

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР**

**ПРИКАЗ**

**22 апреля 1985 г.**

**N 535**

**ОБ УНИФИКАЦИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ  
(БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ) МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ,  
ПРИМЕНЯЕМЫХ В КЛИНИКО - ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ  
ЛЕЧЕБНО - ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ УЧРЕЖДЕНИЙ**

Микробиологические (бактериологические) исследования занимают важное место в общем комплексе клинико - лабораторных исследований, применяемых для профилактики, диагностики и лечения гнойно - воспалительных заболеваний и осложнений у больных в лечебно - профилактических учреждениях.

Современная клиническая медицина предъявляет к микробиологическим (бактериологическим) исследованиям возрастающие требования по увеличению объема, повышению качества исследований, разработке и внедрению новых более совершенных методов. Это связано как с новыми научными достижениями в области эпидемиологии и бактериологии, так и с увеличением гнойно - воспалительных заболеваний, ростом госпитальных инфекций.

Этиологическая структура возбудителей инфекционных процессов в последнее десятилетие изменилась: значительно увеличился удельный вес заболеваний, вызываемых условно - патогенными микроорганизмами (около 200 видов условно - патогенных микроорганизмов). Возрастает роль неспорообразующих анаэробов и некоторых других видов микроорганизмов, роль которых в инфекционной патологии ранее была неизвестна.

Принадлежность возбудителей гнойно - воспалительных заболеваний к условно - патогенным и сапрофитическим организмам существенно изменяет проведение и оценку микробиологических (бактериологических) исследований и требует новых методических подходов.

Для развития микробиологических (бактериологических) исследований в клинико - диагностических лабораториях лечебно - профилактических учреждений необходимо дальнейшее совершенствование материально - технической базы лабораторий, расширение номенклатуры стандартных селективных питательных сред, стандартных наборов для экспресс - методов идентификации условно - патогенных микроорганизмов, агглютинирующих сывороток и увеличение выпуска некоторых видов оборудования.

Требуется совершенствования система заявок на бактериальные препараты для клинико - диагностических лабораторий.

В целях совершенствования микробиологических (бактериологических) лабораторных исследований в лечебно - профилактических учреждениях, повышения уровня и эффективности микробиологической диагностики:

**I. УТВЕРЖДАЮ:**

1. Методические указания по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико - диагностических лабораториях (приложение 1).

2. Задание на разработку сухих питательных сред, тест - наборов, агглютинирующих сывороток для диагностики заболеваний, вызванных условно - патогенными микроорганизмами (приложение 2).

## II. ПРИКАЗЫВАЮ:

1. Министрам здравоохранения союзных и автономных республик, заведующим краевыми, областными отделами здравоохранения, начальникам главных управлений здравоохранения Московского, Ленинградского, Киевского и Ташкентского горисполкомов и Московского облисполкома:

- обеспечить освоение сотрудниками клиническо - диагностических лабораторий унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования и организовать, начиная с 1985 года, проведение микробиологических (бактериологических) исследований во всех клиническо - диагностических лабораториях по унифицированным методам, утвержденным настоящим приказом (согласно приложению 1).

2. Главному управлению по производству бактериальных и вирусных препаратов (тов. Хлябич Г.Н.) для обеспечения проведения микробиологических (бактериологических) исследований в соответствии с унифицированными методами принять меры по увеличению номенклатуры современных унифицированных питательных селективных сухих стандартных сред для условно - патогенных микроорганизмов; тест - систем для идентификации микроорганизмов; агглютинирующих сывороток (в соответствии с приложением 2).

3. Главному аптечному управлению Министерства здравоохранения СССР (тов. Ключев М.А.) в целях наиболее полного удовлетворения потребности клиническо - диагностических лабораторий бактериальными препаратами организовать их обеспечение в соответствии с номенклатурой, предусмотренной заявкой на бактериальные и вирусные препараты, через министерства здравоохранения союзных республик.

4. Главному управлению учебных заведений Министерства здравоохранения СССР (тов. Лакин К.М.) в течение 1986 года разработать методические рекомендации по применению унифицированных методов исследования для преподавателей кафедр микробиологии институтов усовершенствования врачей.

Контроль за выполнением настоящего приказа возложить на Главное управление лечебно - профилактической помощи (тов. Москвичев А.М.).

Разрешается размножить приказ в необходимом количестве.

Заместитель Министра

здравоохранения СССР

Ю.Ф.ИСАКОВ

Приложение N 1

к приказу Министерства

здравоохранения СССР

от 22 апреля 1985 г. N 535

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**  
**ПО ПРИМЕНЕНИЮ УНИФИЦИРОВАННЫХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ**  
**(БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ) МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ**  
**В КЛИНИКО - ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ**

Перечень унифицированных микробиологических  
методов исследования

1. Микробиологические методы исследования биологического материала
  - 1.1. Микробиологические методы исследования крови.
  - 1.2. Микробиологические методы исследования спинномозговой жидкости.
  - 1.3. Микробиологические методы исследования желчи.
  - 1.4. Микробиологические методы исследования мочи.
  - 1.5. Микробиологические методы исследования отделяемого дыхательных путей.
  - 1.6. Микробиологические методы исследования открытых инфицированных ран.
  - 1.7. Микробиологические методы исследования отделяемого глаз.
  - 1.8. Микробиологические методы исследования отделяемого ушей.
  - 1.9. Микробиологические методы исследования отделяемого женских половых органов.
  - 1.10. Микробиологические методы исследования материалов при аутопсии.
2. Микробиологические методы идентификации микроорганизмов различных родов и семейств <\*>.

-----  
<\*> - Идентификация проводится с применением бактериальных препаратов в соответствии с номенклатурой заявки - заказа на бактериальные и вирусные препараты Главного аптечного управления Министерства здравоохранения СССР.

- 2.1. Микробиологические методы идентификации микробов рода стафилококка (Staphylococcus).
- 2.2. Микробиологические методы идентификации микробов семейства стрептококковых (Streptococcaceae).
- 2.3. Микробиологические методы идентификации микробов семейства нейссериевых (Neissariaceae).
- 2.4. Микробиологические методы идентификации микробов рода гемофилус (Haemophilus).
- 2.5. Микробиологические методы идентификации микробов рода коринебактерия (Corynebacterium).
- 2.6. Микробиологические методы идентификации микробов семейства энтеробактериальных (Enterobacteriaceae).

- 2.7. Микробиологические методы идентификации микробов рода псевдомонас (*Pseudomonas*).
3. Общие методы исследования.
- 3.1. Микроскопические методы (окраска препаратов).
- 3.2. Культуральные методы (питательные среды).
- 3.3. Биохимические методы.

## 1. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

#### 1.1. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КРОВИ

Сепсис, бактериемию могут вызывать практически все микроорганизмы, относящиеся к патогенным и условно - патогенным микроорганизмам. Из последних наибольшее значение имеют: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Aerococcus viridans*, *Pseudomonas aeruginosa*; представители родов: *Klebsiella*, *Yersinia*, *Candida* и другие.

#### Взятие исследуемого материала

1. Кровь для посева следует брать, соблюдая правила асептики, для того, чтобы избежать попадания микроорганизмов из внешней среды.
2. Посев необходимо проводить во время подъема температуры, в начале появления лихорадки.
3. Кровь для посева следует брать до начала специфического антибактериального химиотерапевтического лечения или, по крайней мере, через 12-24 часа после последнего введения препарата больному (в зависимости от скорости выведения примененного препарата из организма). Следует учитывать также стадию заболевания с тем, чтобы взять кровь для посева в то время, когда предполагается бактериемия (например, при брюшном тифе в первые 10-15 дней от начала заболевания).
4. Для результативного бактериологического исследования необходимо сеять достаточные количества крови (не менее 10 мл у взрослых и 5 мл у детей) в большое количество жидких питательных сред. Это делается для того, чтобы путем разведения крови (1:10 - 1:60) преодолеть естественные бактерицидные свойства крови. Для нейтрализации антибактериальных факторов крови, включая комплемент, рекомендуется, по возможности, применять полианитол - сульфонат натрия 0,025-0,03%.
5. Для взятия крови необходимо пользоваться стерильным шприцем. Системы для одноразового пользования или шприцы, простерилизованные в централизованной стерилизационной, освобождают от упаковки только непосредственно перед употреблением. При отсутствии централизованной стерилизационной надо прокипятить 20-граммовый (для детей 10-граммовый) шприц и соответствующие иглы с мандреном для венопункции в течение 30-45 минут в отдельном стерилизаторе. По окончании стерилизации слить воду и остудить шприц, не открывая стерилизатора. Собрать шприц с помощью стерильного пинцета, насадить иглу и вытащить мандрен. Нельзя пользоваться шприцем со "стерильного стола" в перевязочной, т.к. на нем могут оказаться бактерии из воздуха. По той же причине нельзя проверять проходимость простерилизованного шприца и иглы воздухом.
6. Кровь на посев берут у постели больного или в перевязочной стерильным шприцем или системой для взятия крови одноразового пользования с соблюдением всех правил асептики и засевают тут же у постели больного. Взятие крови и ее посев осуществляют, как правило, два человека. Пока один обрабатывает кожу

больного над пунктируемой веней, пунктирует вену и берет кровь, другой - над пламенем спиртовки открывает пробки флаконов, подставляет флаконы со средой под струю крови из шприца или системы, обжигает горлышки и пробки флаконов и закрывает их.

Кожу над пунктируемой веней обрабатывают 70% спиртом, затем 5%

настойкой йода, затем снова спиртом. При наличии у больного

постоянного подключичного катетера или капельницы в вене можно

воспользоваться ими для получения крови. Некоторому количеству

крови дают свободно стечь в пробирку (эту кровь можно использовать

для биохимических анализов), затем набирают кровь в шприц для

посева. Для полноценного бактериологического анализа нужно

получить 12-20 мл крови, которую тут же засевают на набор

питательных сред. Для получения "толстой капли" одну каплю крови

из шприца или системы помещают на предметное стекло и подсушивают

ее на воздухе, фиксируют метиловым спиртом или смесью Никифорова

—

(спирт - эфир aa) и затем окрашивают спиртово - водным раствором

метиленового синего (96% этилового спирта - 10 мл, метиленового

синего - 1 г, дистиллированной воды - 100 мл) или по Романовскому

- Гимза. Врач - бактериолог должен следить за соблюдением правил

асептики на всех этапах взятия и посева крови.

Если возникает подозрение, что в какой-то момент в посев крови могли попасть микроорганизмы из внешней среды (с кожи больного, с рук персонала, из воздуха и т.п.) и нет возможности повторить посев, следует сделать специальную пометку на соответствующем флаконе, чтобы соответственно оценить результаты посева.

#### Посев исследуемого материала

Рекомендуется производить посев крови на несколько питательных сред, чтобы обеспечить возможность роста максимально большому числу возможных возбудителей. Минимально следует использовать две среды: "двойную среду" и "среду для контроля стерильности".

#### Питательные среды для первичного посева:

1. "Двойная среда", состоящая из скошенного во флаконе 150 мл 1,7%-2% питательного агара и 150 мл полужидкой среды, приготовленной на питательном бульоне с добавлением 15 г глюкозы и 0,15 г агара.

Кровь засевают в жидкую часть среды. Инкубируют в термостате при 37 град. С. Флаконы ежедневно просматривают, при этом, наклоняя флакон, смачивают поверхность скошенного агара бульоном. Это исключает необходимость высева на плотные питательные среды и, следовательно, уменьшает риск загрязнения при пересевах.

2. "Среда для контроля стерильности". Эту среду следует обогатить, добавив дрожжевой экстракт до 20 г на 1 литр (не менее 15 г) и агар до 5 г на 1 литр (не менее 4,25 г). Добавляют к среде 0,001 г резазурина - индикатора кислорода. Анаэробные условия контролируют по розовому окрашиванию среды. При покраснении более 20% столбика среды можно ее регенерировать на водяной бане в течение 20 минут при 100 град. С. Однако, эту операцию можно производить только один раз. Среда дает возможность получить рост некоторых анаэробных и полуанаэробных микроорганизмов.

