)

Первый этап- определение родовой принадлежности, включая три теста (табл 28):
определение подвижности окисление 1% глюкозы в среде Хью Лейфсона (OF) и наличие фермента оксидазы. По результатам этих трех тестов проводят ориентировочную идентификацию НГОБ: Pseudomonas, Acinetobacter, Moraxella, Flavobacterium meningosepticum.

Таблица 28

Ориентировочная идентификация неферментирующих грамотрицательных бактерий

Микроорганизмы	Подвижность	Оксидаза	Окисление-ферментация глюкозы на среде OF
Pseudomonas	+	+(-)	+/-; -/-
Acinetobacter	-	-	+/-; -/-
Moraxella	-	+	-/-
Alcaligenes	+	+	-/-
Flavobacterium meningosepticum.	-	+	+/-

Второй этап определение видовой, а в отдельных случаях подтверждение родовой принадлежности НГОБ (табл). Выбор тестов, которые необходимо поставить на втором этапе, зависит от результатов трех тестов первого этапа.

Таблица 29

Дифференциально- диагностические тесты для идентификации неферментирующих грамотрицательных бактерий

Микроорганизмы	Подвижность	Оксидаза	OF с глюкозой	Флюоресценция в УФ-свете или аргининдегидролаза	Желатиназа	Рост при 42°C	H ₂ S	Амилаза	ДНК-аза	Лизиндекарбоксилаза	Фенилаланиндезаминаза	OF с фруктозой	Окисление 10% лактозы	Чувствительность К пенициллину	Индол
P. aeruginosa	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. fluorescens	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
P. putida	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
P. cepacia	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-
P. stutzeri	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
P. putrefaciens	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
P. maltophilia	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P. diminuta	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
P. alcaligenes	+	+	-*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P.pseudoalcaligenes	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Alcaligenes	+	+	-*	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Moraxella spp	-	+	-	-	±	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Acinetobacter colcoacetivus var nitratum	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Acinetobacter colcoacetivus var lawfi	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavobacterium meningosepticum	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+

Примечание: * - подщелачивание среды OF



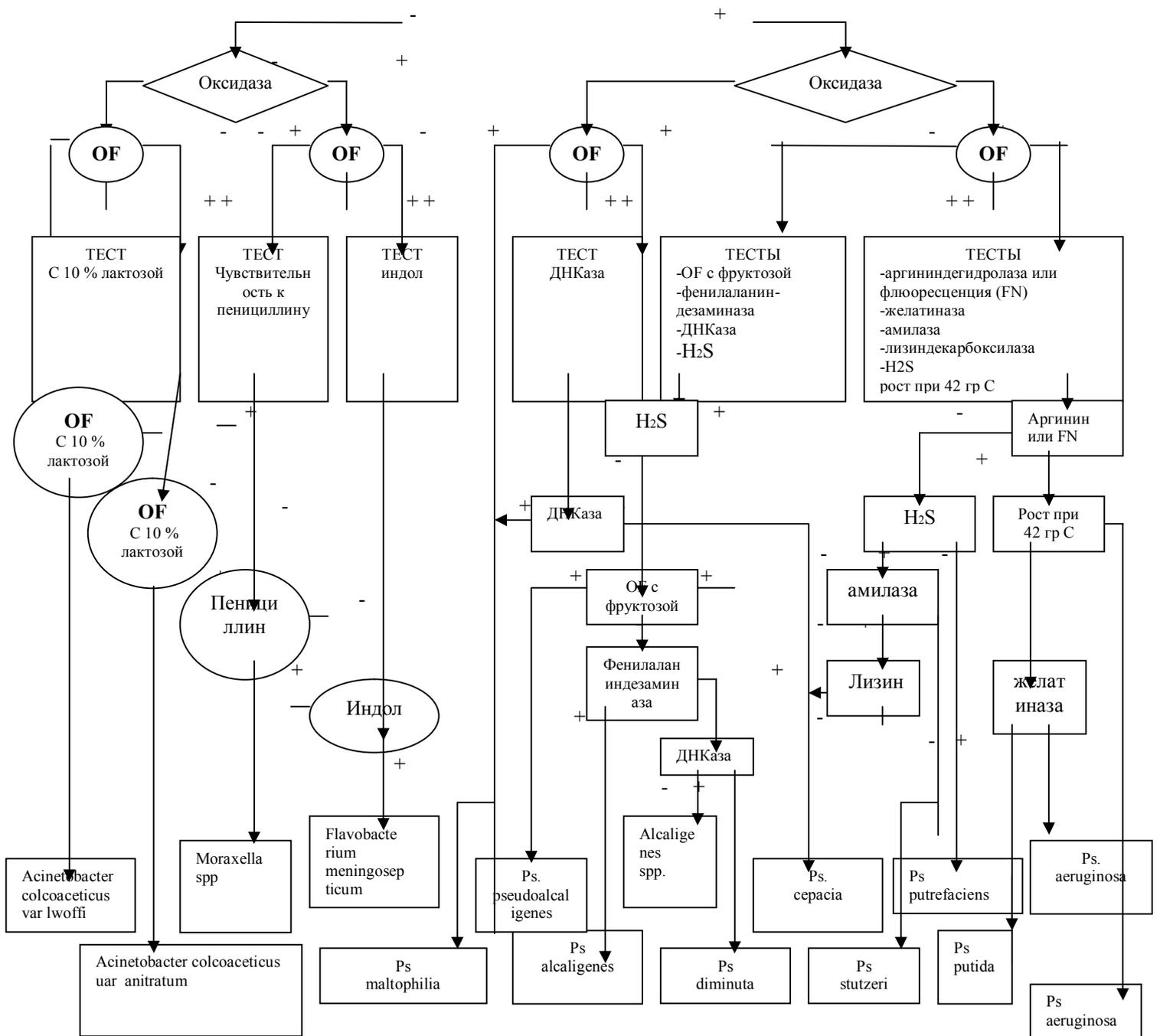


Рис 6 Схема идентификации неферментирующих грамотрицательных бактерий

Оценку результатов первого этапа проводят в следующем порядке: определение подвижности, наличие фермента оксидазы, окисления 1% глюкозы на среде Хью-Лейфсона (среда OF). Как видно из рис. возможны семь вариантов исходов этих трех тестов.

1. Неподвижные микроорганизмы, не обладающие оксидазной активностью и не окисляющие глюкозу на среде OF относят к *Acinetobacter colcoaceticus* var *lwoffii*. В качестве подтверждающего используют тест с 10% глюкозой.

2. Неподвижные НГОБ, не обладающие оксидазной активностью, но окисляющие глюкозу на среде OF (на схеме: подвижность -, оксидаза -, OF +) принадлежит к *Acinetobacter colcoaceticus* var *anitratum*. Для подтверждения используют тест окисление 10% лактозы, повторный +.

Для идентификации *Acinetobacter* применяют микроскопию, поскольку среди неферментируемых гр-бактерий только *Acinetobacter* могут иметь клетки в виде кокков и коккобацилл.

3. Штаммы, обладающие следующими свойствами: подвижность -, оксидаза -, OF +, относятся к роду *Mogohella*. Подтверждающим тестом для этих микроорганизмов служит чувствительность к пенициллину (+)

4. Неподвижные оксидазоположительные штаммы, окисляющие глюкозу на среде OF, их относят к *Flavobacterium menigosepticum*. В качестве подтверждающего теста служит положительная реакция на индол и наличие желтого пигмента.

5. Подвижные оксидазоположительные микроорганизмы, окисляющие глюкозу на среде OF(+) могут принадлежать к одному из шести видов рода *Pseudomonas*: *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *Ps. putida*, *Ps. cepacia*, *Ps. stutzeri*, *Ps. putrefaciens*. Для их дифференциации одновременно ставят шесть тестов: флюоресценция в УФ-свете, либо определение наличия аргининдегидролазы, определение наличия желатиназы, амилазы, лизиндекарбоксилазы, рост при 42°C, образование H₂S.

6. Подвижные, оксидазоположительные, не окисляющие глюкозу на среде OF, не ферментирующие грамотрицательные бактерии, могут принадлежать к роду *Alcaligenes* или к одному из видов рода *Pseudomonas*.

7. Подвижные оксидазоотрицательные штаммы, окисляющие глюкозу на среде OF, принадлежат либо к *Ps maltophilia*, либо к виду *Ps. Cepacia*. Для дифференциации этих двух видов используют тест, выявляющий наличие фермента ДНК-азы. *Ps maltophilia* обладает ферментом ДНК-азой, а *Ps. cepacia* – нет.

Определение бактерий рода Klebsiella

Посев исследуемого материала осуществляют на плотную питательную среду К-2 и инкубируют ее при 37°C 18-24 часа. Колонии клебсиелл на этой среде крупные, блестящие, слизистые. Окраска их различна – от желтой или зелено-желтой до голубой. Для идентификации со среды снимают по 1-2 колонии и засевают их в полужидкий агар для определения аргининдекарбоксилазной активности. Признаками, характерными для рода *Klebsiella*, являются неподвижность культуры и неспособность декарбоксилировать орнитин.

Определение бактерий родов Proteus и Providencia

Посев материала осуществляют на среду П-2, инкубируют при 37°C в течении 18-24 часов. На этой среде колонии *P.mirabilis* - малиновые с черным центром, *P.vulgaris* – желтые с черным или темно-коричневым центром, *M.morganii*, *Providencia* – малиновые без центра, *P.rettgeri* – желтые без центра. Определение *P.mirabilis* и *P.vulgaris* в 96-98 % случаев совпадает с последующей идентификацией и в дальнейшем в подтверждении не нуждается. Колонии без черного центра или сомнительные должны быть идентифицированы. Для их дифференциации используются среды «ПП» и «ИНАД»

Посев в среду «ПП» проводят штрихом по скошенной поверхности и уколом до дна пробирки, инкубируют 18-20 часов при 37°C. Уреазающую активность учитывают по нижнему слою среды: положительный результат – оранжево-желтая окраска, что четко разграничивает род *Proteus* от рода *Providencia*. Продукция газа в нижнем слое- признак, отличающий *P.alcalifaciens* от *P.stuartii*. Наличие индола, определяемого полоской

реактивной бумаги, позволяет идентифицировать *P. mirabilis* от *P. vulgaris* и других видов протеев и провиденций. Триптофандезаминаза, выявляемая с помощью реактива с хлорным железом, подтверждает принадлежность выделенной культуры к родам *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*. Положительной реакцией является окрашивание реактива и подлежащего слоя среды в вишнево-красный, оранжево-красный, отрицательной – окрашивание реактивов в желтый цвет и подлежащего слоя среды – в светло-бурый. H₂S на среде «ПП» образуется в виде черных точек в толще столбика, через 2-3 часа после добавления реактива увеличивающихся до сплошной черной полосы, что отличает *P. mirabilis* и *P. vulgaris* от других представителей этой группы микроорганизмов.