3. "Среда со стаканчиком" (А.И.Сироко, 1969 г.), - для предварительного лизиса форменных элементов крови. Для приготовления этой среды во флаконы с широким горлом (диаметром 30 мм), емкостью 250 мл наливают 50 мл дистиллированной воды, содержащей 0,1% агара. В этот флакон пинцетом опускают стеклянный стаканчик или пробирку длиной 70 мм и диаметром 20-22 мм, в которой находится 12 мл концентрированной питательной среды: (состав: на 100 мл перевара Хоттингера с остаточным азотом 750-800 мг%, 2 г глюкозы, 2 г хлористого натрия, pH 7,5-7,4). Стерилизуют 30 минут при 0,5 атм.

Для получения гемокультуры в "среде со стаканчиком" в агаризованную воду помещают 3-5 мл крови. Оставляют флакон при комнатной температуре на 30-40 минут для гемолиза форменных элементов крови. Затем, наклоняя флакон, выливают содержимое стаканчика в водный раствор с кровью, флакон ставят в термостат. Посев гемолизированной крови позволяет выявить бактериемию в ряде случаев, тогда, когда на других средах роста нет. Высвобождение микроорганизмов, адсорбированных на эритроцитах или подвергшихся незавершенному фагоцитозу, а также снижение антибактериальной активности гемолизированной крови, делает эту среду особенно ценной при заболевании, для которого характерна незавершенность фагоцитарной реакции.

4. Полужидкая среда Тароцци с 0,5% глюкозы и 0,1% агара во флаконах по 300 или 150 мл. Во флаконы сеют 5 мл и 3 мл крови (соответственно количеству среды), (см. раздел 3.2.).

5. Жидкая среда Сабуро служит для выявления грибковых септических состояний.

Приготовление: на 1 литр дистиллированной воды берут 10 г пептона, 25 г хлористого натрия, 40 г глюкозы. Разливают во флаконы по 150-200 мл, стерилизуют при 0,5 атм. 20 минут (pH 5,5). В жидкую среду Сабуро засевают 3-4 мл крови.

Культивирование. Засеянные кровью среды инкубируют в течение 6 недель в термостате при 37 град. С. Просматривают ежедневно в течение первых 8 дней. При появлении видимого роста делают мазки, окрашивают их по Граму, и, в соответствии с данными бактериоскопии, делают высевы на среды для определения чувствительности к антибактериальным препаратам и проводят идентификацию выделенных бактерий. При подозрении на анаэробную флору делают параллельные высевы для культивирования в аэробных и анаэробных условиях.

При отсутствии видимого роста на 3, 5, 8 день из всех сред, кроме "двойной среды" и "среды для контроля стерильности", делают высевы на чашки Петри с 5% кровяным агаром и мазки на стеклах, которые окрашивают по Граму. Посевы на чашках инкубируют при 37 град. С в аэробных или анаэробных условиях соответственно предположительному заключению о характере флоры в мазках по Граму. Выраженные бактерии идентифицируют, определяют их свойства, чувствительность к антибактериальным препаратам, фагам и т.п.

При отсутствии роста на 9-10 день дают отрицательный ответ. Однако флаконы с засеянной средой выбрасывать не рекомендуется. Необходимо продолжать держать их в термостате в течение 4-6 недель, проверяя появление роста 2-3 раза в неделю. За это время может быть выявлен замедленный рост персистирующих бактерий, бактерий в L-форме и т.п. При этом, если флаконы закрыты ватно - марлевыми пробками, их нужно запарафинировать смесью воска (1/3) и парафина (2/3) для предотвращения высыхания среды. При отсутствии на средах видимого роста микроорганизмов в первые двое суток следует особенно строго соблюдать правила, обеспечивающие стерильность, т.к. возможность попадания посторонней флоры во время повторных пересевов возрастает с каждым последующим пересевом.

Оценка результатов

При наличии роста результаты оцениваются в зависимости от вида выделенных бактерий, скорости и массивности роста. Рост на всех используемых средах, в большинстве случаев, должен быть расценен как явная бактериемия, если нет оснований считать, что во время взятия крови произошло загрязнение бактериями внешней среды. При соблюдении всех правил асептики, выделение даже таких "непатогенных" видов как эпидермальный стафилококк или кишечная палочка следует считать проявлением bacteriemia. У целого ряда больных, для которых характерно понижение иммунореактивности организма (у онкологических, ожоговых больных, при лучевой болезни и т.п.), эти и другие так называемые "непатогенные" микроорганизмы могут быть возбудителями инфекционных процессов, в том числе и сепсиса.

При появлении роста на одной, двух или трех средах следует соотносить результаты посева с клиническими данными и с результатами предыдущих (и последующих) бактериологических исследований. Наличие в других материалах от того же больного идентичных штаммов микроорганизмов свидетельствует о том, что выделение этих микробов в посевах крови не случайно.

При отсутствии роста в аэробных условиях и наличии грамотрицательных палочек в осадке при посеве на среду Тароцци следует повторно сеять кровь в анаэробных условиях с целью выделения анаэробов, особенно неспорообразующих видов бактероидов, клостридий и др.

Рекомендуется производить повторные посева крови, которые позволяют не только подтвердить бактериологический диагноз, но и проводить контроль эффективности лечения.

## 1.2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### СПИННОМОЗГОВОЙ ЖИДКОСТИ

Спинномозговую жидкость исследуют во всех случаях предполагаемого менингита как первичного процесса, так и осложнения после черепно - мозговой травмы, нейрохирургической операции или наличия инфекционного очага в организме.

Наиболее частыми возбудителями менингита у новорожденных являются: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* (gr. B, D), *Listeria monocitogenes*. У детей раннего возраста: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*.

У лиц пожилого возраста и ослабленного контингента больных возникновение менингита может быть как результатом заражения *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, так и проявлением внутригоспитальной инфекции, вызванной *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *Salmonella*. Этиологическим фактором менингитов, развившихся после черепно - мозговой травмы или как осложнение после нейрохирургических операций, чаще всего являются *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*.

Как правило, менингит вызывается только одним микроорганизмом.

#### Взятие исследуемого материала

Для бактериологического анализа обычно используют спинномозговую жидкость, взятую при люмбальной пункции или при пункции боковых желудочков мозга.

Взятие спинномозговой жидкости проводят как можно раньше, желательно до начала антибактериального лечения.

Взятие спинномозговой жидкости производит врач. Проба

отбирается со строгим соблюдением правил асептики.

Свежевзятый ликвор из шприца без иглы над спиртовкой вносят в стерильную, желательно центрифужную пробирку в количестве 1-2 мл. Ликвор для исследования немедленно доставляют в лабораторию, где тотчас, пока спинномозговая жидкость теплая, ее подвергают анализу, т.к. некоторые микроорганизмы, например, *N. meningitidis*, при охлаждении погибают. При отсутствии такой возможности материал сохраняют при 37 град. С в течение нескольких часов. Для пересылки материала используют изотермальные ящики, грелки, термос или любую другую упаковку, где поддерживается температура около 37 град. С.

#### Микроскопия исследуемого материала

Спинномозговую жидкость центрифугируют 5 минут при 3500 об/мин и из осадка делают мазки. Если присланная жидкость мутная, мазки готовят без центрифугирования.

1. При исследовании ликвора с неопределенным возбудителем или на менингококк мазки после высушивания фиксируют на пламени и окрашивают метиленовым синим или по Граму в модификации Калины.

Окраска по Граму в модификации Калины препаратов из ликвора и культур.

#### Приготовление растворов

А. 0,5% спиртовой раствор бриллиантового зеленого:

бриллиантового зеленого 0,05 г;

спирта этилового чистого 10,0 мл.

Хранить во флаконе с резиновой пробкой.

Б. Основной реактив:

0,5% спиртовой раствор йодистого калия - 96 мл;

5% спиртовой раствор основного фуксина - 2 мл;

5% спиртовой раствор йода - 2 мл.

0,5% спиртовой раствор йодистого калия готовят при подогревании в водяной бане. После полного растворения навески йодистого калия в спирте раствор соединяют с раствором фуксина и йода. Полученную смесь хранят во флаконе из темного стекла с притертой или резиновой пробкой.

В. Раствор спирта:

спирта этилового 96% - 30 мл;

дистиллированной воды - 70 мл.

Г. Водный раствор фуксина:

основной фуксин Циля - 1 мл;

дистиллированной воды - 9 мл.

Раствор готовят ежедневно.



## Окраска мазка

На обезжиренное стекло наносят каплю воды. В ней суспендируют культуру и туда же вносят петлей каплю раствора бриллиантовой зелени. После высыхания препарат фиксируют над пламенем. Затем на препарат наливают основной реактив на 1,5-2 минуты, после чего краску сливают и стекло в наклонном положении промывают водой.

Далее препарат в наклонном положении промывают в спирте до отхождения облачков краски и немедленно отмывают водой. Затем производят докрасшивание препарата водным раствором фуксина в течение 2 минут, окончательную промывку водой и подсушивание. При микроскопировании грамотрицательные бактерии выглядят ярко - розовыми, грамположительные - зеленовато - черными или темно - фиолетовыми. Желательно для контроля на каждом стекле делать мазок культур стафилококков или кишечной палочки.

2. Для обнаружения микобактерий туберкулеза мазки готовят из фибринозной пленки или осадка после центрифугирования. Препарат из фибринозной пленки следует готовить тонким, осторожно растягивая ее слегка подогретой бактериологической петлей или растирая между двумя предметными стеклами. Мазки красят по Цилю - Нильсену.

Результаты микроскопии окрашенного мазка спинномозговой жидкости в ряде случаев позволяют установить наличие туберкулезных бацилл, менингококков или условно - патогенных бактерий, вызвавших гнойный менингит. В соответствии с этими результатами вносят коррективы в ход бактериологического исследования. Результаты микробиологического исследования сообщаются лечащему врачу как предварительные данные. Окончательный ответ при бактериоскопическом исследовании выдается только при обнаружении *Mycobacterium tuberculosis*.

## Посев исследуемого материала

Так как гнойные менингиты имеют различную этиологию, то при исследовании спинномозговой жидкости с неопределенным возбудителем необходимо производить посев ликвора на несколько питательных сред с целью выделения более широкого спектра возбудителей.

## Питательные среды для первичного посева

1. Сывороточный агар. |
2. 5% кровяной агар. |
3. "Среда для контроля стерильности". | (см. раздел 3.2.)
4. Агар с гретой кровью (шоколадный агар). |
5. Простой агар. |
6. Полужидкий агар для обогащения ликвора, приготовленного на бульоне из перевара Хоттингера или рыбного гидролизата. К 4 мл 0,1% полужидкого питательного агара (pH 7,4) добавляют 1 мл предварительно инактивированной лошадиной или бычьей сыворотки с консервантом или без него.

Культивирование. Проводят посев 2-4 капель гнойного ликвора или ресуспендированного осадка на чашку со свежеприготовленным сывороточным агаром, на чашку с кровяным агаром, простым агаром, на среду для контроля стерильности. Капли материала слегка растирают подогретым шпателем на поверхности агара. После этого одну чашку с простым агаром помещают в термостат в обычной атмосфере при 37 град. С, а 2

другие инкубируют при повышенной концентрации CO<sub>2</sub>. Для этого чашки помещают в эксикатор, в котором создается повышенное содержание CO<sub>2</sub> за счет горящей свечи. Инкубация при повышенных концентрациях CO<sub>2</sub> способствует выявлению патогенных нейссерий, пневмококков, листерий и др. При подозрении на *H. influenzae* производят посев на чашку с шоколадным агаром.

В пробирку, к оставшемуся от посева и микроскопирования осадку, добавляют 5 мл стерильного 0,1% полужидкого агара и помещают в термостат для накопления.

На второй день просматривают сделанные накануне посева спинномозговой жидкости. При появлении роста на плотных питательных средах изучают характер роста, морфологию выросших бактерий при окраске по Граму.

У бактерий, выросших на плотных питательных средах, определяют чувствительность к антибиотикам, а также проводят отсева на элективные среды для получения чистой культуры с последующей их идентификацией.

При отсутствии роста колоний на твердых средах делают высев из среды накопления на чашку с сывороточным агаром и кровяную чашку.

Твердые среды с посевами ликвора при отсутствии роста на протяжении 24 часов надо инкубировать в течение 3-6 дней. При отрицательных результатах высева повторяют через 8-10 дней.