Посевы в среду «ИНАД» инкубируют при 37°C в течении 18-20 часов. Среда «ИНАД» позволяет определять ферментацию инозита и адонита. При положительном результате цвет среды с темно-зеленого меняется на желтый, что позволяет дифференцировать *P. alcalifaciens* (адонит +) от *P. stuartii* (инозит +), а *P. rettgeri* (инозит и адолитположительные колонии от других видов протеев. (см. табл. 28)

Определение *P. aeruginosa*

Определение синегнойной палочки осуществляется путем посева исследуемого материала на одну из плотных селективных сред: ацетамидный агар, аргининную среду, среду с бриллиантовым зеленым, цетримидную, цетилпиридиний хлоридом (ЦПХ) (Рис 7)

Посевы инкубируют при температуре 37°C в течение 24-28 часов и затем учитывают морфологические особенности колоний *P. aeruginosa*. На среде ЦПХ колонии *P. aeruginosa* средних размеров, отдельные колонии крупные, плоские, с матовой поверхностью. Пигментные штаммы и среда вокруг них окрашены в зелено-желтый, синевато-красный цвет.

На аргининной среде колонии *P. aeruginosa* плоские, среднего размера, красного цвета, за счет образования формазана в присутствии ТТХ.

На цетримидной среде колонии средних размеров, с неровными краями, шероховатые, с зелено-бурым, диффундирующим в среде пигментом, атипичные штаммы образуют матовые колонии

На ацетамидном агаре колонии мелкие, с ровным краем, матовые, чаще с ярким серебряным блеском. Пигментные штаммы образуют зеленовато-синеватый пигмент, диффундирующий в толщу среды.

На среде с бриллиантовым зеленым колонии средних размеров с ровным краем, иногда фестончатые; пигментные штаммы растут в виде зеленоватых колоний, атипичные- бесцветные.

Культуры *P. aeruginosa* обладают специфическим ароматическим запахом земляничного мыла, жасмина, фиалки и т. д. Для идентификации *P. aeruginosa* с плотных селективных питательных сред снимают 1-2 пигментных и 3-4 атипичных колоний на среду «Кинг А». Посев на эту среду производят бляшками и выдерживают в термостате при 37 °С 20-24 часа. При отсутствии пигмента посевы оставляют при комнатной температуре еще 24 часа. Учитывают типичные формы колоний: уплощенные, с шероховатой поверхностью, неровными краями и кружевным венчиком, образующимся в результате ограниченного роения культуры. При косом освещении улавливается серебристый блеск. Пигмент чаще всего имеет буроватую окраску с варьированием оттенков. Пигмент образуется вокруг колоний и диффундирует в толщу среды. При наличии пигмента и характерной морфологии на среде «Кинг А» идентификация *P. aeruginosa* на этом заканчивается. Атипичные штаммы подвергают дальнейшим исследованиям. Колонии микроскопируют, определяют цитохромоксидазу, делают посев на среду OF и нитратную среду. Для этой цели со среды «Кинг А» снимают 2-3 колонии и окрашивают по Граму. *P. aeruginosa* – грамотрицательные палочки, подвижные, не образуют спор. Одновременно на среде «Кинг А» проверяют цитохромоксидазную

активность колоний путем нанесения раствора каплями на макроколонии, при этом колонии *P.aeruginosa* в течении 15-30 секунд становятся темно-синими. Учет производят через 3 мин., по истечении которых все колонии с нанесенным реактивом синюют

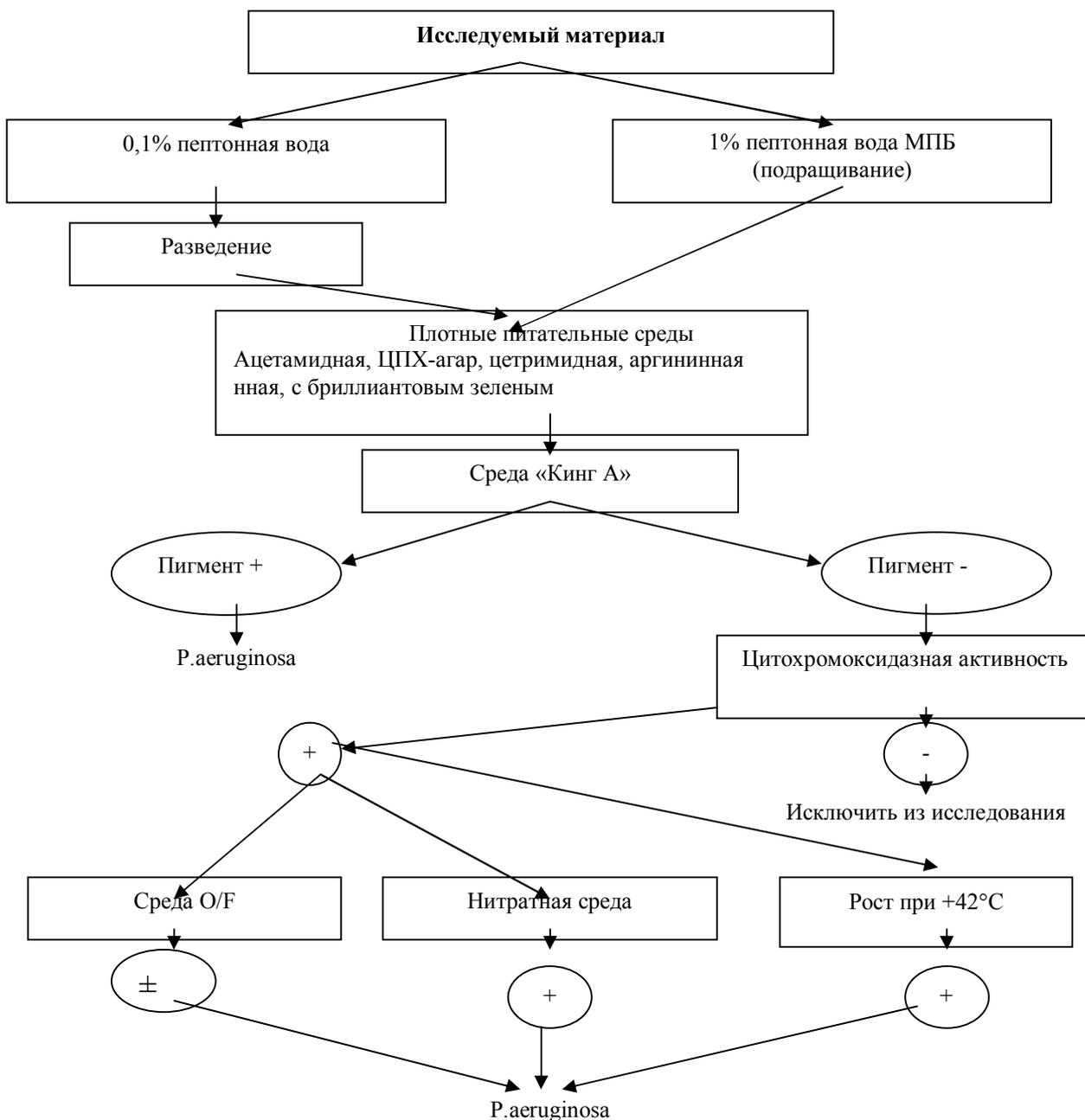


Рис 7 Схема исследования объектов окружающей среды и патологического материала на *P.aeruginosa*

Посев культур в нитратную среду производят уколом до дна пробирки, выдерживают 42°C в течении 20-24 часов, при положительном ответе отмечают рост культуры в виде помутнения среды и образования на поверхности среды пузырьков газа. Отличие *P.aeruginosa* от других псевдомонад- возбудителей внутрибольничных инфекций осуществляют дифференциально- диагностическими тестами (табл)

Определение бактерий рода *Acinetobacter*

Отбор проб патологического материала для качественной оценки результатов производят в 10 мл стерильной жидкой накопительной среды ЭАС-1. Смывы с предметов, аппаратуры, рук персонала осуществляют непосредственно средой ЭАС-1. Затем посевы на среде ЭАС-1 выдерживают при 30°C в течение 48 часов. При положительном результате на поверхности среды образуется бесцветная пленка. С поверхности пленки материал пересевают на 2-4 сектора среды ЭАС-2 и инкубируют при 30°C в течение 24 часов. На среде ЭАС-2 колонии *A. calcoaceticus*, *v. anitrates* оранжевые, иногда желтые, средних размеров, выпуклые, с равными краями.

Колонии *A. lwoffii* бледно-зеленые, мелкие, выпуклые, с ровными краями. Для идентификации снимают 2-3 колонии и проводят по тестам в соответствии с идентификацией неферментирующих грамотрицательных бактерий.

Серологическая идентификация бактерий

Определение сероваров бактерий рода Proteus

Определение сероваров *P. vulgaris* и *P. mirabilis* возможно при помощи специфических «О» и «Н» сывороток в реакции агглютинации на стекле. Для реакции агглютинации применяют суточную культуру, «которую испытывают в начале с поливалентными, а затем при положительной реакции агглютинации с моновалентными О-сыворотками, входящими в поливалентную».

Определение сероваров K.pneumoniae

Установление сероваров клебсиелл проводят путем определения капсульного антигена в реакции агглютинации на стекле при помощи капсульных К-сывороток. Для получения культуры в капсульной форме исследуемый штамм пассируют через углеводосодержащие среды (0,2% глюкозный бульон и агаровая среда Ворфеля-Фергюсона) Культуру засевают в 0,2% глюкозный бульон и инкубируют в течение 4 часов при 37°C, после чего пересевают на среду Ворфеля-Фергюсона и инкубируют при 37°C 18-20 часов.

Для реакции агглютинации петлю агаровой культуры со среды растирают на предметном стекле рядом с каплей клебсиеллезной сыворотки, после чего их тщательно смешивают.

Капсульная агглютинация наступает очень быстро и имеет вид крупных хлопьев или тяжей.

Среды для культивирования стафилококков

Кровяной агар: к расплавленному и охлажденному до 45-50⁰С питательному агару прибавляют 5-10% дефибринированной или цельной свежевзятой крови животного.

Желточно-солевой агар: в расплавленный и остуженный до 60⁰С мясопептонный агар рН 7,2-7,4 с 10% хлорида натрия прибавляют 10-20% желточной взвеси куриного яйца.

Для изучения ферментации глюкозы в анаэробных условиях используется питательная среда, содержащая 0,3% агара, 1% глюкозы и индикатор ВР или стандартная среда Хью-Лейфсона с индикатором бромтимоловым синим.

Среды для культивирования стрептококков

Кровяной агар: к расплавленному и охлажденному до 45-50⁰С питательному агару прибавляют 5% дефибринированной или цельной свежевзятой крожи животного.

Сывороточный агар: к расплавленному и охлажденному до 45-50⁰С питательному агару прибавляют 15 - 20% лошадиной или бычьей сыворотки.

Сывороточный бульон: к питательному бульону прибавляют 15 - 20% лошадиной или бычьей сыворотки.