#### Оценка результатов исследования

Спинномозговая жидкость является стерильной средой, поэтому выделение любого микроорганизма должно расцениваться как положительный результат. Редко нахождение условно - патогенных микроорганизмов и сапрофитов, которые ранее никогда не выявлялись, может вызвать сомнение и расцениваться как загрязнение или в момент взятия пробы, или при повторных посевах со среды обогащения. В таких случаях большое значение имеют клинические данные.

При вторичных менингитах, обусловленных инфекцией гнойно-воспалительных процессов различной локализации (абсцесс, флегмона, отит, синусит, язвы от пролежней, фурункулы), необходимо провести микробиологическое исследование этого очага, потому что возможна вероятность обнаружения идентичных микроорганизмов и в спинномозговой жидкости.

У детей параллельно с исследованием спинномозговой жидкости необходимо проводить исследование гемокультур, так как менингиты часто связаны с бактериемией, и она предшествует появлению микроорганизмов в спинномозговой жидкости. При хронических процессах с временным улучшением желательно провести микробиологическое исследование ликвора после окончания антибактериального лечения.

### 1.3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЖЕЛЧИ

Желчь исследуют при воспалительных заболеваниях желчного пузыря и желчных протоков (холециститы, холангиты, желчнокаменная болезнь). В норме желчь стерильна, но при инфицировании желчи в 70%-80% случаев высевают *Escherichia coli*, *Enterococcus*, несколько реже *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, а также *Salmonella* (при временном и хроническом бактерионосительстве). Из анаэробных микроорганизмов выделяют *Clostridium perfringens*, в 10%-20% случаев желчнокаменной болезни - *Peptococcaceae*. В отдельных случаях встречается смешанная аэробная и анаэробная инфекция.

#### Взятие исследуемого материала

Желчь собирают при зондировании в процедурном кабинете отдельно по порциям А, В и С в три стерильные пробирки, либо во время операции с помощью шприца в одну пробирку, соблюдая правила асептики. Полученные порции желчи доставляют в лабораторию не позднее 1-2 часов от момента взятия, следя за тем, чтобы пробирки находились в строго вертикальном положении.

#### Посев исследуемого материала

Питательные среды для первичного посева: (см. раздел 3.2.).

1. 5% кровяной агар.
2. Среда Эндо.
3. "Среда для контроля стерильности" или среда Тароцци.
4. Селенитовый бульон для накопления сальмонелл или шигелл.

Культивирование. По 0,1 мл каждой порции желчи высевает на чашку с кровяным агаром; по 0,5 мл - на чашку со средой Эндо; в соотношении 1:9 - в селенитовый бульон (среда накопления). Для обеспечения роста анаэробов посев производят на "среду для контроля стерильности" или в две пробирки со средой Тароцци, одну из пробирок прогревают на водяной бане 20 минут при 80 град. С для уничтожения аэробной флоры. Посев и исходный материал (все порции сливают в одну пробирку) помещают в термостат при 37 град. С. На второй день. Учитывают результаты первичных посевов. В случае бактериального роста на кровяном агаре подсчитывают количество колоний каждого вида, пересчитывают на 1 мл исследуемого материала и после бактроскопии окрашенных по Граму мазков проводят дальнейшую идентификацию культур и определяют чувствительность к антибиотикам.

При подозрении на рост анаэробных культур посевы инкубируют в анаэроостате, заполненном инертным газом. В случае выделения анаэробов проводят их дальнейшее изучение. При отсутствии роста на среде Тароцци наблюдение ведут 5 дней.

С целью выделения сальмонелл в последующие 3 дня делают высевы на элективные среды (висмут - сульфитный агар) как со среды накопления, так и из нативной желчи, которая в течение трех дней выдерживается в термостате.

#### Оценка результатов

Наиболее достоверным является исследование желчи, полученной во время операции. При дуоденальном зондировании возможна контаминация желчи микрофлорой ротовой полости и верхних отделов пищеварительного тракта. Так, стафилококки и стрептококки находят в дуоденальном содержимом значительно чаще, чем в желчном пузыре при оперативном вмешательстве. Поэтому следует с особой осторожностью подходить к определению этиологической роли указанных микроорганизмов при холециститах и холангитах. Необходимо проводить количественное определение каждого вида бактерий в 1 мл желчи, т.к. по степени микробного обсеменения можно судить о локализации воспалительного процесса и более объективно оценивать его динамику при повторных исследованиях. Выделение золотистого стафилококка в значительном количестве может свидетельствовать о наличии печеночного или диафрагмального абсцесса. Обнаружение в дуоденальном содержимом сапрофитных нейссерий и дрожжеподобных грибов свидетельствует о контаминации желчи микрофлорой ротовой полости.

#### 1.4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЧИ

Исследование мочи направлено на выделение возбудителя заболевания и на количественное определение степени бактериурии.

Моча здорового человека стерильна. Однако при прохождении через мочеиспускательный канал она может загрязняться вегетирующей в нем микрофлорой. В дистальном отделе уретры в норме обнаруживают следующие микроорганизмы: *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, микроорганизмы семейства и родов: *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Bacteroides* и некоторые другие виды.

Возбудителями воспалительных процессов в мочевой системе наиболее часто являются условно - патогенные бактерии *Escherichia coli*, *S. faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia*, несколько реже - *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycoplasma*. Представители рода *Salmonella* и семейства *Mycobacteriaceae* также могут быть выделены из мочи при заболеваниях мочевой системы.

#### Взятие исследуемого материала

Исследованию подлежит средняя порция свободно выпущенной мочи, взятой в количестве 3-5 мл в стерильную посуду после тщательного туалета наружных половых органов. Катетеризация мочевого пузыря для рутинного исследования не применяется, так как она может привести к инфицированию мочевых путей. К катетеризации мочевого пузыря прибегают в некоторых случаях для уточнения локализации инфекции - в мочевом пузыре или в почках. С этой целью мочевой пузырь опорожняют катетером и промывают раствором антибиотика, после чего с интервалом в 10 минут берут пробы мочи для исследования. Если инфекция локализуется в почках, микроорганизмы содержатся во всех порциях мочи. При инфекции мочевого пузыря моча остается стерильной.

В отдельных случаях делают надлобковую пункцию мочевого пузыря, при которой получают наиболее достоверные результаты.

Материал для исследования следует брать до начала антибактериальной терапии или в интервалах между курсами лечения.

Содержащиеся в моче микробы быстро размножаются при комнатной температуре, что может дать ложные результаты при определении степени бактериурии. В связи с этим от момента взятия пробы мочи до начала ее исследования в лаборатории должно проходить не более 1-2 часов при хранении при комнатной температуре и не более суток - при хранении в холодильнике.

#### Посев исследуемого материала

Питательные среды.

1. Питательный агар. |
2. 5% кровяной агар. | (см. раздел 3.2.)
3. Сахарный бульон. |

Выделение микроорганизмов из мочи (качественное исследование) не позволяет дифференцировать бактериурию, возникающую в результате загрязнения мочи нормальной микрофлорой дистального отдела уретры, от бактериурии, развивающейся при инфекционных процессах в мочевыводящей системе, возбудителями которых являются условно - патогенные микроорганизмы. С этой целью применяют количественные методы исследования, основанные на определении числа микробных клеток в 1 мл мочи (степень бактериурии).

Метод секторных посевов. Платиновой петлей, диаметром 2 мм, емкостью 0,005 мл, производят посев мочи (30-40 штрихов) на сектор А чашки Петри с простым питательным агаром. После этого петлю прожигают и производят 4 штриховых посева из сектора А в сектор I и аналогичным образом - из сектора I во II и из II в III.

Чашки инкубируют при 37 град. С 18-24 часа, после чего подсчитывают число колоний, выросших в разных секторах. Определение степени бактериурии по количеству выделенных колоний производят согласно таблице 1.

Таблица 1

A	Количество колоний в секторах			Количество бактерий в 1 мл мочи
	I	II	III	
1-6	-	-	-	менее 1000
8-20	-	-	-	3000
20-30	-	-	-	5000
30-60	-	-	-	10000
70-80	-	-	-	50000
100-150	5-10	-	-	100000
не сосч.	20-30	-	-	500000
"-	40-60	-	-	1 млн.
"-	100-140	10-20	-	5 млн.
"-	не сосч.	30-40	-	10 млн.
"-	"-	60-80	колонии един.	100 млн.

Метод секторных посевов позволяет не только определить степень бактериурии, но и выделить возбудителя заболевания в чистой культуре.

При латентном течении уроинфекции, а также после лечения антибактериальными препаратами рекомендуется производить посев по 0,1 мл цельной мочи на плотные питательные среды и в пробирку с 0,25% сахарным бульоном. Посевы инкубируют при 37 град. С 24 часа. При отсутствии роста на 5% кровяном агаре чашки выдерживают 3 суток в термостате, т.к. может наблюдаться замедленный рост стрептококков.

Подсчитывают количество колоний, выросших на плотных питательных средах, и пересчитывают обсемененность на 1 мл мочи. Из сахарного бульона делают высев на чашку с 5% кровяным агаром. Колонии, выросшие на плотных питательных средах, отсеивают в пробирки со скошенным агаром, выделенную чистую культуру идентифицируют и определяют ее чувствительность к антибактериальным препаратам.

Ускоренные методы основаны на определении продуктов метаболизма, образующихся при размножении микроорганизмов в моче. Они дают менее точные результаты, чем метод секторных посевов, и чаще используются при массовых профилактических обследованиях больших контингентов людей, для экспресс - диагностики. При положительном результате, полученном ускоренными методами, необходимы дальнейшие исследования с помощью более точного метода секторных посевов.

При использовании ускоренных методов лаборатория дает предварительный ответ через день после получения результатов определения степени бактериурии и окончательный - через 4 дня: после выделения чистой культуры микроорганизмов, их идентификации и определения чувствительности к антибактериальным препаратам.

Нитритный тест. Нитриты, являющиеся продуктами метаболизма представителей семейства *Enterobacteriaceae*, могут быть обнаружены в моче с помощью реактива Грисса. Готовят два раствора:

а) 1,25 г сульфаниловой кислоты растворяют в 500 мл 30% уксусной кислоты;

б) 2,5 г альфа - нафтиламина растворяют в 500 мл 30% уксусной кислоты.

Оба раствора хранят в защищенном от света месте.

Непосредственно перед исследованием оба раствора смешивают в равных количествах, 1 мл смеси добавляют к 1 мл мочи. Появление красного окрашивания свидетельствует о присутствии в 1 мл мочи не менее 10 микробных клеток.

Эффективность метода может быть значительно повышена добавлением в мочу нитратов с последующей инкубацией при 37 град. С в течение 2-4 часов перед постановкой нитритного теста.

ТТХ-тест. Трифенилтетразолий хлористый (ТТХ) под действием продуктов жизнедеятельности микроорганизмов переходит из бесцветного в красный нерастворимый в воде трифенилформазан. Интенсивность окраски находится в прямой зависимости от степени бактериурии.

Готовят три раствора: 1. Насыщенный раствор двузамещенного фосфорнокислого натрия; 2. 750 мг ТТХ растворяют в 100 мл раствора 1; 3. Рабочий раствор - 4 мл раствора 1 смешивают со 100 мл раствора 2. Хранят растворы в прохладном, защищенном от света месте. Срок хранения растворов 1 и 2 - до 2-х месяцев, рабочего раствора - не более 2-х недель.

При постановке реакции пользуются стерильной посудой.

К 2 мл мочи прибавляют 0,5 мл рабочего раствора и помещают после перемешивания в термостат при 37 град. С. После 4-х часовой инкубации учитывают результаты. Появление на дне пробирки красного осадка свидетельствует о наличии в 1 мл мочи не менее 10 микробных клеток.

#### Оценка результатов исследования

Основной задачей при интерпретации полученных данных является доказательство этиологической роли условно - патогенных микроорганизмов. Учитывают комплекс тестов: степень бактериурии, вид выделенных культур, повторность их выделения в процессе заболевания, присутствие в моче монокультуры или ассоциации микроорганизмов.

Степень бактериурии позволяет дифференцировать инфекционный процесс в мочевых путях от контаминации мочи нормальной микрофлорой. С этой целью используют следующие критерии:

3

1. Степень бактериурии, не превышающая 10 микробных клеток в 1 мл мочи, свидетельствует об отсутствии воспалительного процесса и обычно является результатом контаминации мочи.