Молоко с метиленовым синим: к 100 мл обезжиренного стерильного молока прибавляют 2 мл 1% раствора метиленового синего.

Среды для выделения и индификации бактерий кишечной группы

Среды обогащения

<i>Селенитовая среда.</i> Состав:	Натрий гидроселенит без примесей теллура	– 4 г
	Пептон фирмы “Рихтер”, “Спофа” или подобной	– 5 г
	Натрий гидрофосфат безводный	– 7 г
	Натрий дигидрофосфат безводный	– 3 г
	Лактоза	– 4 г
	Вода дистиллированная	– 1000
	мл	

Среду стерилизуют при 112* 30 мин. Во флаконах по 50 мл, рН готовой среды должен быть 6,9-7,1. Срок хранения в холодильнике – 1 – 2 месяца.

Среда Мюллера. Состав: Мел, стерилизованный сухим жаром, или

		– 45
--	--	------

г

Кальций карбонат, сухой, стерильный	– 25
-------------------------------------	------

г

Раствор Люголя	– 20
----------------	------

мл

Бульон Хоттингера, содержащий 1,2-1,3% аминного азота, стерильный	– 900
---	-------

мл

Натрий тиосульфат 50% стерильный раствор	– 100
--	-------

мл

Готовую среду во флаконах по 100-200 г стерилизуют текучим паром 30 мин.

Среда Кауфмана. Состав: Среда Мюллера, стерильная

	– 500
--	-------

мл

Желчь бычьей, стерильная	– 250
--------------------------	-------

мл

Бриллиантовый зелёный 1% водный раствор – 50
мл

При приготовлении ингредиенты смешивают, разливают в стерильные пробирки, не стерилизуют.

Желчный бульон. Состав: Бульон мясо-пептонный или Хоттингера – 800
мл

Желчь бычья нативная – 200
мл

Готовую среду разливают в стерильные пробирки или флаконы. Стерилизуют текучим паром 2 дня по 30 мин. рН готовой среды должен быть равен 7,6.

Среда Раппопорт. Состав: Бульон мясопептонный или Хоттингера –
900мл

Желчь бычья –
100мл

Глюкоза – 20
г

Индикатор Андрее – 10
мл

Составные части среды смешивают, разливают во флаконы с поплавками по 50 мл. Стерилизуют текучим паром 3 дня по 30 мин.

Буферная среда обогащения для иерсиний. Среда служит при выделении иерсиний для подраствивания материала перед высевом на пластинчатые дифференциальные среды.

Состав: Натрий хлорид (NaCl) –
8,5 г

Натрий гидрофосфат ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 1/15 М-раствор –
3 мл

Калий дигидрофосфат (KH_2PO_4) 1/15 М-раствор –
7 мл

Вода дистиллированная – 990
мл

Приготовление: предварительно готовят по 100 мл 1/15 М-растворов указанных солей. Затем к изотоническому раствору натрия хлорида добавляют указанное количество приготовленных растворов, смешивают фильтруют, разливают в пробирки по 5-6 мл и стерилизуют при 116°C 10 мин или 30 мин текучим паром. рН среды 7,2.

Плотные питательные среды для выделения чистых культур

Агар Эндо (сухой); агар с эозин-метиленовым синим (сухой, среда Левина); агар Плоскирева (сухой); Висмут-сульфит агар (сухой) выпускают в сухом виде, состав и способ приготовления указаны на этикетке.

Среды для первичной идентификации энтеробактерий

Агар Клиглера. Состав: бульон мясной – 1000
мл

пептон – 20
г

лактоза –
10 г,

натрий хлорид –
5 г

натрий сульфит –
0,4 г

натрий тиосульфат	–
0,08 г	
железо сульфат (FeSO ₄ *7H ₂ O)	–
0,5 г	
агар	–
20г	
феноловый красный (0,2% раствор в 50% этиловом спирте)	– 12
мл.	

Для приготовления среды к мясному бульону последовательно добавляют пептон, соли натрия, агар, кипятят до полного растворения агара, устанавливают рН 7,8, снова кипятят, фильтруют через вату и добавляют остальные ингредиенты. Сульфат железа предварительно растворяют в малом количестве воды. Готовую среду разливают в пробирки по 6-7 мл и стерилизуют при 112⁰С 30 мин. Скашивают так, чтобы оставить столбик высотой 2-2,5 см.

Трёхсахарный агар с мочевиной (Среда Олькеницкого).

Состав: агар питательный сухой – 25г	
сахароза	– 10 г
лактоза	– 10 г
глюкоза	10г
аммоний-железо сульфат { FeSO ₄ *(NH ₄) ₂ SO ₄ *6H ₂ O }	– 0,2г
натрий тиосульфат (Na ₂ S ₂ O ₃ *5H ₂ O)	– 0,3 г
мочевина	– 10 г
феноловый красный (0,4% водный раствор)	- 4 мл
вода дистиллированная	– 1000 мл

Для приготовления среды соли предварительно растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды. Углеводы и мочевины растворяют таким же образом, но при подогреве на водяной бане. Сухой питательный агар расплавляют на огне в остальной воде при помешивании. Затем все ингредиенты соединяют, перемешивают с расплавленным агаром, фильтруют через марлевый фильтр, устанавливают значение рН 7,2-7,4. Добавляют индикатор, хорошо перемешивают, разливают в пробирки по 6-7 мл. Стерилизуют текущим паром 3 дня подряд по 20 мин. Скашивают, оставляя столбик 2-2,5 см.

Состав и приготовление вышеперечисленных сред цитировано по Руководству для врачей “Энтеробактерии” под ред. В.И.Покровского, 1985, М. “Медицина”, 259-273.

Среда для выделения энтерогеморрагических кишечных палочек

Сорбитол E. coli 0157: H7 агар. Состав: панкреатический гидролизат рыбной муки	–
12 г	
дрожжевой экстракт	–
1 г	
натрий хлористый	–
3,4 г	
Д – сорбит	–
10 г	
сульфит натрия безводный	–
0,8 г	
динатрий фосфат	–
0,5 г	
фуксин основной	–
0,2 г	

агар —
 9,0 г
 вода дистиллированная —
 1000л

Для приготовления последовательно растворить ингредиенты, расплавить в небольшом количестве воды агар, соединить, профильтровать, прокипятить в стерильные чашки Петри слоем 5-6 мм. Готовая среда хранению не подлежит. Данная среда выпускается и в готовом сухом виде, 142279, г. Оболенск, Московской обл., Серпуховский район, Государственный научный центр прикладной микробиологии, Т/факс (0967) 724908.

Среды, используемые при бактериологических исследованиях на холеру

**Перечень коммерческих иммунобиологических препаратов
 для диагностики холеры**

Наименование питательной среды, микротест-системы	Предприятие - изготовитель
1	2
Питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона, сухая (щелочной агар)	АО «Биомед» им. И. И. Мечникова, 143422 Московская обл., Красногорский р-он, п/о Петрово-Дальнее; НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока, 664047 г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; ФГУП «Аллерген», 355004 г. Ставрополь, ул. Биологическая, 20
Пептон основной сухой	АО «Биомед» им. И. И. Мечникова, НПО «Питательные среды», 367025, г. Махачкала, ул. Левоневского, 24
Питательная среда элективная диагностическая для выделения холерного вибриона сухая (СЭДХ)	Ростовский НИПЧИ, 344007 г. Ростов-на-Дону, ул. Горького, 117
Питательная среда для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, сухая (АГВ)	НПО «Питательные среды» г. Махачкала
Микротест-система для идентификации вибрионов (МТС - V)	НПО «Питательные среды» г. Махачкала
Микротест-система для ускоренного определения групп вибрионов по Хейбергу (МТС - X)	НПО «Питательные среды» г. Махачкала
Мультимикротест-система для биохимической идентификации Vibriionaceae	ФГУП «Аллерген» г. Ставрополь

Системы индикаторные бумажные для идентификации микроорганизмов (набор № 1 для вибрионов; набор № 2 – для межродовой дифференциации энтеробактерий)	Нижегородское предприятие по производству бактериальных препаратов, г. Н. Новгород, 803950, ул. Грузинская, 44
Бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор, сухие	РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов, 410005, ул. Университетская, 46
Фаг дифференциально-диагностический (ДДФ) вида <i>V. Cholerae</i> жидкий	РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов ул. Университетская, 46
Среды Гисса с углеводами и спиртами: глюкозой, лактозой, сахарозой, мальтозой, маннитом, дульцитом; среда Клигlera; глюкозофосфатный бульон Кларка	НПО «Питательные среды» г. Махачкала; АО «Биомед» им И.И. Мечникова,
Гест-система диагностическая для выявления <i>V. cholerae</i> стх методом ПЦР	РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов
Бактериофаги диагностические холерные эльтор стх+ и стх-жидкие	РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов
Сыворотка диагностическая холерная 01 адсорбированная и неадсорбированная сухая для РА	РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов; НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока, г. Иркутск
Сыворотка диагностическая холерная Инаба адсорбированная сухая	РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов; (адрес см. выше) НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока, г. Иркутск
Сыворотка диагностическая холерная Огава адсорбированная сухая	РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов; НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока, г. Иркутск
Сыворотка диагностическая холерная РО адсорбированная сухая для РА	РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов
Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные адсорбированные лошадиные сухие	РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов
Бактериофаги диагностические холерные	РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов

типизирующие (1-7) жидкие ТЭПВ	
Диагностикум эритроцитарный холерный иммуноглобулиновый сухой	Казахский НИПЧИ, г. Алма-Ата, 480074 Казахстан, г. Алма-Ата, ул. Копальская, 14.
Диагностикум эритроцитарный холерный энтеротоксический антигенный сухой	Казахский НИПЧИ, г. Алма-Ата ул. Копальская, 14.
Сыворотки диагностические холерные не 01 группы поливалентная 02-040, групповые № 1-5, моноварные 02—083 кроличьи адсорбированные жидкие, 0139 адсорбированная жидкая, 0139 адсорбированная сухая для РА	РосНИПЧИ «Микроб», г. Саратов; Ростовский НИПЧИ, г. Ростов-на-Дону

Рецептура основных питательных сред

Транспортные среды:

- 1 %-ная пептонная вода, рН $8,5 \pm 0,1$ без ингибиторов роста сопутствующей флоры и с теллуридом калия (см. среды обогащения);
- 2 %-ный раствор поваренной соли: 20 г хлорида натрия и 0,1 г едкого натрия растворяют в 1 л дистиллированной воды; жидкость фильтруют через бумажный фильтр, разливают по 10 мл в пробирки и стерилизуют в автоклаве 20 мин при 0,7 атм.

Среды обогащения

а) Основной раствор пептона (10% пептонная вода) готовят по следующей прописи:

Пептон сухой - 100,0
 Натрия хлорид - 50,0
 Калия нитрат - 10,0
 Натрия карбонат - 25,0
 Дистиллированная вода - 1 л
 рН $8,4 \pm 0,1$.