4

2. Степень бактериурии, равная 10 микробных клеток в 1 мл

мочи, расценивается как сомнительный результат. Исследование следует повторить.

5

3. Степень бактериурии, равная и выше 10 микробных клеток в 1

мл мочи, указывает на наличие воспалительного процесса.

Изменение степени бактериурии в процессе заболевания может быть использовано для контроля за течением процесса и эффективностью терапии: уменьшение степени бактериурии свидетельствует о благоприятном течении заболевания и эффективности использованных лекарственных препаратов.

Следует иметь в виду, что в некоторых случаях - у больных, получающих антибактериальную терапию, при плохом оттоке мочи, при низком ее удельном весе и pH ниже 5 - может наблюдаться низкая степень бактериурии при имеющемся заболевании. Поэтому, помимо степени бактериурии, следует изучать вид выделенных из мочи микроорганизмов. Эшерихии, протей, синегнойная палочка, клебсиеллы чаще выделяются из мочи больных уроинфекцией. Дифтероиды, лактобациллы, грамположительные палочки обычно выделяются из мочи здоровых людей.

При трактовке результатов исследования следует учитывать повторность выделения одного и того же вида микроорганизмов: повторное выделение из мочи культуры одного вида, типа, варианта говорит о наличии инфекционного процесса.

Учитывается также присутствие в моче монокультуры или ассоциации микроорганизмов. Монокультура чаще выделяется при острых воспалительных процессах и коррелирует с высокой степенью бактериурии.

Ассоциации микроорганизмов чаще встречаются при хронических процессах и коррелируют с низкой степенью бактериурии.

При окончательной трактовке результатов микробиологического исследования необходимо учитывать данные клиники и другие лабораторные анализы.

В окончательном ответе, который выдается лабораторией, указывается степень бактериурии, вид выделенных культур и их чувствительность к лекарственным препаратам.

## 1.5. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ОТДЕЛЯЕМОГО

### ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

Возбудителями гнойно - воспалительных процессов дыхательных путей чаще всего являются условно - патогенные микроорганизмы следующих родов и видов: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Candida*, *Actinomyces* и др.

При направленном исследовании могут быть выделены *Mycobacterium tuberculosis* и другие микобактерии, *Mycoplasma*, *Bacteroides*.

Особенностью микробиологического исследования при инфекциях дыхательных путей является почти обязательное наличие в исследуемом материале нескольких видов микроорганизмов.

В отделяемом зева, трахеи, бронхов, носа в норме обнаруживаются следующие микроорганизмы: *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Neisseria*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Candida* и некоторые другие. При носительстве могут быть обнаружены *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*.

Мокрота, проходя через верхние дыхательные пути и полость рта, может контаминироваться вегетирующей в них микрофлорой.

## Взятие исследуемого материала

Материалом для изучения этиологии заболеваний дыхательных путей служат: отделяемое зева и носа; мокрота; содержимое бронхов, полученное при бронхоскопии или при отсасывании через трахеостому (у больных, находящихся на аппаратном дыхании); экссудаты; резецированные ткани и др. Материал собирают с соблюдением правил асептики в предварительно простерилизованные баночки или пробирки и доставляют в лабораторию. Хранение материала способствует размножению сапрофитирующей микрофлоры, развитию процессов гниения и брожения, что искажает результаты анализа. Интервал между взятием материала и его посевом не должен превышать 1-2 часа.

Мокрота. Утреннюю мокроту, выделяющуюся во время приступа кашля, собирают в стерильную банку. Перед откашливанием больной чистит зубы и полощет рот кипяченой водой с целью механического удаления остатков пищи, слущенного эпителия и микрофлоры ротовой полости.

Промывные воды бронхов. При отсутствии или скудном количестве мокроты производят смыв из бронхов физиологическим раствором, однако при этом микробиологическая ценность исследования снижается из-за разведения секрета (часто значительного) и бактерицидного действия раствора на чувствительные микроорганизмы, поэтому нередко концентрация бактерий в бронхиальном содержимом в 10-1000 раз ниже, чем в мокроте. Кроме того, трудоемкость эндоскопического взятия материала и тяжесть манипуляции для больного ограничивает проведение повторных исследований в динамике заболевания.

При бронхоскопии рекомендуется вводить не более 5 мл физиологического раствора с последующим его отсасыванием в стерильную пробирку.

Пунктат инфильтрата или абсцесса легкого. Исследование пунктата наиболее эффективно до прорыва инфильтрата или абсцесса в дренирующий бронх. При трансторакальной пункции получают материал непосредственно из очага поражения и избегают его обсеменения посторонней микрофлорой.

Глотка, ротовая полость и нос. Материал из ротовой полости берут натошак или через 2 часа после еды стерильным ватным тампоном или ложечкой со слизистой оболочки или ее пораженных участков у выходов протоков слюнных желез, поверхности языка, из язвочек. При наличии пленки последнюю снимают стерильным пинцетом.

Материал из носовой полости забирают сухим стерильным ватным тампоном, который вводят в глубь полости носа. Материал из носоглотки берут стерильным заднеглоточным ватным тампоном. Тампон осторожно вводят через носовое отверстие в носоглотку. Если при этом начинается кашель, тампон не удаляют до его окончания. Для проведения анализов на дифтерию исследуют одновременно пленки и слизь из носа и глотки. Материал из носа и глотки берут разными тампонами. При подозрении на клебсиеллы, независимо от места локализации процесса, исследуют материал из носоглотки и обеих половин носовой полости.

## Микроскопия исследуемого материала

Из мокроты или материала, взятого стерильным ватным тампоном, одновременно с посевом приготавливают мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют с иммерсионным объективом.

При обнаружении микроорганизмов отмечают их морфологические и тинкториальные свойства (кокки, палочки, отношение к окраске по Граму).

Микроскопическое исследование является важным ориентиром. При просмотре мазков из мокроты оценивают общую картину микрофлоры: наличие скоплений грамположительных кокков (*Staphylococcus*, *Micrococcus*); цепочек грамположительных кокков (*Streptococcus*); мелких lancetовидных, окруженных зоной неокрасившейся капсулы (*S. pneumoniae*); грамотрицательных кокков (*Neisseria*); грамотрицательных палочек с закругленными концами, окруженных капсулой в виде светлого ореола (*Klebsiella* и др.); грамотрицательных палочек (*E. coli*, *P. aeruginosa* и др.); мелких грамотрицательных палочек в виде скоплений (*Haemophilus*); мицелия и бластоспор гриба.



При исследовании мокроты обращают внимание на наличие гранулоцитов, которые всегда можно обнаружить при воспалительных процессах в нижних отделах дыхательного тракта. Их отсутствие и большое количество эпителиальных клеток в мокроте свидетельствует о том, что материал взят неправильно (с примесью слюны) и требуется его повторное взятие. При острой инфекции в мокроте, как правило, обнаруживают не более 1-2 типов бактерий, локализованных вблизи гранулоцитов. Микроорганизмы, попавшие из ротовой полости, чаще располагаются около эпителиальных клеток, и ими следует пренебречь.

По результатам микроскопии могут быть внесены изменения в ход микробиологического исследования.

### Посев исследуемого материала

Питательные среды.

Основная питательная среда: 5% кровяной агар (см. раздел 3.2.)

Могут быть использованы дополнительные питательные среды:

1. Среда ВНИИП: агар - агар, 2 г; гидролизат Хоттингера или казеина (1,8-2,0 г/л аминного азота), 75 мл; гидролизат бычьих сердец (1,4-1,8 г/л аминного азота), 25 мл; экстракт пекарских дрожжей, 0,5 г. К среде добавляют дефибринированную кровь лошади, барана, кролика, 5 мл.

2. Желточно-солевой агар. !

3. Агар с гретой кровью (шоколадный !

агар). ! (см. раздел 3.2.).

4. Среда Эндо. !

5. Среда Сабуро. !

### Культивирование

Мокроту выливают в чашку Петри. С помощью стерильных металлических толстых игл с утолщенными концами (типа зубного зонда) выбирают 2-3 гнойных комочка мокроты. С целью очистки комочков мокроты от наслоившихся обитателей верхних дыхательных путей и ротовой полости их трехкратно отмывают в стерильном физиологическом растворе, после чего засевают на питательные среды.

В чашки Петри посев производят стеклянным стерильным шпателем, равномерно растирая материал по поверхности питательной среды. Посевы помещают в термостат при 37 град. С.

Содержимое бронхов, полученное при бронхоскопии или при отсасывании через трахеостому, засевают как мокроту, но без предварительного отмывания гнойных комочков физиологическим раствором. При отсутствии комочков гноя и слизи производят посев материала, набирая его пастеровской пипеткой.

Материал из глотки, носа и ротовой полости засевают так же, как мокроту. При наличии соответствующего указания лечащего врача для выделения возбудителей дифтерии, оспы, гнойного менингококкового ринита необходимо производить исследование материала, руководствуясь соответствующими приказами <\*>.

-----

<\*> - Исследование на менингококковую инфекцию - Приказ МЗ СССР N 98 от 29 января 1981 г.

Исследование на дифтерию - Приказ МЗ СССР N 580 от 26 июня 1974 г.

Посев производят на среды, хранившиеся при комнатной температуре или согреты в термостате. При посеве тампоном материал втирают в среду со всей поверхности тампона на небольшом участке в 1-2 кв. см, а затем штрихами по всей поверхности питательной среды. Посевы помещают в термостат при 37 град. С.

Посевы исследуемого материала (мокрота, содержимое бронхов, отделяемое зева, носа, ротовой полости) просматривают после 18-24-часовой инкубации при 37 град. С. Учитывают количество выросших колоний, соотношение отдельных ассоциантов, описывают характер колоний. Выделяют чистые культуры микроорганизмов, проводят их идентификацию и определяют чувствительность к антибактериальным препаратам.

#### Количественный метод <\*>

-----

<\*> - Рекомендуется как дополнительный метод.

Мокрота. Берут 1 мл мокроты, добавляют 9 мл питательного

-1

бульона или 2% пептонной воды (разведение 1:9, т.е. 10 и

гомогенизируют в банке со стеклянными бусами 20 мин. Гомогенизацию

можно проводить в ступке, растирая мокроту со стерильным кварцевым

песком, добавляя питательный бульон до конечного разведения 1:9.

Из полученной эмульсии мокроты (1:9) готовят серийные разведения в

-7

бульоне (0,5 мл мокроты + 4,5 мл бульона) до 10 , каждый раз

меняя пипетки. Посев осуществляют в обратном порядке с большего

-7 -5

разведения. Засевают по 0,1 мл из разведений мокроты 10 , 10 ,

-3 -1

10 , 10 на чашку с 5% кровяным агаром и агаром с гретой кровью.

Параллельный посев из указанных разведений на кровяном агаре

помещают в эксикатор с горящей свечой. Посев на желточно - солевой

агар, среду Эндо и Сабуро делают из исходного разведения 1:9.

Инкубируют в течение суток при 37 град. С. На 2-ые сутки чашки

просматривают и подсчитывают каждый вид микроорганизма. Количество

микроорганизмов определяют в максимальном разведении мокроты, в

котором еще удалось обнаружить данный вид бактерий.

Например. На кровяном агаре выросли 3 колонии пневмококка при

-5

посеве 0,1 мл мокроты с разведения  $10^{-5}$ . Следовательно, в 1 мл

5

мокроты содержится  $3 \times 10^5$  и умноженное на  $10^5$  (степень разведения) =

6

3000000 пневмококков или  $3 \times 10^6$ . Диагностически значимым является

обнаружение пневмококка и гемофильной палочки (до

6

антибактериальной терапии) в 1 мл мокроты в концентрации  $10^5$  и

выше. Аналогичные концентрации значимы и для условно - патогенных

микроорганизмов в случае 2-3 кратного обнаружения с интервалом 3-5

дней.

Содержимое бронхов. При количественном подсчете бактерий

бронхиальные смывы, представляющие собой гомогенную взвесь,

условно принимают за разведение 1:9. Диагностически значимым

является обнаружение пневмококков и гемофильной палочки (до

4

антибактериальной терапии) в концентрации  $10^4$ . Аналогичные

концентрации значимы и для условно - патогенных микроорганизмов в

случае 2-3 кратного обнаружения с интервалом 3-5 дней.