В холодную дистиллированную воду погружают пептон, хлорид и карбонат натрия. Смесь кипятят при постоянном помешивании до полного растворения пептона, не допуская его пригорания, затем добавляют нитрат калия. Проверяют реакцию среды, если нужно, рН доводят до $8,5 \pm 0,1$. Раствор фильтруют через миткалевый или бумажный фильтр, разливают в посуду и стерилизуют в автоклаве 20 мин при 1 атм.

Основной раствор пептона сохраняется до 2 лет.

б) 1 %-ная пептонная вода

Для получения 1 %-ной пептонной воды концентрированный раствор разводят в 10 раз дистиллированной водой. После установления рН $8,5 \pm 0,1$ разливают в пробирки или во флаконы и стерилизуют 20 мин при давлении 0,7 атм.

1 % пептонную воду можно готовить и непосредственно из отдельных компонентов, взяв навески в 10 раз меньше указанных в рецепте основного пептона. Технология приготовления такая же, как и основного пептона.

в) Пептонная вода с теллуридом калия В 1 %-ную пептонную воду (рН 8,5 ±0,1) после автоклавирования добавляют теллурид калия в конечном разведении 1 : 100 000 или 1 : 200 000. Предварительно готовят рабочий 0,1 %-ный раствор теллурида калия (1 : 1 000). Срок хранения рабочих растворов 7 дней.

Плотные среды для выделения холерных вибрионов.

Щелочной мясопептонный агар:

Мясная вода - 1 л
Пептон- 10,0
Натрия хлорид - 5,0
Агар-агар - 20,0
рН 8,0 ± 0,2.

В мясную воду вносят пептон и хлорид натрия. Смесь перемешивают и подщелачивают 20 %-ным раствором едкого натра до рН 8,3 ±0,1. Затем добавляют агар-агар и содержимое помещают в автоклав для варки среды в начале текучим паром в течение 30—40 мин, а затем при 1 атм. 20 мин. Если мясопептонный агар варят на плите, среду кипятят до полного расплавления агар-агара при постоянном помешивании.

Для получения прозрачной агаровой среды ее после варки с целью отстоя на 2—3 ч оставляют в автоклаве или помещают в термостатную комнату при температуре 43 ± 2 °С, время лучше отстоя продлить до 18—20 ч. Отстоявшийся агар осторожно, не взбалтывая, сливают с осадка на плотный ватно-марлевый фильтр. В фильтрате уточняют реакцию среды, если требуется, подкисляют ее, но подщелачивать агар на данном этапе не рекомендуется во избежание выпадения осадка при стерилизации готовой среды. Профильтрованный агар разливают в посуду и стерилизуют при 1,0 атм. 20 мин.

Элективные среды.

Рекомендуется использовать питательную среду - для выделения холерных вибрионов элективно-дифференциальную, сухую, СЭДХ.

Среда обладает выраженными элективными свойствами, обеспечивая ингибицию сопутствующей микрофлоры (энтеробактерий, протей, кокков и др.) и практически не влияет на рост вибрионов. Холерные вибрионы 01 и не 01 групп через 12—18ч формируют на этих средах плоские, прозрачные колонии желтого цвета за счет ферментации сахарозы, диаметром 1,0—2,0 мм; *V. parahaemolyticus* - мелкие, голубоватые (цвета среды) с уплотненным центром; *V. alginolyticus* - крупные, желтые; колонии *Pseudomonas*, *Aeromonas* - голубые, *Enterobacteriaceae* - очень мелкие плотные или полупрозрачные, иногда окрашены в желтый цвет; колонии протей, как правило, не роятся.

Агар TCBS— сухая среда для диагностики холеры (рН 8,6) выпускается фирмой «Дифко» (Детройт, штат Мичиган, США).

TCBS-агар предназначен для выделения холерных и НАГ-вибрионов из клинического материала (испражнения, рвотные массы, содержимое желчного пузыря, а также суспензия, приготовленная из комочков слизистой оболочки кишечника трупа и др.)

TCBS-агар состоит из панкреатического гидролизата рыбной муки, дрожжевого экстракта, сахарозы, цитрата натрия, цитрата железа, хлорида натрия, желчи крупнорогатого скота, тиосульфата натрия, бромтимолового синего, тимолового синего и агара.

Препарат в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, тщательно размешивают в 1 л дистиллированной воды. Доводят до кипения и кипятят не более 1 мин при постоянном перемешивании. Среду охлаждают до температуры 40-50 °С и разливают в чашки Петри слоем 5-6 мм. Подсушивают на рабочем столе с открытыми крышками в течение 1 ч при комнатной температуре.

Готовая среда сине-зеленого цвета, темная.

Бактериологический анализ материала, поступившего в лабораторию для исследования на холеру, ведется в соответствии с "Инструктивно-методическими указаниями по

профилактике, диагностике, лечению и борьбе с холерой", утвержденной МЗ СССР. Посев проводят большой бактериологической петлей диаметром 5 мм с пленки, образовавшейся на поверхности жидкой среды накопления, на среду TCBS-агар штрихом до изолированных колоний.

Учет результатов проводят через 18-20 ч инкубации при температуре 37 °С. Колонии холерного и НАГ-вибрионов должны быть ярко-желтыми диаметром 1,5-2,0 мм. Сопутствующая микрофлора на среде TCBS-агар не растет, за исключением протеев, образующих очень мелкие отдельные колонии сине-зеленого цвета

Среды для идентификации вибрионов.

Среды с углеводами для отбора колоний:

Среды Гисса.

К 100 мл 1 % пептонной воды (рН 7,3 ±0,1) без селитры добавляют 0,5—1 % необходимого углевода или спирта (L-арабиноза, D-манноза, D-сахароза, D-маннит, L-инозит, D-глюкоза, растворимый крахмал и др.) и 1 % индикатора Андреде или 0,1 мл 1,6 % раствора бромтимолового синего. Среды разливают в стерильные пробирки с поплавками и стерилизуют при 0,5 атм 20 мин; среду с L-арабинозой следует стерилизовать в течение 20 мин при 0,1—0,2 атм. Для приготовления сред Гисса можно применять только перечисленные изомеры углеводов. Готовые среды Гисса с индикатором Андреде светлые, при кислотообразовании краснеют. Среды с бромтимоловым синим зеленого цвета с травянистым оттенком, при кислой реакции - желтого цвета, при щелочной - синего.

Среда Ресселя

Пептон - 5,0

Натрия хлорид - 5,0

Лактоза-10,0

Глюкоза - 1,0

Агар-агар-10,0

Индикатор Андреде - 40 мл

Вода дистиллированная - 1 л

рН 7,3 ±0,1

Среду варят, фильтруют, разливают по 5—7 мл в стерильные пробирки и стерилизуют при давлении 0,5 атм 20 мин. Готовую среду после стерилизации скашивают так, чтобы получить столбик и косяк. Среда светлая.

Среду можно готовить на 1—1,3%-ном питательном агаре, добавляя к нему в соответствующих концентрациях углеводы и индикатор Андреде.

Лактозосахарозная среда.

Готовится, как и среда Ресселя, но вместо глюкозы берут сахарозу в том же количестве.

Маннозосахарозная среда.

1,5 % питательный агар	- 1 л
Манноза	- 1,0
Сахароза	- 10,0
Серно-кислое железо (FeS04)	- 0,2
Гипосульфит натрия (Na2S03x5H20)	- 0,08
Сульфит натрия (Na2S03)	- 0,4
0,2 % феноловый красный	- 10,0

После расплавления рН среды довести до 8,0, разлить в пробирки по 5—7 мл и стерилизовать при 0,7 атм. - 15 мин. Готовую среду после стерилизации скашивают так, чтобы получить столбик и косяк.

Среда Клиглера.

1,5—1,7 %-ный мясопептонный агар или другой слабощелочной питательный агар - 1 л
Лактоза - 10,0 г

Глюкоза	- 1,0 г
2 %-ный раствор серно-кислого закисного железа	- 10,0 мл
0,8 %-ный раствор тиосульфата натрия	- 10,0 мл
0,4 %-ный раствор сульфата натрия	- 10,0 мл
1 %-ный раствор фенолового красного	- 24,0 мл;
pH 7,3 ± 0,1;	

В начале в расплавленном питательном агаре (pH 7,7 ± 0,1) растворяют углеводы, затем к нему добавляют свежеприготовленные растворы железа и солей натрия согласно прописи среды (индикатор на сероводород). Кроме того, для регистрации кислотообразования добавляют индикатор феноловый красный. Среду варят, фильтруют, разливают по 5—7 мл в стерильные пробирки, стерилизуют 20 мин при давлении 0,5 атм. и скашивают по типу среды Ресселя. pH готовой среды 7,3 ± 0,1, цвет красный.

Среда Хью-Лейфсона.

Пептон	- 2,0
Натрия хлорид	- 5,0
Двухзамещенный фосфат калия	- 0,3
Глюкоза	- 10,0
Бромтимоловый синий	- 0,03
Агар-агар	- 3,0
Дистиллированная вода	- 1 л
pH 7,1 ± 0,1	

К воде добавляют пептон, натрия хлорид и агар-агар. Смесь подогревают до расплавления агара, затем вносят фосфат калия и глюкозу, продолжают кипятить 2—3 мин. Смесь подщелачивают 20%-ным раствором едкого натрия до pH 7,4 ± 0,1, доводят объем среды до первоначального и добавляют 3 мл 1 %-ного водного раствора бромтимолового синего. Затем среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по 4—5 мл в стерильные пробирки и стерилизуют при давлении 0,5 атм. 20 мин. Цвет среды до стерилизации синий, а после автоклавирования травянисто-зеленый, pH 7,1 ± 0,1. При кислой реакции среда желтеет.

Среда с мочевиной (Кристенсена):

Пептон	1 г
Хлорид натрия	5 г
Однозамещенный фосфат калия	2 г
Глюкоза	1 г
Феноловый красный	0,012 г
Агар-агар	20 г
Мочевина	20 г
Дистиллированная вода	1 л

pH 6,8

Предварительно промытый агар-агар или порошкообразный вносят в воду и нагревают до расплавления. Затем добавляют пептон, соли и глюкозу и дают агару вскипеть, после чего вносят феноловый красный, предварительно растворенный в 0,1 N раствора едкого натра. Учитывают количество щелочи, ушедшей на растворение индикатора, и приливают к смеси остальное ее количество до общего объема 25 мл. Дают всей смеси вновь закипеть. Среду разливают по 5 мл в стерильные пробирки и стерилизуют в течение 20 мин при 0,5 ат. После охлаждения среды до 50 °С в каждую пробирку добавляют по 0,5 мл 20% раствора мочевины (20 г мочевины растворяют в стерильной дистиллированной воде и кипятят в водяной бане в течение 30 мин). Полученную среду охлаждают в наклонном положении для получения скошенного агара. Цвет готовой среды желтовато-зеленый. При щелочеобразовании цвет среды изменяется от желтого до красно-фиолетового.

Бульон Кларка.

Пептон	- 5,0
Глюкоза	- 5,0

Двузамещенный фосфат калия - 5,0
 Дистиллированная вода - 1 л
 Смесь ингредиентов нагревают до полного их растворения, затем фильтруют через бумажный фильтр и разливают по 5 мл в стерильные пробирки. Бульон стерилизуют при давлении 0,5 атм. 20 мин.

Среда Кодама. В 1 %-ную пептонную воду добавляют 0,5 % растворимого крахмала. Среду разливают в стерильные пробирки и стерилизуют 20 мин под давлением 0,5 атм. Для оценки результатов расщепления крахмала используют реактив Люголя.

Среда с крахмалом и индикатором. В 1% пептонную воду для цветного ряда добавляют 1 % растворимого крахмала и 1% индикатора Андреде. Среду разливают в стерильные пробирки и стерилизуют 20 мин при 0,5 ат. Среда светлая, при наличии кислоты краснеет.

Среда с желатиной. К мясопептонному бульону или бульону Хоттингера прибавляют мелко нарезанную желатину из расчета 10,0—15,0 г на 100 мл (летом концентрацию желатины увеличивают до 20 %). Желатине дают набухать в течение 30 мин и затем растворяют при медленном нагревании в водяной бане при температуре $(45,0 \pm 5,0)$ °С. Устанавливают рН $7,1 \pm 0,1$, прибавляя к расплавленной желатине 10%-ный раствор двууглекислого натрия. При более щелочной реакции желатина застывает плохо, а иногда и совсем не застывает. В 1 л растворенной желатины вносят для просветления два взбитых с небольшим количеством дистиллированной воды яичных белка. Смесь перемешивают и прогревают текучим паром в течение 20 мин до полного свертывания белка и просветления среды. Затем среду фильтруют в горячем состоянии через бумажный или ватно-марлевый фильтр с большой поверхностью. Среду, разлитую по 5—8 мл в пробирки, стерилизуют при давлении 0,5 атм 20 мин. После стерилизации среду охлаждают путем погружения пробирок в холодную воду в строго вертикальном положении, чтобы верхняя часть столбика при застывании оставалась совершенно ровной.

Среда для определения декарбоксилаз и дегидролаз аминокислот.

Пептон	- 5,0
Дрожжевой экстракт	- 25,0 (сухой 3,0)
Глюкоза	- 1,0
Натрия хлорид	- 5,0
Натрия карбонат	- 0,1
Бромтимоловый синий(0,1 %-ный р-р в 20 %-ном спирте) (сухого)	- 45,0 (0,045 г)
Аминокислота	- 10—20,0
Дистиллированная вода	- 1 л

рН $6,4 \pm 0,1$

Все ингредиенты по прописи вышеуказанной среды растворяют при нагревании, устанавливают рН $6,4 \pm 0,1$, затем добавляют соответствующий индикатор и делят среду на 4 равные части. В одну часть аминокислоты не добавляют, эта порция служит контролем. В остальные порции вносят соответственно: в первую - 1 % лизина, во вторую - 1 % орнитина, в третью - 1 % аргинина. Аминокислоты должны быть в L-форме, если имеются D-аминокислоты, то добавляют 2 %, т. к. микроорганизмы активны только в отношении L-форм. После добавления аминокислот перед стерилизацией, в случае необходимости, реакцию среды исправляют 0,1 %-ным раствором соляной кислоты. Среду разливают по 1—2 мл в химически чистые стерильные пробирки и стерилизуют при давлении 0,1—0,2 атм. 20 мин. Небольшое количество флокюлята в средах не имеет значения. Пептонно-дрожжевая среда имеет травянисто-зеленый цвет, при кислой реакции среда желтеет, при щелочной - синеет.

Среды для определения гемолитической активности (поГрейгу)

Сердечно-мозговой настой.

сердечный настой	- 500,0 мл
мозговой настой	- 500,0 мл
пептон	- 10,0 г

натрия хлорид
рН 7,3 ±0,1

- 5,0 г

Смесь кипятят до полного растворения пептона и соли, устанавливают необходимую реакцию, разливают в пробирки по 4,0— 5,0 мл, стерилизуют при 0,7 атм - 20 мин.

Мясопептонный бульон; мясная вода с 1 %-ным сухим пептоном и 0,85 %-ной поваренной соли. Способ приготовления, стерилизации тот же, что для сердечно-мозгового настоя.

К 1 мл 18—24-часовой культуры, выращенной в 4—5 мл мясопептонного бульона или сердечно-мозгового настоя, добавляют 1 мл 1 %-ной взвеси трижды отмытых эритроцитов барана в физиологическом растворе. Смесь бульонной культуры и эритроцитов осторожно перемешивают встряхиванием и помещают на 2 ч в термостат при температуре (37,0 ± 0,5) С, а затем в холодильник до следующего дня. Предварительный учет результатов проводят через 2 ч, окончательный - на следующий день. При положительной реакции наступает полный или частичный лизис эритроцитов (лаковая кровь). В контроле (1 мл бульона + 1 мл взвеси эритроцитов) гемолиз отсутствует. Чистоту опыта следует контролировать путем посева «смеси» на агаровую среду.

Сроки хранения сред

Для сред лабораторного изготовления определены следующие сроки хранения:

Срок хранения 1 %-ной пептонной воды, при герметичной упаковке (резиновые пробки и металлические колпачки) - 2 месяца, а после переконтроля возможно продление срока хранения на 1 месяц.

Питательные среды, готовые к употреблению, хранят в темном прохладном месте (6—20 °С), не допуская перепада температур больше чем на 5 °С. Подъем и снижение температур губительно действуют на биологические свойства сред.

Щелочной агар и основной пептон, контролируемые авирулентным тест - штаммом холерного вибриона, подлежат периодической перепроверке вирулентными тест-штаммами по согласованию с территориальными центрами госсанэпиднадзора и противочумными учреждениями, на базе последних. Ежегодному контролю в территориальном противочумном учреждении подлежит также теллурид калия.

Среды культивирования для анаэробов

Среда Вильямса-Хоббс: бульон Хоттингера, агар, лактоза, 1% нейтральный красный, суспензия желтка куриного яйца.

Среда Вильсона-Блер: МПА, глюкоза, сульфит натрия, хлорид железа.

Бензидиновый агар: 10 мл раствора, состоящего из бензидина, 1 N раствора соляной кислоты, дистиллированной воды, смешивают с 10 мл агара.

Среда Китта-Тароцци: печень или мясо заливают питательным бульоном и кипятят. Бульон фильтруют. По 3-4 г печени распределяют по пробиркам и заливают бульоном.

Бульон Вейнберга: мясную воду из сердца быка с пептоном разливают в пробирки и заливают кусочки вареной печени.

Кровяной агар: МПА, глюкоза, свежая дефибринированная кровь человека.

Среды для выделения и культивирования возбудителя коклюша

Бордетеллагар

Представляет собой гигроскопичный мелкодисперсный порошок серого цвета

Состав г/л:

Солянокислотный гидролизат казеина

19,0

Экстракт пекарных дрожжей	5,0
Натрий хлорид	5,0
Крахмал	2,0
Уголь активированный	12,0
Натрий карбонат	0,6±0,2
Агар	12,0±2,0
pH готовой среды	7,2±0,2

Приготовление:

Навеску препарата, указанную на этикетке (47,0±2,0 г), размешивают в 1 л дистиллированной воды, стерилизуют автоклавированием при температуре 121 °С в течение 15 мин, охлаждают до температуры 45-50 °С и разливают в стерильные чашки Петри слоем 5-6 мм.

Контроль качества:

Питательная среда обеспечивает рост тест-штаммов *Bordetella pertussis* NN 39, 79, 143, 649, 688, 703 и 796 на всех засеянных чашках Петри при посеве по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из концентрации $2,5 \cdot 10^3$ м.к/мл через 72 ч инкубации при температуре (37±1) °С. Тест-штаммы растут в виде выпуклых, круглых, четко контурированных, блестящих, гладких колоний диаметром 0,5-1,0 мм, серовато-кремового цвета, вязкой консистенции.

Среды для бактериологических исследований при дифтерии

НПО "Питательные среды", г. Махачкала выпускает сухую хинозольную дифференциально - диагностическую среду Бучина для выделения коринебактерий дифтерии, которая готовится по прописи на этикетке с добавлением 5% крови (не допускается добавление сыворотки вместо крови). Среда Бучина уступает кровяным теллуритовым средам по ингибирующей активности, а колонии возбудителя дифтерии могут появляться на сутки позднее, чем на кровяных теллуритовых средах. В последние годы ГосНИИ прикладной микробиологии (п. Оболенск Московской обл.) выпускает питательную среду для выделения коринебактерий дифтерии - коринебакагар. Однако, по сравнению с кровяными теллуристыми средами, на данной среде вырастает в 2 - 3 раза меньше колоний коринебактерий дифтерии.

Учитывая выше изложенное, по-прежнему, лучшими питательными средами для первичного посева материала являются кровяные теллуристые среды. В качестве основы для этих сред можно использовать сухой питательный агар (СПА) производства НПО

"Питательные среды" (г. Махачкала), питательный агар на основе панкреатического гидролизата рыбной муки (ГРМ) производства ГНИИПМ (п. Оболенск). Питательные агары готовят по прописи на этикетке и *ex tempore* добавляют кровь и теллурит калия.

Для определения токсигенных свойств коринебактерий дифтерии выпускается коммерческая сухая среда ОТДМ (НПО "Питательные среды", г. Махачкала) и ГНИИПМ (п. Оболенск Московской обл.). Данные среды готовятся по прописи на этикетке. Лучшей основой при приготовлении среды для определения токсигенности и пробы Пизу остается Мартеновский пептон, который готовится в условиях лаборатории или в отделах питательных сред некоторых научно - исследовательских институтов для приготовления Мартеновского агара.

Для отсева колоний и культивирования коринебактерий дифтерии в лабораторных условиях готовят сывороточную агаровую среду.

Применение свернутой сыворотки является нецелесообразным. Каждая новая серия питательной среды (как коммерческой, так и приготовленной в лабораторных условиях) подлежит бактериологическому контролю.

В тех случаях, когда ростовые свойства питательной среды не удовлетворяют предъявляемым требованиям, питательные агаровые основы готовят на бульонах - сухой питательный бульон (СПБ) производства НПО "Питательные среды" (г. Махачкала), ГРМ-бульон производства ГНИИПМ (п. Оболенск); бульон на аминокептиде для микробиологических целей производства мясокомбинатов (г. г. С.-Петербург, Армавир,

Ставрополь) и бульонах, приготовленных в лабораторных условиях (перевар Хоттингера, 1% пептонная вода, с содержанием аминного азота 150 - 180 мг/%).