Мазки из гортани и зева. При количественном исследовании тампоны тщательно суспендируют в 1 мл бульона и условно принимают за разведение 1:9.

Дальнейшее исследование этих материалов проводят как количественное определение мокроты.

### Оценка результатов

При воспалительных процессах дыхательных путей, когда высеваются условно - патогенные микроорганизмы, интерпретация полученных результатов представляет определенные трудности. Следует учитывать, что наличие или отсутствие в исследуемом материале микроорганизмов не может иметь решающего значения для диагноза.

Особое значение принадлежит количественной оценке роста различных видов микроорганизмов, выросших при первичном посеве на плотных питательных средах. Для ориентировочной оценки количественного роста микроорганизмов в ассоциации целесообразно пользоваться следующими критериями:

I - очень скудный рост - рост единичных колоний (до 10);

II - скудный рост - рост 10-25 колоний;

III - умеренный рост - рост множества сосчитываемых колоний (не менее 50);

IV - обильный рост - сплошной рост несосчитываемых колоний.

III и IV степени роста обычно свидетельствуют об этиологической роли данного микроорганизма, I и II степени - о носительстве или контаминации.

О возбудителе необходимо судить на основании комплекса исследований: данных микроскопии первичных мазков, результатов посева на плотные питательные среды (количественная оценка роста различных видов микроорганизмов, однородность популяции при посеве на плотные питательные среды), учета анамнеза, клинических проявлений заболевания и результатов комплексной терапии.

Количественный метод обеспечивает выделение чистых культур микроорганизмов и дает возможность судить более точно об этиологической значимости выделенных микроорганизмов.

Следует подчеркнуть достаточную информативность и высокую корреляцию качественного и количественного методов посева при правильном их выполнении.

## 1.6. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### ОТДЕЛЯЕМОГО ОТКРЫТЫХ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАН

При появлении гнойно - воспалительного процесса в ране раневое отделяемое, гной, кусочки инфицированных тканей (грануляции, мышцы и т.п.) подвергают микробиологическому исследованию.

Возбудителями гнойно - воспалительных процессов могут быть представители различных родов, подавляющее большинство которых относят к так называемой "условно - патогенной" микрофлоре (аэробной, микроаэрофильной и анаэробной). Среди них чаще встречаются виды родов: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Acetobacter*, *Haemophilus*, *Peptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Nocardia*, *Listeria*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Mycrococcus*, *Mycoplasma*. Реже - *Yersinia*, *Ervinia*, *Salmonella*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Brucella*, *Candida*, *Actinomyces*.

Микроорганизмы могут вызывать и поддерживать гнойный процесс как в монокультуре, так и в ассоциации.

### Взятие исследуемого материала

Взятие материала производит лечащий врач при соблюдении правил асептики. При взятии материала из раны стерильным ватным тампоном кожу вокруг раны предварительно обрабатывают спиртом или другим антисептиком, некротические массы, детрит и гной удаляют стерильной салфеткой. Взятие материала стерильным тампоном производят круговыми вращательными движениями от центра к периферии поверхности раны. Материал берут двумя тампонами, один из которых используют для микроскопии, а другой - для посева.

При наличии в ране дренажей для активной аспирации отделяемого, последнее отсасывают шприцем и в количестве 1-2 мл помещают в стерильную пробирку. Кусочки тканей, гной, промывную жидкость из дренажа также берут в стерильные пробирки при соблюдении всех правил асептики.

Не более чем через 1 час после взятия весь материал доставляют в микробиологическую лабораторию для немедленного посева. При невозможности доставить материал в течение этого времени, он должен храниться в холодильнике, но не более двух часов.

#### Микроскопия исследуемого материала

Материал, взятый одним из стерильных ватных тампонов, "размазывают" по стерильному предметному стеклу, окрашивают по Граму и просматривают под микроскопом. При обнаружении микроорганизмов отмечают их морфологическую характеристику (грамположительные и грамотрицательные палочки, кокки и др.) и степень обсемененности. В соответствии с результатами микроскопии могут быть внесены коррективы в ход бактериологического исследования.

#### Посев исследуемого материала

Питательные среды. |

1. 5% кровяной агар. | (см. раздел 3.2.)

2. Сахарный бульон. |

3. "Среда для контроля стерильности". |

Материал, взятый другим ватным стерильным тампоном из того же участка раны, засевают на чашку с 5% кровяным агаром, на "среду для контроля стерильности" и сахарный бульон, а твердые кусочки тканей (секвестры, кусочки кожи, мышц и пр.) засевают на "среду для контроля стерильности" и сахарный бульон.

Посев на чашку с агаром производят методом "тампон - петля": тампоном проводится "дорожка" по диаметру чашки, затем другой стороной тампона в обратном направлении засеваются еще одна "дорожка", параллельная первой. После этого материал рассевают по чашке при помощи петли штрихами, перпендикулярными к "дорожкам". Такой посев позволяет выделить микроорганизмы в виде отдельных колониеобразующих единиц даже из ассоциации микроорганизмов.

Засеянные жидкие и плотные питательные среды термостатируют при 37 град. С в течение 18-24 часов. При обнаружении роста производят отсев отдельных колоний на элективные среды с целью их идентификации. Отмечают, растут ли микроорганизмы в виде монокультуры или в ассоциации. При обнаружении ассоциации на плотной питательной среде отмечают преимущественный рост какого - либо представителя ассоциации (если это наблюдается).

При отсутствии роста в первые сутки посева оставляют в термостате, ежедневно просматривают и при визуальном обнаружении роста также производят соответствующие отсева. Ответ об отсутствии роста выдают через 5 суток термостатирования.

В ответе лаборатории указывают, какие виды микроорганизмов выделены, в каком количестве (слабый, умеренный или обильный рост на плотной питательной среде).

При выделении ассоциации микроорганизмов в ответе перечисляют все виды микроорганизмов, входящие в ассоциацию, и отмечают, имеется ли преимущественный рост какого - либо из представителей ассоциации.

#### 1.7. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## ОТДЕЛЯЕМОГО ГЛАЗ

Микробиологическое исследование проводится при заболеваниях конъюнктивы, век, слезных мешков, роговицы. Следует учитывать, что в норме только с конъюнктивы и в небольшом количестве регулярно выделяются *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, непатогенные микроорганизмы семейства *Neisseriaceae*, *Sarcina*. У отдельных лиц временно могут выделяться *Staphylococcus aureus*, микроорганизмы семейства *Streptococcaceae* (*S. pneumoniae*, *S. faecalis*, *S. viridans*), представители семейства *Enterobacteriaceae*, рода *Haemophilus*, микоплазмы.

Причиной конъюнктивитов в преобладающем количестве случаев являются стафилококки (79,2%). *Staphylococcus aureus* чаще обнаруживается при остром (43,6%), а *Staphylococcus epidermidis* - хроническом конъюнктивите (83,5%). Другими возбудителями острых гнойных и хронических конъюнктивитов являются *Neisseria gonorrhoeae*, *Moraxella lacunata*, *Branhamella catarrhalis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus faecalis*, *Haemophilus aegypticus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, микроорганизмы семейств *Enterobacteriaceae*, родов *Proteus*, *Klebsiella*, *Escherichia*. Реже встречаются *Listeria monocytogenes*, грибы рода *Candida*, *Aspergillus*.

Помимо вышеперечисленных микроорганизмов, являющихся возможными возбудителями воспалительных процессов не только глаз, но и других систем и органов человека, известны микроорганизмы, обуславливающие только конъюнктивиты. К ним относятся *Haemophilus aegypticus*, *Moraxella lacunata*, *Branchamella catarrhalis*.

### Взятие материала

Материал забирают с пораженных мест в разгар воспалительного процесса с соблюдением правил асептики. Не менее чем за 5-6 часов до исследования отменяют все медикаменты и процедуры. Взятие материала производит врач - окулист.

1. Конъюнктура. Отделяемое берут с конъюнктивы платиновой петлей, предварительно прожженной в пламени спиртовки и остуженной, или стеклянными стерильными палочками. При наличии достаточно обильного гнойного отделяемого используют стерильные ватные тампоны, которыми берут гной с внутренней поверхности нижнего века движением к внутреннему углу глазной щели. Необходимо следить, чтобы при моргании ресницы не касались тампона (придерживать веки руками).

2. Край век. Корочки гноя удаляют пинцетом. Берут материал из язвочки у основания ресниц.

3. Роговица. Материал на исследование, после обезболивания, можно взять платиновой петлей или другим подходящим инструментом. Если больной применяет контактные линзы, необходимо исследовать их внутреннюю поверхность. Взятый влажным тампоном материал наносят на поверхность предметного стекла, обезжиренного и прокаленного над пламенем горелки. Мазки высушивают, стекло маркируют, на его обратной стороне обводят границы мазка.

В кабинете врача производят посев на сыровороточный бульон и тиогликолевый бульон. Мазок и посеvy затем доставляются в лабораторию для исследования.

### Микроскопия исследуемого материала

Бактериоскопия окрашенного материала.

Присланные в лабораторию мазки фиксируют на пламени и окрашивают по методу Грама или метиленовым синим. Микроскопия окрашенных мазков позволяет предположить наличие тех или иных видов бактерий, вызвавших заболевание глаз.

Для обнаружения *Mycobacterium tuberculosis* окраску проводят по методу Циля - Нильсона.

Бактериоскопию нативного материала проводят при подозрении на кандидоз методом "раздавленной капли" (см. раздел 1.8.).

Результаты бактериоскопии могут быть сообщены врачу в виде предварительного ответа. Дальнейший ход микробиологического исследования в ряде случаев определяется видом предполагаемых возбудителей.

#### Посев исследуемого материала

Питательные среды. ↓

1. 5% кровяной агар. ↓ (см. раздел 3.2.)

2. "Среда для контроля стерильности". ↓

Первичные посевы на жидких питательных средах, присланные в лабораторию, помещают в термостат при 37 град. С.

Материал, взятый тампоном, с обильным гнойным отделяемым засевают на чашки с 5% кровяным агаром и "среду для контроля стерильности". Термостатирование проводится при 37 град. С в эксикаторе со свечой.

На второй день при появлении роста в бульоне изучают характер роста и проводят бактериологическое исследование с окраской по Граму. В зависимости от морфологии микроорганизмов делают высевы на элективные питательные среды для выделения чистых культур с последующей идентификацией и определением чувствительности. При наличии роста на 5% кровяном агаре изучают тинкториальные свойства выросших колоний; морфологию бактериоскопическим методом с окраской по Граму. Проводят качественную и количественную оценку бактериального роста (единичные колонии, умеренный, обильный рост). Производят отсев отдельных колоний на элективные среды с целью их идентификации и определения чувствительности. При отсутствии роста в первые сутки посевы оставляют в термостате, ежедневно просматривают их. При обнаружении роста производят соответствующие отсевы. Окончательный ответ об отсутствии роста выдают через трое суток.

#### Оценка результатов

При интерпретации результатов микробиологического исследования глаз необходимо учитывать контингент обследованных больных, анамнез, клинические проявления болезни.

Необходимо учитывать, что гонококки являются одной из частых причин острых гнойных конъюнктивитов у взрослых и особенно у детей. Кератоконъюнктивитам, вызванным нормальной микрофлорой конъюнктивы, носоглотки, ротовой полости часто предшествует вирусная инфекция верхних дыхательных путей, аллергические риниты, травмы, оперативные вмешательства, а также использование промывных растворов, инфицированных госпитальными штаммами.

Конъюнктивит наружных углов глаза (Кох-Уикса) часто вызывается микроорганизмами рода *Moraxella lacunata*.

Слабая воспалительная реакция может быть вызвана и непатогенными микроорганизмами рода *Corynebacterium*, но в таких случаях наблюдается более обильный рост микроорганизмов, чем при исследовании нормальной конъюнктивы.

Длительное местное применение антибиотиков приводит к выделению грибов рода *Candida* и *Aspergillus*.

### 1.8. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## ОТДЕЛЯЕМОГО УШЕЙ

При воспалительных заболеваниях наружного, среднего и внутреннего уха исследуют гнойное или серозное отделяемое. При этом следует учитывать, что в норме в наружном ухе, слуховом проходе присутствует нормальная микрофлора, представленная сапрофитными и условно - патогенными бактериями - обитателями кожи. Это *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*. В среднем и внутреннем ухе микрофлора отсутствует. При остром воспалительном процессе возбудителем может быть *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus pneumoniae*, а также *Haemophilus influenzae*, *E. coli*, *C. diphtheriae*, *Bacteroides*. При хронически протекающей инфекции чаще обнаруживают ассоциации грамотрицательных микроорганизмов рода *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, а также *Mycobacterium tuberculosis*, *Actinomyces* и плесневые грибы *Aspergillus*, *Mucor*.

### Взятие исследуемого материала

При поражении наружного уха проводят обработку кожи 70% спиртом с последующим промыванием физиологическим раствором, затем отделяемое из очага собирают на стерильный ватный тампон.

При поражениях среднего и внутреннего уха исследуют пунктаты и материал, полученный во время оперативных вмешательств, собранный в стерильную посуду.

### Микроскопия исследуемого материала

1. Бактериоскопия нативного материала. Проводят с целью обнаружения друз и элементов гриба при подозрении на микоз методом "раздавленной капли". Исследуемый материал помещают на предметное стекло в каплю физиологического раствора и покровным стеклом осторожно накрывают так, чтобы жидкость была без пузырьков воздуха. Правильно сделанная капля заполняет все пространство между покровным и предметным стеклом, но при этом жидкость не выступает за края покровного стекла. Микроскопию проводят при опущенном конденсоре сначала при малом увеличении (объектив x8), затем при большом (объектив x40).

2. Бактериоскопия нативного окрашенного материала. Во всех случаях исследования окрашивание мазков проводят по Граму.

При подозрении на туберкулез - окрашивают методом Циль - Нильсена, на актиномикоз - по Романовскому - Гимзе.

При положительных находках может быть дан ориентировочный ответ. Дальнейший ход микробиологического исследования определяется видом предполагаемого возбудителя.

### Посев исследуемого материала

Так как хронические гнойные отиты вызываются различными микроорганизмами, в первый день исследования необходимо производить посев на несколько питательных сред.

Питательные среды.

1. 5% кровяной агар. |



2. Среда Сабуро. |

3. "Среда для контроля стерильности". | (см. раздел 3.2.).

4. Шоколадный агар (при обследовании |

грудных детей). |

Культивирование. Материал тщательно втирают в поверхность плотных питательных сред. Термостатирование проводят при 37 град. С 24 часа, 5% кровяной агар инкубируют в атмосфере CO<sub>2</sub> - в эксикаторе со свечой. Посев на среду Сабуро выдерживают при 22-25 град. С не менее 5 суток.

На второй день просматривают сделанные накануне посевы.

При появлении роста на плотных питательных средах изучают выросшие колонии, проводят качественную и количественную оценку бактериального роста (единичные колонии, умеренный, обильный рост), выделяют чистую культуру предполагаемого возбудителя.

Проводят дальнейшее изучение с целью идентификации и определения чувствительности к антибиотикам.

#### Оценка результатов

При выявлении специфических возбудителей интерпретация результатов не вызывает трудностей. В других случаях, когда процесс вызывается условно - патогенными бактериями, необходимо применение количественных критериев оценки. Преобладающий в мазке нативного материала, окрашенного по Граму, вид микроба, массивность роста однотипных колоний, повторность выделения культур дают возможность сделать заключение о возможном возбудителе процесса.

Необходимо иметь в виду, что в процессе лечения антибактериальными средствами нередко происходит замена бактериальной флоры на грибковую.

### 1.9. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

#### ОТДЕЛЯЕМОГО ЖЕНСКИХ ПОЛОВЫХ ОРГАНОВ

Вызвать гнойно - воспалительные заболевания полового тракта могут как истинно - патогенные микроорганизмы (*Neisseria gonorrhoeae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallida*, *Listeria monocytogenes*), так и микроорганизмы условно - патогенной группы, роль которых в последние годы заметно возросла. Наиболее часто из патологического материала выделяют условно - патогенные микроорганизмы родов: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus* и других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, а также родов *Pseudomonas*, *Mycoplasma*, *Streptococcus* (гp. D, B), *Staphylococcus*, *Candida* и другие.

Микробиологическое обследование женской половой сферы представляет определенные трудности, так как нижние отделы полового тракта в норме содержат разнообразную микрофлору, меняющуюся в различные возрастные периоды жизни женщины.

Влагалище новорожденных заселяют молочнокислые бактерии, но постепенно они вытесняются кокковой группой (преобладает *Staphylococcus epidermidis*), которая остается характерной до наступления полового созревания.

В менопаузе вновь доминируют микроорганизмы кокковой группы.

В репродуктивном возрасте в составе микрофлоры преобладают аэробные молочнокислые бактерии (доминирует группа *Bact. Dederleini*) в ассоциации с другими сапрофитами. Встречаются следующие виды и роды: *Lactobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus epidermidis* и др.

Количество аэробов составляет около  $10^{10}$  и  $10^{10}$  микробных клеток /г вагинального секрета. Кроме того, у многих здоровых женщин во влагалище можно обнаружить следующие условно - патогенные микроорганизмы, в норме обитающие в кишечнике или в других областях тела: *Escherichia coli*, *Streptococcus* (гр. D, B), *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus vaginalis*, представители родов *Klebsiella*, *Clostridium*, *Chlamidium*, *Bacteroides*, *Candida*, *Mycoplasma*.

В процессе родов количество микроорганизмов во влагалище резко уменьшается, происходит самоочищение родовых путей. В первые 2-3 дня послеродового периода значительно нарастает число бактерий условно - патогенной группы (условия для жизнедеятельности молочнокислых бактерий отсутствуют). В лохиях обнаруживают в большом количестве эпидермальный стафилококк, эшерихии и другие энтеробактерии, микоплазмы, бактероиды, аэробные и анаэробные стрептококки. Постоянно, но не в большом количестве, эти микроорганизмы обнаруживаются и в полости матки. Однако, при гладком течении послеродового периода быстро наступает самоочищение полости матки.

Содержимое цервикального канала в норме стерильно. Лишь у наружного зева в слизисто - гнойной пробке в небольшом количестве могут быть обнаружены микроорганизмы (преимущественно молочнокислые бактерии) как результат обсеменения микрофлорой верхней трети влагалища.

Полость и придатки матки в норме стерильны.

#### Взятие исследуемого материала

Взятие материала для микробиологического исследования проводит врач акушер - гинеколог при подозрении на инфекционную природу патологического процесса.

Вульва, преддверие влагалища. Отделяемое берут стерильным ватным тампоном. При воспалении Бартолиниевых желез производят их пункцию, при вскрытии абсцесса железы гной берут стерильным ватным тампоном.

Влагалище. После введения зеркала и подъемника материал для исследования берут стерильным ватным тампоном из заднего свода или с патологически измененных участков слизистой. Материал для посева должен быть взят до проведения мануального исследования.

Шейка матки. После обнажения шейки матки в зеркалах влагалищную часть ее тщательно обрабатывают ватным тампоном, смоченным стерильным физиологическим раствором или стерильной водой. После этого тонким ватным тампоном, осторожно введенным в цервикальный канал, не касаясь стенок влагалища, берут материал для исследования.

Кроме того, для посева может быть использован соскоб слизистой, полученный при диагностическом выскабливании стенок цервикального канала.

Матка. Правильное взятие материала из матки может быть выполнено только при использовании специальных инструментов типа шприца - аспиратора, имеющего на зонде покрытие. После прохождения зондом цервикального канала в полости матки раскрывают наружную оболочку зонда и набирают в шприц содержимое матки. После этого закрывают наружную оболочку и зонд выводят из матки.

Придатки матки. При воспалительном процессе в придатках матки получение материала из очага инфекции (гной, экссудат, кусочки органов) становится возможным только при оперативном вмешательстве или при проведении диагностической пункции опухолевидных образований в малом тазу, проводимой через влагалищные своды.

В некоторых случаях острого воспалительного процесса, если очаг инфекции в придатках матки сообщается с полостью матки, полезными могут оказаться повторные исследования отделяемого цервикального канала.

При подозрении на анаэробную инфекцию посев должен быть выполнен сразу же после взятия материала путем помещения тампона в пробирку с тиогликолевым полужидким агаром.

Параллельно с взятием материала на посев врач акушер - гинеколог готовит мазки для микроскопии (в количестве не менее двух), используя для этого отдельные стерильные тампоны или стерильные гинекологические инструменты. При приготовлении мазков надо равномерно распределить материал на предметном стекле мягкими движениями, не применяя грубого втирания и резких штриховых движений инструментом. Мазок высушивают при комнатной температуре, покрывают чистым предметным стеклом или помещают в чашку Петри и отправляют в лабораторию. Хранение влажного мазка, сдавленного между двумя стеклами, недопустимо. Рекомендуемая техника выполнения мазка позволяет клеткам распределиться слоями, не повреждая их, сохраняет истинное распределение и количественное соотношение компонентов исследуемого материала, дает возможность наблюдать внутриклеточное расположение бактерий (гонококки).

Взятый для исследования материал должен быть сразу же отправлен в микробиологическую лабораторию для немедленного посева. При невозможности выполнить это требование взятый материал должен храниться в холодильнике, но не более двух часов.

#### Микроскопия исследуемого материала

В лаборатории доставленные мазки исследуемого материала окрашивают по Граму и микроскопируют с иммерсионным объективом. Отмечают проявления воспалительной реакции: наличие лейкоцитов, слизи, фибрина, при обнаружении микроорганизмов отмечают степень обсемененности, отношение к окраске по Граму и морфологические особенности. В частности, при обнаружении грамотрицательных диплококков, особенно при внутриклеточном их расположении, следует обратить внимание лечащего врача на необходимость дополнительного обследования больной на гонорею. Выявление в мазках простейших (трихомонады), мицелия или бластоспор гриба может служить основанием для выдачи ответа лечащему врачу об обнаружении этих микроорганизмов в исследуемом материале.

#### Посев исследуемого материала

Питательные среды.

1. 5% кровяной агар. |
2. Сахарный бульон. | (см. раздел 3.2.).
3. Среда Эндо. |

Исследуемый материал, взятый тампоном, засевают этим тампоном, используя штриховую технику посева, на половину чашки Петри с кровяным агаром, затем производят посев тампоном в сахарный бульон.

Доставленные в лабораторию жидкие пробы (гной, экссудат, содержимое tuboовариальных образований, околоплодные воды) засевают по 0,1 мл на плотные питательные среды, растирая материал по поверхности среды шпателем. Используют кровяной агар, среду Эндо. Кроме того, посев производят в сахарный бульон.

Кусочки тканей размельчают, соблюдая стерильность, в микроразмельчителе тканей или растирают в ступке с песком, добавляя питательный бульон или физиологический раствор. Полученную взвесь засевают на несколько чашек с плотными питательными средами, а также в сахарный бульон.

Посевы инкубируют при температуре 37 град. С, просматривая ежедневно. При появлении роста на плотных средах проводят подсчет колоний различной морфологии, учитывая их соотношение.

При помутнении бульона делают мазки на стекле (окраска по Граму) и в соответствии с результатами микроскопии производят высевы на плотные питательные среды (кровяной агар, желточно - солевой агар, среду Эндо). Затем проводят видовую идентификацию микроорганизмов и определение их чувствительности к антибактериальным препаратам.

Отрицательный результат исследования выдается при отсутствии роста на всех питательных средах в течение 72 часов.

#### Оценка результатов

Интерпретация результатов микробиологического исследования материалов, полученных при обследовании половых органов женщин, представляет определенные трудности, так как чаще всего регистрируют рост нескольких видов условно - патогенных микроорганизмов. В каждом конкретном случае следует учитывать совокупность признаков: данные микроскопии первичных мазков исследуемого материала, результаты прямого посева на плотные питательные среды (количественная оценка роста различных видов), а также клинические проявления заболевания и анамнез больной.

Так, при исследовании материала из закрытых полостей (пунктаты опухолевидных образований в малом тазу, околоплодные воды), а также органов, в норме стерильных (содержимое полости матки, кусочки органов, тканей, удаляемых при полостных операциях), рост микроорганизмов, особенно монокультуры в сочетании с находками микроорганизмов сходной морфологии в первичных мазках, с определенностью свидетельствуют об их этиологической роли в воспалительном процессе.