Питательные среды для первичного посева разливают по чашкам Петри слоем 3 - 4 мм. Они могут быть использованы в течение 3 суток, при условии хранения при температуре 4 С.

Рецептура основных питательных сред и реактивов

Транспортная среда (среда накопления)

В качестве основы для приготовления транспортной среды используют 0,1% питательный агар на переваре Хоттингера или 0,1% агар на коммерческом питательном бульоне, рН 7,6. 0,1% агаровую основу разливают в пробирки по 4 мл, стерилизуют в автоклаве при 1 атм в течение 20 мин. Срок хранения - до 1 месяца при 4 С. Перед употреблением в каждую пробирку, с соблюдением правил асептики, добавляют 0,5 - 1,0 мл сыворотки крупного рогатого скота и по 0,05 мл (1 капля) 2% раствора теллурита калия. Среду выборочно контролируют на стерильность, выдерживая при 37 С в течение 48 часов. Срок хранения готовой среды - 10 дней при 4 С.

Жидкая питательная среда для постановки РНГА

С целью индикации дифтерийного токсина в РНГА материал с чашки первичного посева засевают в пробирку с жидкой сывороточной питательной средой, приготовленной на основе бульона Мартена, с содержанием аминного азота 150 - 180 мг/%, рН 7,6. Питательный бульон разливают в пробирки по 3,5 мл, стерилизуют в автоклаве при 1 атм. в течение 20 мин. Срок хранения - до 1 мес. при температуре 4 С.

Перед употреблением в каждую пробирку с соблюдением правил асептики добавляют 0,5 мл сыворотки крупного рогатого скота и 0,05 мл (1 капля) 2% раствора теллурита калия. Среду контролируют на стерильность и хранят так же, как и полужидкую транспортную среду.

Среды для первичного посева исследуемого материала

Среда Клауберга II

К 100 мл стерильной питательной агаровой основы (рН 7,6), расплавленной и охлажденной до 50 С, добавляют 10 мл глицериновой смеси, 50 мл "лаковой" крови и 3 мл 2% раствора теллурита калия. Принимая во внимание, что питательная среда разводится глицериновой смесью и "лаковой" кровью в 1,6 раза, при приготовлении данной среды следует увеличить навеску сухого питательного агара, в 1,6 раза.

Пример расчета. На этикетке флакона с сухим коммерческим питательным агаром указана навеска, необходимая для приготовления одного литра среды, например 30 г. Для приготовления 1 литра питательной основы для среды Клауберга II следует взять навеску 48 г (т.е. $30 \text{ г} \times 1,6 = 48 \text{ г}$).

Для приготовления глицериновой смеси к 40 мл дефибринированной крови или кровяной смеси добавляют 20 мл химически чистого стерильного глицерина (глицерин стерилизуют при температуре 110 С в течение 30 мин.).

Для приготовления "лаковой" крови к 34 мл стерильной дистиллированной воды добавляют 16 мл дефибринированной крови.

Кровяной теллуритовый агар (КТА)

К 100 мл стерильной питательной агаровой основы (рН 7,6), расплавленной и охлажденной до 50° С, добавляют 7 мл дефибринированной или 10 мл гемолизированной крови и 2 мл 2% раствора теллурита калия. Вместо крови можно использовать сухую теллуритовую смесь (11 мл на 100 мл среды), при этом, на 100 мл КТА добавляют extempore 1 мл 2% раствора теллурита калия, т.к. 1 мл 2% раствора уже содержится в 11 мл кровяной теллуритовой смеси. Принимая во внимание, что питательная среда разводится кровью примерно в 1,1 раза, при приготовлении данной среды следует увеличить навеску сухого питательного агара в 1,1 раза.

Пример расчета: На этикетке флакона с сухим коммерческим питательным агаром указана навеска, необходимая для приготовления одного литра среды, например, 30 г. Для приготовления 1 литра питательной основы для КТА следует взять навеску 33 г (т.е. $30 \text{ г} \times 1,1 = 33 \text{ г}$).

Методика приготовления кровяных и кровяно-теллуритовых смесей

Для приготовления питательных сред лучше всего использовать дефибрированную кровь животных - крупного рогатого скота, лошадей, свиней, овец, кроликов. Кровь собирают в стерильные сосуды с бусами с помощью специально смонтированной системы,

соблюдая правила асептики. В отдельных случаях кровь собирают, не монтируя специальных систем, сливая первые порции крови вне бутыли.

Можно использовать кровь человека с истекшим сроком годности (цитратную и с консервантами), приготовив из нее специальные кровяные смеси. Для этого необходимо удалить жидкую часть отстоявшейся крови, содержащую цитрат натрия и консерванты. К оставшейся в сосуде эритроцитарной массе добавить стерильный физиологический раствор, который также можно удалить после оседания эритроцитов, и добавить дистиллированной воды до первоначального объема.

Хорошим сырьем для получения кровяной смеси служит эритроцитарная масса, которая может оставаться при производстве гаммаглобулина и других препаратов крови. К эритроцитарной массе добавляют стерильную дистиллированную воду из расчета $1/3$ объема эритроцитарной массы.

Можно также использовать кровяные сгустки, остающиеся после серологических реакций (при отрицательном результате реакции), сгустки плацентарной или абортной крови. Сгустки собирают в стерильные бутыли со стеклянными бусами или битым стеклом, затем их замораживают и оттаивают, после чего сгустки легко разбиваются бусами. Эту процедуру можно повторить 2 - 3 раза. Затем добавляют стерильную дистиллированную воду из расчета $1/4$ объема сгустков.

В кровяные смеси, приготовленные вышеуказанным способом добавляют теллурит калия в качестве консерванта. К каждому 10 мл кровяной смеси добавляют 1 мл 2% раствора теллурита калия. Такую кровяно - теллуритовую смесь можно сохранять при 4 С до 2 месяцев.

Пример расчета: Если из отстоявшейся цитратной крови объемом 250 мл было удалено 50 - 60 мл жидкой части, то необходимо добавить такое же количество - 50 - 60 мл стерильного

физиологического раствора, перемешать, вновь дать отстояться, после чего удалить 50 - 60 мл жидкой части и внести 50 - 60 мл стерильной дистиллированной воды.

Таким образом, будет получено 250 мл кровяной смеси. Для ее консервирования необходимо добавить 25 мл 2% теллурита калия (на каждые 10 мл кровяной смеси прибавляют 1 мл 2% теллурита калия).

В дальнейшем при приготовлении кровяной теллуритовой среды на каждые 100 мл питательного агара добавляют 11 мл кровяной теллуритовой смеси (10 мл кровяной смеси и 1 мл 2% раствора теллурита калия). *Extempore* в такую среду добавляют еще 1 мл 2% раствора теллурита калия.

Для теллуритовых сред используют готовый коммерческий 2%-раствор теллурита калия.

При отсутствии коммерческого препарата раствор теллурита калия готовят следующим образом: в 100 мл дистиллированной воды растворяют 2 г кристаллического теллурита калия. Для стерилизации раствор прогревают в кипящей водяной бане 30 мин. и сохраняют при температуре 4⁰С. Кристаллический теллурит калия хранят герметически закрытым в банке из темного стекла.

Сывороточный агар

Сывороточный агар, используемый для отсева колоний и культивирования коринебактерий дифтерии, может быть приготовлен на любой из перечисленных выше питательных основ.

К 100 мл расплавленного и охлажденного до температуры 50⁰ С питательного агара (рН 7,6) стерильно добавляют 10 мл сыворотки крупного рогатого скота. Среду перемешивают, разливают в стерильные пробирки по 4 - 5 мл и устанавливают их в наклонном положении для получения скошенного агара, каждая партия которого проверяется на стерильность. Несколько пробирок помещают на сутки в термостат. В случае прорастания среды бракуется вся партия.

Пробирки со скошенным сывороточным агаром хранят при 4⁰ С до 2 недель.

Мартеновский агар с мясной водой двойной концентрации

Мартеновский пептон - 0,5 л, мясная вода - 0,5 л, агар - агар - 15 г, уксусно - кислый натрий - 5 г, мальтоза - 3 г.

15 г агара промывают в течение рабочего дня в проточной водопроводной воде, тщательно отжимают и переносят в 1 л мартеновского бульона (0,5 л мартеновского пептона и 0,5 л мясной воды). Устанавливают рН 7,8 - 8,0 путем подщелачивания бульона 20% раствором NaOH по бумажке с индикатором крезоловый красный, которая при этой реакции изменяет желтый цвет на розово - малиновый. Бульон кипятят в течение 10 мин. затем добавляют 0,5% (5 г на 1 л) уксусно - кислого натрия, 0,3% мальтозы (3 г на 1 л), проверяют рН и, если нужно, снова доводят до 7,8 - 8,0, кипятят в течение 15 мин., дают отстояться в теплом месте (в аппарате Коха или термостате) 2 - 3 часа и фильтруют через тканевый или ватно - марлевый фильтр. Разливают в стерильные флаконы (70 - 80 мл) при большом объеме работы или пробирки (10 мл) и стерилизуют однократно текучим паром в течение 30 мин.

Мартеновский пептон

Свиные желудки, желательно парные, с упругими стенками, большим количеством слизи и без катаральных явлений очищают от жира (желудки, пропитанные желчью отбрасывают), разрезают и измельчают в мясорубке. Полученный фарш из желудков помещают в бутылки емкостью 3 - 5 литров и заливают подогретой до 50⁰ С водой из расчета на 1 литр воды 300 - 500 г измельченной массы. Туда же добавляют 1% химически чистой соляной кислоты (уд. вес 1,19).

Массу хорошо перемешивают и ставят в термостат: либо на 15 - 18 часов (или более) при 37⁰ С; либо, при наличии отдельного термостата при 42⁰ С, на 18 часов (или более). В течение процесса переваривания бутылку встряхивают, вначале чаще

(через 1 - 1,5 часа), затем реже. В хорошо переваренном пептоне на дне бутылки лежит небольшой слой мелкого темного осадка.

Полноту осаждения балластных белков можно проверить путем добавления к 5 мл профильтрованного пептона 1 - 2 капли 10% NaOH, муть не должна появляться. Действие фермента останавливают нагреванием в водяной бане, постепенно доводя температуру до 80° С, устанавливаемую по показанию термометра, погруженного в бутылку с переваром.

Нагревание продолжается в течение 10 мин. Для этой цели можно использовать аппарат Коха или автоклав. Бутылки тщательно взбалтывают, закрывают ватно - марлевой пробкой с бумажным колпачком и ставят в прохладное сухое помещение для отстаивания при температуре не выше 12° С. Пептон годен к употреблению не ранее, чем через 7 дней, когда плотно осядут взвешенные частицы.

Необходимо добавить 20 мл хлороформа на 1 л пептона для консервирования и закрыть бутылку резиновой пробкой. В таком виде пептон может храниться без стерилизации при комнатной температуре.

Мясная вода

Для приготовления мясной воды двойной концентрации желательно использовать свежее мясо молодого животного средней упитанности.