При исследовании материала из мест, в норме имеющих разнообразную микрофлору, основное значение принадлежит количественной оценке различных видов бактерий, выросших при первичном посеве на плотные питательные среды. Кроме того, следует учитывать клинические данные, а также однотипность результатов при повторных исследованиях. Например, повторное выделение из цервикального канала в большом количестве идентичных штаммов микроорганизмов при остром сальпингоофорите можно расценивать как обнаружение возбудителя воспалительного процесса в придатках матки.

Учитывая, что взятие патологического материала проводят нестандартными тампонами, для ориентировочной оценки количественного соотношения видов микроорганизмов в ассоциации можно использовать следующие критерии (при посеве тампоном исследуемого материала на половину чашки Петри с кровяным агаром):

I - очень скудный - рост только на жидких средах; на плотной

рост питательной среде рост отсутствует.

II - скудный рост - на плотной питательной среде рост

до 10 колоний микроорганизмов

определенного вида.

III - умеренный рост - на плотной питательной среде рост

от 10 до 100 колоний.

IV - обильный рост - на плотной питательной среде рост

более 100 колоний.

I и II степени роста чаще всего свидетельствуют о загрязнении, III и IV степени роста - об этиологической роли данного микроорганизма.

## 1.10. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### МАТЕРИАЛОВ ПРИ АУТОПСИИ

Микробиологические исследования проводят в случае летального исхода при гнойно - воспалительных заболеваниях, вызванных условно - патогенными бактериями.

В зависимости от клинического диагноза и сделанных в процессе вскрытия патологоанатомических находок материалом для микробиологического исследования служат кусочки органов и тканей, кровь, гной, экссудат и т.д. (таблица 2).

#### Взятие исследуемого материала

Основным условием для получения достоверных результатов и их правильной интерпретации является раннее, не позднее 12 часов после смерти больного, взятие материала, даже при хранении трупа при пониженной температуре. Материал для микробиологического исследования берет персонал морга (врач и его помощник) с соблюдением правил асептики.

Пробы крови получают из левого желудочка сердца шприцем или пастеровской пипеткой.

Непосредственно после взятия кровь в количестве 5-10 мл засевают во флаконы с 50-100 мл "двойной среды" и "среды для контроля стерильности". Край флаконов при посеве обжигают над пламенем спиртовой горелки.

Пункцию и биопсию проводят после обработки исследуемого участка 3% перекисью водорода и последующего удаления антисептика стерильным физиологическим раствором. С соблюдением правил асептики 2-3 кусочка органов или тканей, величиной по 0,5-1 куб. см помещают для транспортировки в стерильные чашки Петри или в пробирки.

Гной из вскрытых полостей, спинномозговую жидкость и т.д. отсасывают шприцем и в количестве 1-5 мл помещают в стерильные пробирки. Поверхностные секреты собирают на бактериологический тампон.

Материал, взятый от трупа больного с гнойно - воспалительной патологией, вызванной условно - патогенными бактериями, должен быть доставлен в лабораторию в течение 1 часа. В направлении дополнительно указывают дату и время смерти.

#### Микроскопия исследуемого материала

Из кусочков тканей, гноя и т.д. готовят мазки - отпечатки и окрашивают по Граму. При микроскопии отмечают степень обсемененности бактериями, морфологию и тинкториальные свойства микроорганизмов. В зависимости от результатов бактериоскопии, клинического диагноза и данных прижизненного микробиологического обследования вносят коррективы в ход исследования (расширяют набор питательных сред для первичного посева, учитывают вероятность выделения роящихся протеев и т.д.).

#### Посев исследуемого материала

## Питательные среды.

1. "Двойная среда". | для посева крови
2. "Среда для контроля стерильности", | (см. раздел 1.1.).

обогащенная. |

3. 5% кровяной агар (2 чашки). (см. раздел 3.2.).

Дополнительные среды:

4. Желточно - солевой агар. | (см. раздел 3.2.).
5. Среда Эндо. |
6. ЦПХ-агар. (см. раздел 2.7.).

Перед микробиологическим исследованием с кусочков органов и тканей стерильным инструментом удаляют поверхностный слой и свежими срезами делают отпечатки (площадь 2 кв. см) на плотных питательных средах.

Гной и экссудат наносят на среды пипеткой Пастера, а поверхностные секреты - бактериологическим тампоном. Внесенный материал рассеивают петлей по всей поверхности питательной среды. Для подготовки к определению количества бактерий в ткани, а также при посеве на жидкие среды кусочки предварительно измельчают.

## Оценка результатов

При микробиологическом исследовании трупного материала от больных с гнойно - воспалительной патологией следует помнить, что возбудители гнойной инфекции являются условно - патогенными бактериями, представителями нормальной микрофлоры человека, населяющей все области, соприкасающиеся с внешней средой и способной к активной инвазии в кровь, органы и ткани уже в агональный период, в первые же часы после смерти людей и без какой-либо инфекционной патологии. Поэтому, при интерпретации результатов микробиологического исследования трупного материала необходимо сопоставить полученные результаты с данными прижизненного обследования, с клинической картиной болезни, патологическими и гистологическими находками.

Таблица 2

### Трупный материал, исследуемый при основных видах гнойной патологии

Виды патологии	Материал						
	Кровь	Кусочки ткани			Содержимое гнойных полостей	Спинно-мозговая жидкость	Экссудат
		легкого	мозговых оболочек	прочих органов			
1	2	3	4	5	6	7	8
Сепсис	+	+		(+)	+		+

Пневмония		+					+
Перитонит	(+)				+		+
Раневая инфекция	(+)			+	+		+
Менингит		(+)	+			+	
Инфекция мочеполового тракта				+	+		+

(+) - исследование не обязательно.

## 2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

### СХЕМА ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ДО СЕМЕЙСТВ И РОДОВ

Аэробные и факультативно - анаэробные микроорганизмы Анаэробные микроорганизмы

-----  
-----  
-----  
-----

палочки кокки палочки кокки

Т Т Т Т

| | | |

окраска по Граму окраска по Граму спорообразование |

----- ТТ |

-- | | |

|| + - + - |

L | | | | |

| цитохром- | | | | |

| оксидаза | | | окраска окраска окраска

```

| ----- | | | по по по

+ - | | Граму Граму Граму

| | | | Т Т Т

| | | | | |

ферментация глюкозы ферментация глюкозы | | + - +

----- | | | | |

+ | | | | |

+ - + - - | | | | |

| | | | | | | | |

| | | | | | | | |

| | | | | | | | |

+++++++ +++

|Семейство||Род Род ||Семейство ||Род ||Род ||Семейство ||Род | |Род
|Семейство||Семейство|

|Vibrio- ||Pseudo- Alkali- ||Enterobac-||Haemo-||Aciue- ||Micrococ- ||Neisseria|
|Clostri-||Bacteroi-||Peptococ-|

|naceae ||monas genes ||teriacae ||philus||tobacter||caceae ||Род | |dium ||daceae
||caceae |

|Род ||Род Род || | | | |Семейство ||Branha- | | | | |

|Chromo- ||Mora- Flavobac-|| | | | |Streptococ-||mella | | | | |

|bacterium||xella terium || | | | |caceae || | | | | |

LLLLLLLL LLL

```

## 2.1. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРОБОВ

### РОДА СТАФИЛОКОККА (Staphylococcus)

В соответствии с рекомендациями "Краткого определителя бактерий Берги" 1980 г., род *Staphylococcus* относится к семейству *Micrococcaceae*, в которое входят также роды *Micrococcus* и *Planococcus*. Общими чертами представителей этого семейства являются: 1) морфология микробных клеток - все они грамположительные микроорганизмы сферической формы, делящиеся более чем в одной плоскости, 2) наличие фермента каталазы.

Согласно решению Международного подкомитета по таксономии стафилококков и микрококков (Варшава, 1975 г.) род *Staphylococcus* состоит из 3 видов: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*. Представители двух



последних видов относятся, к так называемым, коагулазоотрицательным стафилококкам, которые долгое время считались непатогенными. Сейчас эту точку зрения следует считать опровергнутой. Доказано, что *S. epidermidis* может вызывать такие заболевания как эндокардит, сепсис, конъюнктивит, инфекцию ран и мочевыводящих путей, а *S. saprophyticus* - острый уретрит и цистит.

Целью первичной идентификации является установление принадлежности выделенной культуры к семейству Micrococcaceae и роду Staphylococcus.

Для установления принадлежности культур к семейству микрококков (Micrococcaceae) используют тест на каталазу.

Отмечают способность представителей семейства микрококков, имеющих фермент каталазу, расщеплять перекись водорода, образуя воду и газообразный кислород.

В отличие от микрококков, представители родственного семейства стрептококков каталазы не имеют.

#### Установление принадлежности культуры

к роду Staphylococcus

На этом этапе исследования применяются методы, позволяющие дифференцировать стафилококки от микрококков. К их числу относятся культуральный, бактериоскопический и биохимический методы, из которых последний является главным.

#### Культуральный метод

Основным отличием стафилококков от микрококков является окраска колоний на плотной среде. Для стафилококков характерны золотистые (от палевых до ярко - золотистых) или белые колонии. У микрококков колонии окрашены, как правило, в желтый (с различными оттенками - от желто - зеленого до оранжевого) или розовый (вплоть до красного) цвета. Дополнительным тестом может служить характер роста на плотной кровяной (5% дефибринированной крови барана или кролика) среде. Подавляющее большинство штаммов *S. aureus* и некоторые штаммы *S. epidermidis* растворяют эритроциты, образуя прозрачную зону гемолиза вокруг колоний. Микрококки гемолитическими свойствами не обладают.

#### Бактериоскопический метод

В мазках, окрашенных по Граму, стафилококки располагаются по одиночке, парами или в виде скоплений (гроздей) неправильной формы. Для микрококков, помимо указанных вариантов, характерно также образование тетрад и пакетов. Размеры микробных клеток у микрококков, как правило, больше (диаметр 0,5-3,5 мкм), чем у стафилококков (диаметр 0,5-1,5 мкм).

#### Определение ферментации глюкозы в анаэробных условиях

Стафилококки являются факультативными анаэробами, микрококки - облигатными аэробами. В связи с этим стафилококки способны расти и ферментировать глюкозу в анаэробных условиях, микрококки лишены этой способности.

Принцип. При ферментации глюкозы в анаэробных условиях образуется молочная кислота, в связи с чем среда закисляется и pH ее снижается. Закисление среды выявляется по изменению окраски индикатора, добавленного в среду.

Ингредиенты. Полужидкие среды (0,3% агар), содержащие 1% глюкозы - это готовая среда с индикатором ВР или среда Хью-Лейфсона с индикатором бромтимоловым синим. Последняя среда является более чувствительной, т.к. изменение ее окраски происходит при более высоких значениях pH, поэтому она позволяет выявить ферментацию глюкозы слабо активными штаммами вида *S. saprophyticus*. В связи с этим, если какой-либо штамм дал отрицательный результат на среде ВР, его следует повторно исследовать на среде Хью-Лейфсона.

Готовую среду разливают по 5 мл в пробирки и подвергают дробной стерилизации. Непосредственно перед посевом пробирки со средой помещают на 15 минут в кипящую водяную баню для удаления кислорода, а затем быстро охлаждают в ледяной бане.

Ход исследования.

Суточную агаровую культуру исследуемого штамма с помощью бактериологической петли сеют в столбик среды уколом до дна пробирки, а затем на поверхность агара наливают 1,5 мл стерильного вазелинового масла для создания анаэробных условий. Посев инкубируют при 37 град. С в течение 5 суток, ежедневно регистрируя результаты. Реакция считается положительной, если происходит желтое окрашивание столбика среды, занимающее не менее 2/3 его высоты. Длительные сроки учета реакции представляют известные неудобства, поэтому на практике дальнейшую идентификацию стафилококков проводят, обычно не дожидаясь результатов анаэробной ферментации глюкозы. В этой связи результаты указанного теста как бы дополняют результаты других тестов, полученных на следующих этапах идентификации.

#### Видовая идентификация стафилококков

Первым этапом исследования является дифференциация штаммов *S. aureus* от представителей двух коагулазонегативных видов стафилококка. Если установлено, что штамм не относится к виду *S. aureus* проводят его идентификацию для выяснения принадлежности культуры к видам *S. epidermidis* или *S. saprophyticus*.