Обезжиренное, освобожденное от сухожилий мясо пропускают через мясорубку, заливают водой в пропорции 1 л воды на 1 кг фарша и оставляют на ночь при 4° С, утром смесь кипятят на асбестовой сетке в течение 15 - 20 мин. с момента закипания. Готовый отвар фильтруют, фарш отжимают, полученную мясную воду разливают в стерильные бутылки по 250 - 500 мл и стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 мин. Хранят при 4 С.

Бумажки с индикатором крезоловый красный

0,1 г крезолового красного растворяют в 100 мл 95% спирта и оставляют при температуре 37° С на 24 часа, часто встряхивая. На следующий день смачивают в этом растворе полоски фильтровальной бумаги и быстро высушивают. Ярко - желтый цвет бумажек в щелочной среде переходит в разные оттенки красного.

Среды для определения цистиназной активности

Среда Пизу на Мартеновском агаре

К 90 мл расплавленного 1,5% Мартеновского агара (не допускается использование агара Хоттингера), pH 7,6, добавляют 2 мл 1%-раствора L-цистина в 0.1N растворе соляной кислоты (HCl), тщательно перемешивают и добавляют такой же объем 0.1N раствора NaOH для нейтрализации кислоты. Растворы кислот и щелочей должны быть взаимно оттитрованы, можно использовать фиксаналы, выпускаемые предприятиями химической промышленности.

Среду стерилизуют при температуре 112° С в течение 30 мин., сохраняют в течение 1 месяца при 4° С.

Агар с цистином расплавляют при 90° С (среду не кипятят - для сохранения цистина). К охлажденной до 45° С среде добавляют 1 мл 10% раствора уксуснокислого свинца и 9 мл сыворотки крупного рогатого скота, с соблюдением правил асептики, и разливают по пробиркам.

Необходимо учитывать, что при температуре среды 50° С и выше, в присутствии уксуснокислого свинца, сыворотка мутнеет и среда приобретает молочный цвет. Это затрудняет учет результатов реакции.

Среда Пизу на основе коммерческой среды АГВ

Для приготовления среды Пизу можно использовать доступную и сбалансированную по составу коммерческую среду АГВ, применяемую в бактериологической практике для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Навеску сухой среды АГВ в количестве 2,7 г вносят в 90 мл дистиллированной воды и кипятят до ее полного растворения. Готовят 5% раствор гидрокарбоната натрия. Для этого растворяют 0,5 г NaHCO_3 в 10 мл дистиллированной воды. Затем в раствор вносят 0,1 г L-цистина и кипятят до полного растворения цистина. Затем 2 мл кипящего щелочного раствора цистина вносят в 90 мл расплавленной среды АГВ, доводят pH до 7,6 и стерилизуют при 112°C в течение 10 мин. К расплавленной и охлажденной до 45°C основе последовательно добавляют: 10 мл сыворотки крупного рогатого скота, 1 мл 10% раствора уксуснокислого свинца, 1,5 мл стерильного свежеприготовленного 10% раствора тиосульфата натрия и разливают по пробиркам. Растворы уксуснокислого свинца и тиосульфата натрия готовят extempore, используя стерильные пробирки и дистиллированную воду, стерилизуют текучим паром или на водяной бане в течение 30 мин.

Данный вариант среды Пизу используют при отсутствии Мартеновского агара. Однако необходимо учитывать, что дифференциально - диагностические свойства этой среды по сравнению со средой, приготовленной на Мартеновском агаре, менее выражены.

Среды для определения уреазной активности

Пробу на уреазу можно ставить в 2 вариантах: по методу Заксе и путем посева на бульон с мочевиной.

Приготовление реактивов для определения уреазной активности по методу Заксе

Готовят 2 реактива - А и В.

Реактив А:

Мочевина	2 г
96% этиловый спирт	2 мл
Дистиллированная вода	4 мл

Реактив В:

0,2%-раствор фенолрот	1 мл
Однозамещенный фосфат калия (K_2HPO_4)	0,1 г
Двухзамещенный фосфат калия (K_2HPO_4)	0,1 г
Хлорид натрия (NaCl)	0,5 г
Дистиллированная вода	100 мл

Реактив А не стерилизуют и хранят при температуре 4°C . Реактив В стерилизуют в автоклаве текучим паром.

Бульон с мочевиной

К 100 мл стерильного мясо - пептонного или бульона Хоттингера (pH 7,0) добавляют 1 г мочевины и 0,2 мл 1,6% спиртового раствора индикатора крезолрот. Разливают по 2 - 3 мл в стерильные пробирки и стерилизуют текучим паром в течение 10 мин.

Среда для определения сахаролитической активности

Для определения сахаролитической активности рекомендуется использовать питательную среду на 1% пептонной воде.

К 100 мл горячей дистиллированной воды добавляют 1 г пептона, 0,5 г химически чистого NaCl и 1 мл индикатора Андрее.

Устанавливают pH 7,4, кипятят 5 мин., фильтруют через бумажный или полотняный фильтр, доводят до первоначального объема горячей дистиллированной водой. К

полученной основе добавляют один из углеводов: сахарозу, глюкозу (в количестве 1 г), крахмал (0,5 г).

Среды разливают в пробирки по 2 - 3 мл и стерилизуют текучим паром в течение 3 дней по 30 мин. или при 0,5 атм. 30 мин. Готовые среды с индикатором Андрее бесцветные или имеют слегка розоватый оттенок.

Индикатор Андрее

Посуда для приготовления индикатора должна быть сухой, химически чистой, с притертой пробкой.

К 100 мл дистиллированной воды добавляют 0,5 г кислого фуксина и 16,4 мл 4-процентного раствора NaOH. Раствор на сутки оставляют при 37° С, периодически встряхивая, двое суток выдерживают на свету и затем убирают в темное место. Свежеприготовленный раствор имеет соломенно - желтый цвет или слегка розовый оттенок, который исчезает в процессе хранения. При интенсивно - розовой окраске раствора в процессе приготовления индикатора необходимо добавить еще 1,6 мл 4-процентного раствора NaOH.

Среда для определения нитритредуктазной активности

К 100 мл питательного бульона (МПБ или бульона Хоттингера) рН 7,3 - 7,5, свободному от нитритов (проверить реактивом Грисса или Касаткина), прибавляют 0,1 г свободного от нитритов нитрата калия. Проверяют еще раз на содержание нитритов и разливают по 3 - 2 мл в химически чистые, сухие пробирки. Среды стерилизуют 15 мин. при 120° С.

Реактив Грисса

Раствор 1: 0,8% сульфаниловая кислота в 5N уксусной кислоте.

Раствор 2: 0,6% диметил-альфа-нафталамин в 5N уксусной кислоте.

Перед выполнением реакции смешивают равные объемы растворов 1 и 2. Реактив годен к применению в течение 15 мин., бесцветен, при появлении розового окрашивания - непригоден. Растворы 1 и 2 хранят при 4° С в течение 2 мес.

Реактив Касаткина

Раствор 1: 0,1% раствор риванола в дистиллированной воде.

Раствор 2: 12% раствор соляной кислоты (HCl).

Перед выполнением реакции смешивают равные объемы растворов 1 и 2. Реактив годен к применению в течение 15 мин. Растворы 1 и 2 хранят при 4° С в течение 2 мес.

Среда для культивирования возбудителей туберкулеза

Среда Левентейна-Йенсена

Предназначена для культивирования и выделения микобактерий туберкулеза из клинического материала. Может быть использована для определения лекарственной чувствительности микобактерий туберкулеза после добавления в среду соответствующего препарата

Представляет собой гигроскопичный мелкодисперсный порошок светло-зеленого цвета.

Состав, г на 600 мл H₂O

Л-аспарагин	3,6
Калий дигидрофосфат	2,6
Магний сульфат	0,26
Магний цитрат	0,6
Крахмал	30,0
Малахитовый зеленый	0,4

Приготовление:

Препарат в количестве, указанном на этикетке (37,2 г), растворяют в 600 мл дистиллированной воды, добавляют 12 мл глицерина, стерилизуют 20 мин при температуре 121 °С.

Стерильно вносят 1000 мл яичной массы, перемешивают, разливают в пробирки. Коагуляцию проводят при температуре 85°С в течение 45 мин.

Контроль качества:

Питательная среда обеспечивает рост тест-штамма *Mycobacterium tuberculosis* H37 Ra при посеве 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10⁻⁵ через 27-29 суток инкубации при температуре (37±1)°С.

Казеиново-солевая среда (Р.А. Школьниковой)

К 890 мл подогретой дистиллированной воды добавляют в указанном порядке следующие ингредиенты:

- 1,5 г. Одноосновного фосфата калия (KH₂ PO₄)
- 2,5 г. Двухосновного фосфата натрия (Na₂ HPO₄)
- 1,5 г. Цитрата натрия (Na₂C₆H₅O₄ 2H₂O)
- 0,5 г. Цитрата аммиачного железа (FeNH₄C₆H₅O₇)
- 80 мл гидролизата казеина
- 30 мл глицерина химически чистого

Каждый ингредиент добавляют после того, как растворится предыдущий. Среду фильтруют через бумажный фильтр и разливают по 2 мл в пробирки. Стерилизуют при 120°С 30 мин; pH среды не устанавливают. Среду употребляют для посева серьезных пунктатов. При посеве другого материала к каждой пробирке казеиново-соловой среды добавляют 0,2 мл (10%) человеческой цитратной плазмы.

Среда Сотона

Состав:

Аспарагин	4 г.
Глицерина	60 мл.
лимонной кислоты	2 г.
Двухосновного фосфата калия (K ₂ HPO ₄)	0.5 г.
Сульфата магния	0,5 г.
Цитрата аммиачного железа	0,05 г.
До 1000 мл дистиллированной воды	

Разливают в стерильные пробирки и колбы, стерилизуют в автоклаве, доведя давление до 1 атм. И тут же выключив подогрев.

Среда Финна II

Солевая основа (раствор):

сульфата магния	0,5 г
цитрата натрия	1 г
квасцов железозамещенных	0,05 г
фосфата калия однозамещенного	20 г
цитрата аммония однозамещенного	5 г
натрия глутамата однозамещенного	10 г
глицерина	20 мл
до 1000 мл дистиллированной воды	

Ингредиенты растворяют в указанном порядке в 700 мл теплой воды, pH (не корректировать) 6,3 – 6,5. Разлить по 300 мл флаконы или колбы, стерилизовать при 1 атм 20 мин.

Яичная масса:

12 яиц моют щеткой с мылом, обрабатывают спиртом. Разбивают стерильным пинцетом и выливают в стерильную колбу с бусами, которую встряхивают после добавления каждого яйца до образования однородной массой. Добавляют 10 мл 2% раствора малахитового зеленого и 300 мл стерильного солевого раствора. Фильтруют через марлевой фильтр, разливают по пробиркам (4 – 5 мл) и выдерживают для свертывания в скошенном положении при 120°С 30 мин.

Среды, применяемые для выделения листерий

Кровяной агар: *Кровяной агаг:* к расплавленному и охлажденному до 45-50°С питательному агару прибавляют 5% дефибренованной или цельной свежевзятой крожи животного.

Глюкозо-печеночно-мясной агар:

Состав:	мясная вода	250 мл
	печеночный отвар	250 мл
	дистиллированная вода	500 мл
	пептон	10 г
	хлорид натрия	5 г
	глюкоза	1%
	агар	20 г

Печеночный бульон: 1 кг фарша из говяжьей печени заливают 1 л воды, настаивают 3 часа при комнатной температуре и варят 2 часа, фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

Бульон на мартеповском пептоне с глюкозой: к готовому мартеповскому бульону добавляют 0,1% глюкозы.

Глюкозо-глицериново-сывороточный агар: к питательному агару добавляют 1% глюкозы, 2% глицерина, 3 – 5% сыворотки.

Среды для выделения кампилобактера

Мясо-пептонно-печеночный агар: РН 7,2 – 7,4

Состав:	мясная вода	250 мл
	печеночный отвар	250 мл
	дистиллированная вода	500 мл
	пептон	10 г
	хлорид натрия	5 г
	агар	20 г

Железо-эритрит-кровоной агар: Готовится из стандартной среды «Эритрит-агар» (НПО «Питательные среды»). На 1 л дистиллированной воды берут 36 г эритрит-агара, 4 г кормовых дрожжей, 0,04 – 0,15 г сернокислого закисного железа. К остуженной до 45-50°С среде добавляют 7% лизированной или 10% цельной бараньей крови, или 5% лизированной человеческой донорской крови.

Транспортная питательная среа: РН 7,2 – 7,4

Состав:	дистиллированная вода	100 мл
	пептон	0,1 г
	хлорид натрия	0,5 г
	калия натрит	0,1 г
	натрия бикарбоната	0,2 г

Среда АГВ – стандартная среда (НПО «Питательные среды»), готовится согласно наставлению. После приготовления в нее добавляют 7% лизированной или 10% цельной бараньей крови.

Среды для выделения возбудителей госпитальных инфекций

Среда Эндо модифицированная.

Среду готовят из сухого препарата по прописи на этикетке. В готовую охлажденную до 60-70 грС среду добавить 1,25 мл 0,01% водного раствора кристаллического фиолетового из расчета на 100 мл среды для ингибции грамположительных микроорганизмов. Разлить в чашки по 15-18 мл.

Дифференциально-диагностическая среда П-2 для выделения протеев.

В 100 мл растопленного 2% питательного агара добавить:

3 мл дрожжевого экстракта,

1 г маннита,

1 г мальтозы,

0,8 г желчных солей по Олькеницкому,

0,2 г цитрата аммоний-железа,

0,05 г тиосульфата натрия,

2,5 мл 0,01% раствора кристаллического фиолетового,

0,5 мл 1,6% щелочного раствора фенолового красного, рН 7,4-7,7.

Стерилизовать при 0,5 атм. 15 мин, прибавить 10-12 тыс. ЕД полимиксина М, разлить в чашки. Среда должна иметь красно-коричневый цвет.

Дифференциально-элективная среда К-2 для выделения клебсиелл.

К 100 мл дистиллированной воды добавить:

агар-агара 2 г,

хлорида натрия 0,5 г,

сульфата магния 0,02 г,

сульфата калия 0,02 г,

двузамещенного фосфата калия 0,2 г,

однозамещенного фосфата калия 0,08 г,

раффинозы 0,5 г (возможна замена 5 г сахарозы), рН 7,0-7,2.

Стерилизовать при 0,5 атм. 15 мин. После стерилизации прибавить 0,5 мл 1,6% щелочного раствора бромтимолового синего, 2 мл 0,01% водного раствора кристаллического фиолетового, 0,2 мл 50% водного самостерилизующегося раствора мочевины, смешать. Смесь разлить в чашки Петри слоем 3-5 мм.

Раствор мочевины самостерилизующийся (50%) готовить следующим образом: 50 гр мочевины растворить в 100 мл стерильной дистиллированной воды (в стерильной посуде) выдержать при комнатной температуре 2-3 суток для «самостерилизации». Последующее хранение при +4 -+6 °С.

Ацетамидный агар для выделения псевдомонад.

К 100 мл дистиллированной воды прибавить:

хлорида натрия 0,5 г,

сульфата магния 0,02 г,

фосфата аммония однозамещенного 0,1 г,

фосфата калия двузамещенного 0,1 г,

ацетамида 2 г,

агара 2,0 г, рН 6,7.

Стерилизовать при 0,5 атм. 15 мин.

Аргинидная среда для выделения псевдомонад.

К 0,3 г аргинина монохлорида добавить:

хлорида магния 0,02 г

однозамещенного фосфата калия 0,08 г,

тиосульфата натрия 0,1 г,

агара 2 г,

воды до 100 мл, рН 7,2-7,4.

Стерилизовать при 0,5 атм. 15 мин, разлить в 6 чашек. После застывания поверхность среды залить тонким слоем другой среды: агара 2 г, трифенилтетразолий

хлорида (ТТХ) 0,8 г (или 8,0 мл 10% водного раствора ТТХ), воды до 100 мл. Инкубация 42-44 часа при 37 гр.

Среда с бриллиантовым зеленым для выделения псевдомонад.

К 100 мл расплавленного стерильного питательного агара прибавить 1 мл аптечного раствора бриллиантового зеленого, предварительно разведенного физиологическим раствором 1: 10. Среду разлить в чашки.

Среда с цетилпиридиний хлоридом для выделения P. Aeruginosa.

К 100 мл дистиллированной воды прибавить:

пептона 2 г,

калия сернокислого 0,7 г,

магния хлористого 0,15 г,

магния сернокислого 0,15 г,

N-цетилпиридиния хлорида 0,2 г,

агар-агара 1 г. рН 6,8-7,0

Стерилизовать при 0,5 атм. 15 мин.

Среды для выделения бактерий рода Acinetobacter.

А. Этанол-аммонийная среда жидкая (ЭАС-1).

К 100 мл дистиллированной воды добавить:

фосфата натрий-аммония 0,15 г,

фосфата калия однозамещенного 0,04 г,

сульфата калия 0,02 г,

хлорида магния 0,02 г.

После стерилизации при 0,5 атм в течении 15 мин прибавить 1,2 мл этилового 96⁰ спирта и разлить асептично по 10 мл в пробирки.

Б. Этанол-аммонийная среда плотная (ЭАС-2).

Основной состав среды тот же, но до стерилизации добавить 1,5 г агара (порошкового 1,8 г) и 0,5 мл 1,6% щелочного раствора бромтимолового синего.

Среды для теста на окисление-ферментацию (OF).

А. Среда Хью-Лейфсона.

К 100 мл дистиллированной воды добавить:

0,2 г пептона,

0,5 г хлорида натрия,

0,03 г K₂ HPO₄,

0,3 г агар-агара,

1 г углевода (глюкоза, фруктоза),

0,3 мл 1% водного раствора бромтимолового синего.

Среду кипятить до полного растворения ингредиентов, установить рН 7,1-7,2, разлить по 3-4 мл в пробирки, стерилизовать при 0,5 атм. 15 мин, остудить столбиком.

Б. Среда Хью-Лейфсона, модифицированная.

К 100 мл дистиллированной воды добавить:

0,2 г K₂ HPO₄

0,4-0,6 г агар-агара,

1 г углевода (глюкоза, фруктоза),

0,5 мл 1,6% щелочного раствора бромтимолового синего.

После растворения ингредиентов в водяной бане установить рН 7,1-7,2, разлить в пробирки высотой 6-8 см. Стерилизовать при 0,5 атм. 15 мин, остудить столбиком. Учет теста на окисление-ферментацию см. в разделе 3.

Среда «ПП» для видовой дифференциации протеев.

Среда двухслойная.

Нижний слой: к 100 мл дистиллированной воды прибавить:

глюкозы 0,2 г,

агара 0,6 г,

фосфата калия однозамещенного 0,1 г,
фосфата калия двузамещенного 0,04 г,
хлорида натрия 0,5 г,
пептона 0,1 г,

1% водного раствора нейтрального красного 1 мл.

Стерилизовать при 0,5 атм. В течении 15 мин. После стерилизации прибавить 1 мл 50% самастерилизующегося раствора мочевины, разлить асептично по 3-4 мл в пробирки и остудить столбиком.

Верхний слой: к 200 мл дистиллированной воды прибавить:

агара 1,2-1,4 г (в зависимости от сорта агара минимальное количество, способное сохранить при застывании скошенное положение),
дрожжевого экстракта 30 мл, или ЭКД 1,2 г.

Стерилизовать при 0,5 атм. В течение 15 мин, прибавить 0,4 г DL-триптофана, 0,06 г тиосульфата натрия и 0,2 г натрий-аммоний фосфорнокислого ($\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$) растворенных в небольшом количестве воды и подогретых в водяной бане до 100 гр С. Разлить асептично поверх нижнего слоя по 6 мл, скосить столбиком высотой 1-1,5 см. Посев штрихом по скошенной поверхности и уколом до дна пробирки. Далее между стенкой пробирки и пробкой поместить полоску реактивной на индол бумаги. После культивирования посевов в течение 18-20 часов при 37⁰ С учесть наличие уреазной активности, продукцию индола и газа на глюкозе. Далее в пробирку налить реактив для определения триптофандеаминазы и сероводорода.

Тест-реактив для определения триптофандеаминазы и продукции сероводорода: к 13 г хлорного железа (FeCl_3) добавить HCl 1,3 мл, дистиллированной воды до 100 м. Реактив хранить в банке с притертой пробкой.

Среда Кинг-А для выявления пиоцианина.

К 2 г пептона добавить:

агар-агара 1,5 г,
глицерина 1 мл,
сульфата калия 1 г,
хлорида магния 0,14 г,
дистиллированной воды до 100 мл, рН 7,2.

Стерилизовать при 0,5 атм. В течении 15 мин, разлить в чашки. Положительный результат – окрашивание среды вокруг колоний в зеленый, синий, синезеленый и бурый цвета.

Список литературы

1. Методы выделения и идентификации энтерогеморрагической кишечной палочки *E. coli* O157:H7, МУК 4.2.992-00, Минздрав России, Москва, 2001.
2. Коротяев А.И., Бабичев С.А. «Микробиология, иммунология, вирусология» Москва, 1999
3. Микробиологическая диагностика инфекционных заболеваний, под ред. Е.П. Красноженова, Томск, 1999.
4. Медицинская микробиология, под ред. Поздеева А.И. М. «Медицина», 2002.
5. Инструкция по клинической лабораторной диагностике кампилобактериоза. Министерств здравоохранения, 1989.
6. Энтеробактерии, руководство для врачей, ред. В.И. Покровский, М. «Медицина», 1985.