#### Идентификация *S. aureus*

Ориентировочные данные о принадлежности культуры к виду можно получить при изучении характера колоний, выросших после посева исходного материала на элективную среду стафилококков - молочно - желточный солевой агар (МЖСА).

#### Среда для определения лецитовителлазы (лецитиназа)

Принцип. Хлористый натрий является элективным фактором, т.к. подавляет рост большинства представителей другой микрофлоры, главным образом, грамотрицательной. Одним из компонентов яичного желтка является лецитовителлин.

Лецитовителлин является субстратом для фермента лецитовителлазы (лецитиназы), относящегося к группе липаз и продуцируемого некоторыми стафилококками. При расщеплении лецитовителлина вокруг лецитиназоположительной колонии на поверхности среды образуется радужный венчик. Добавление в среду молока путем сложных химических процессов стимулирует образование стафилококками золотистого или лимонно - желтого пигмента, относящегося к группе каротиноидов.

Ингредиенты. Основой среды является 1,8% питательный агар, содержащий 7,5 г NaCl на 100 мл среды. К 200 мл растопленного и охлажденного до 50 град. С агара добавляют молочно - желточную смесь, которую готовят следующим образом: во флаконе с 20 мл стерильного снятого молока эмульгируют (со стеклянными бусами) 2 мл яичного желтка. После добавления смеси в агар среду тщательно перемешивают и разливают примерно по 20 мл в чашки Петри. Готовая среда содержит примерно 10% молока и 1% яичного желтка.

#### Ход исследования

Для выявления лецитиназы достаточно инкубации посева в течение 18-24 часов при 37 град. С. Выявление пигмента у колоний в ряде случаев требует дополнительной инкубации в течение 18-24 часов при комнатной температуре. О наличии лецитиназы свидетельствует, как уже было отмечено, образование вокруг колонии радужного венчика. Наличие пигмента легко определяется на глаз.

Как правило, штаммы *S. aureus* обладают лецитиназой и пигментом, а культуры двух других видов лишены их. Возможны, однако, исключения: некоторые штаммы *S. aureus* не имеют пигмента или лецитиназы, а ряд штаммов *S. epidermidis* обладает лецитиназной активностью.

Окончательная идентификация *S. aureus* требует постановки еще 2 тестов. На первом этапе определяют наличие у штаммов плазмокоагулазы. Если после этого штамм идентифицировать не удастся, дополнительно определяют один из двух следующих признаков: наличие ДНК-азы (что предпочтительнее) или способность ферментировать маннит в анаэробных условиях. Схема идентификации представлена в табл. 3.

При наличии положительного результата в реакции плазмокоагуляции и хотя бы в одном из двух предварительных тестов (пигмент, лецитиназа) исследуемый штамм может быть отнесен к виду *S. aureus* (варианты 1-3). Отсутствие плазмокоагулазы и хотя бы одного из первых двух признаков дает основание считать, что штамм не принадлежит к *S. aureus* (варианты 5-7). Расхождения между результатами реакции плазмокоагуляции, с одной стороны, и двух предварительных тестов - с другой (варианты 4 и 8) требуют постановки одного из двух дополнительных тестов (ДНК-аза или ферментация маннита в анаэробных условиях). В случае совпадения результатов дополнительного теста с результатами реакции плазмокоагуляции штамм считается либо относящимся к виду *S. aureus* (при положительных результатах, варианты 4а и 4в), либо не относящимся к нему (при отрицательных результатах, варианты 8б и 8г). При расхождении результатов реакции плазмокоагуляции и дополнительного теста вопрос решается с учетом большинства положительных (принадлежность к виду *S. aureus*, варианты 8а и 8в) или отрицательных (принадлежность к другим видам, варианты 4б и 4г) результатов. Проводить идентификацию *S. aureus* лишь на основании результата одного теста не рекомендуется.

#### Реакция плазмокоагуляции

Принцип. Под действием фермента плазмокоагулазы активируется естественная система свертывания крови (плазминогенпротромбин).

Реактивы. Плазма кроличья, сухая, цитратная для реакции плазмокоагуляции, готовая.

При отсутствии сухой кроличьей, лиофилизированной плазмы готовят свежую плазму.

#### Приготовление свежей плазмы

Стерильно взятую из сердца кровь кролика в количестве 8 мл вносят в пробирку с 2 мл стерильного 5% раствора лимоннокислого натрия, смешивают и центрифугируют для осаждения форменных элементов крови в течение 10 минут при 1500 об/мин. Плазму отсасывают, разводят в 5 раз стерильным физиологическим раствором и разливают в стерильные пробирки по 0,5 мл.

#### Ход исследования

В пробирку вносят 1 петлю суточной агаровой культуры исследуемого штамма, которую суспендируют в плазме. Штатив с пробирками помещают в термостат при 37 град. С и регистрируют результаты реакции через 1, 2, 4 и 18 часов инкубации.

#### Оценка результатов

Появление на дне пробирки студнеобразного сгустка любого размера считается положительным результатом реакции. Положительным результатом следует считать наличие плазмокоагуляции в первые 4 часа инкубации. Отсутствие свертывания плазмы в течение 18 часов расценивается как отрицательный результат. В качестве контроля рекомендуется ставить реакцию с заведомо коагулирующим и некоагулирующим штаммами, а также оставлять одну пробирку с плазмой незасеянной.

#### Определение ДНК-азы

Принцип. Под действием ДНК-азы (дезоксирибонуклеазы) добавленная в плотную среду высокополимерная ДНК распадается на низкополимерные фрагменты. При этом мутная среда, содержащая высокополимерную ДНК, становится прозрачной.

Реактивы. Сухая высокополимерная ДНК; 2 моль/л раствор едкого натра (NaOH), 3 моль/л раствор соляной кислоты (HCl), стерильный 10%-ный раствор хлористого кальция (CaCl<sub>2</sub>), 50 мг, 100 мг или 200 мг высокополимерной ДНК растворяют в 3-5 мл дистиллированной воды, подщелоченной 4-5 каплями 2 моль/л NaOH. К 100 мл расплавленного 1,8% мясопептонного агара (pH 8,6) добавляют приготовленный раствор ДНК и прогревают среду 20 минут в кипящей бане. Затем в слегка охлажденный агар вносят 0,5 мл стерильного 10% раствора CaCl<sub>2</sub>, среду тщательно перемешивают и разливают тонким слоем в чашки Петри (по 10-12 мл на чашку), в зависимости от взятой дозы. Содержание ДНК в готовой среде составляет 0,5; 1,0 или 2,0 мг/мл.

#### Ход исследования

Суточную агаровую культуру исследуемого штамма засевают коротким (1-1,5 см) штрихом на поверхность подсушенного агара. На одну чашку можно посеять до 16 штаммов. После 18-24 часовой инкубации при 37 град. С поверхность агара заливают небольшим количеством (5-7 мл) 3 моль/л раствора HCl. Через 2-3 минуты кислоту сливают и регистрируют результаты.

#### Оценка результатов

Появление вокруг культуры прозрачной зоны (деполимеризация ДНК), которая в 4 и более раз превосходит по ширине зону микробного роста (ширина последней должна превышать 2-3 мм), свидетельствует о положительной реакции на ДНК-азу. Меньшая зона деполимеризации ДНК расценивается как сомнительная реакция и учету не подлежит.

## Определение ферментации маннита

в анаэробных условиях

См. определение ферментации глюкозы в анаэробных условиях. Определение проводят аналогичным путем, но в качестве субстрата используют 1% раствор маннита.

## Идентификация *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*

Те штаммы, которые после исследований, описанных в предыдущем разделе, признаны не относящимися к *S. aureus*, подвергаются дальнейшей идентификации для установления их видовой принадлежности.

Дифференциацию *S. epidermidis* от *S. saprophyticus* рекомендуется проводить в 3 тестах: определение 1) устойчивости к новобиоцину, 2) фосфатазы, 3) способности окислять маннит. Упрощенная схема идентификации указанных видов представлена в таблице 4. Для штаммов *S. epidermidis* характерны: чувствительность к новобиоцину, наличие фосфатазы, неспособность окислять маннит, для штаммов *S. saprophyticus* - противоположные свойства. Поскольку не все стафилококки по своим характеристикам укладываются в указанную схему, такие штаммы следует обозначать *Staphylococcus* spp.

## Определение устойчивости к новобиоцину <\*>

Принцип. Антибиотик новобиоцин в избранной концентрации подавляет рост штаммов *S. epidermidis*, но не влияет на рост естественно устойчивых к нему штаммов *S. saprophyticus*.

-----

<\*> - Может быть использован метод диффузии в агар с применением бумажных стандартных дисков с новобиоцином.

Ингредиенты. Из стерильного водного раствора новобиоцина (10 мг в 10 мл дистиллированной воды) берут 0,5 мл и вносят в пробирку с 3 мл стерильного физиологического раствора. Содержимое пробирки переносят во флакон с 250 мл расплавленного и охлажденного до 50 град. С 1,8% питательного агара, перемешивают и разливают среду в чашки Петри. Конечная концентрация новобиоцина в среде составляет 2 мкг/мл.

## Ход исследования

Одну каплю суточной бульонной культуры исследуемого штамма засевают с помощью петли на поверхность агара (на одну чашку можно сеять не менее 25 штаммов). Посевы инкубируют 24 часа при 37 град. С, регистрируют результаты. Рост штамма в виде крупной бляшки свидетельствует об его устойчивости к новобиоцину. Полное отсутствие роста или наличие небольшого числа отдельных мелких колоний дает основание считать штамм чувствительным к новобиоцину.

## Тест на фосфатазу

Определение фосфатазы можно проводить двумя методами, дающими совпадающие результаты, с использованием двух разных реактивов (в зависимости от наличия одного из них).

Принцип. Фермент фосфатаза отщепляет фосфатную группу от фосфорорганического соединения. Образующийся в результате продукт реакции либо уже является окрашенным, либо приобретает окраску при добавлении соответствующего реактива.

Реактивы. Динатриевая соль пара - нитрофенилфосфата (1-й метод); фенолфталеинфосфат натрия, 25% раствор аммиака (2-й метод).

## Ход исследования

1-й метод. 50 мг пара - нитрофенилфосфата (динатриевая соль) растворяют в 3 мл стерильной дистиллированной воды. Указанный раствор добавляют к 100 мл расплавленного и охлажденного 1,8% питательного агара, перемешивают и разливают в чашки Петри. Конечная концентрация реактива в среде составляет 0,05%. Суточные агаровые культуры исследуемых штаммов с помощью петли сеют на среду (не более 16 штаммов на одну чашку). Учет результатов проводят после 18-24 часовой инкубации при 37 град. С. Реакция считается положительной, если в толще среды вокруг выросшей колонии видна зона интенсивного желтого окрашивания.

2-й метод. Фенолфталеинфосфат натрия добавляют к агару в концентрации 0,01%. Посев и инкубация осуществляется также, как и в предыдущем методе. По окончании инкубации на крышку чашки Петри наливают 5-6 капель 25% раствора аммиака, выдерживают чашку в перевернутом состоянии 5-10 минут, подвергая выросшую культуру воздействию паров аммиака, после чего регистрируют результаты. О положительной реакции свидетельствует появление розового окрашивания макроколоний.

## Определение окисления маннита

Принцип. При окислении маннита в аэробных условиях, образуется уксусная кислота, которая закисляет среду, что выявляется с помощью индикатора.

Ингредиенты. Для постановки опыта рекомендуется плотная (1,8% агара) среда с индикатором ВР и среда Хью-Лейфсона, содержащие 1% маннита. Среду разливают в чашки Петри.

## Ход исследования

Суточные агаровые культуры исследуемых штаммов сеют на среду бляшками (не более 16 штаммов на одну чашку). Посевы инкубируют при 37 град. С, результаты регистрируют через 1 сутки. Появление желтого окрашивания вокруг макроколоний свидетельствует о положительной реакции.

## Фаготипирование штаммов *S. aureus* <\*>

Для внутривидового дифференцирования *S. aureus* применяется метод фаготипирования, позволяющий получить фаговую метку большинства штаммов и с большей долей вероятности решить вопрос об идентичности или различии сопоставляемых культур, что очень важно для выявления источников и путей распространения стафилококковой инфекции.

-----

<\*> - Сухие фаги Международного набора (22 фага) выпускаются предприятием по производству бактериальных препаратов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи АМН СССР. В каждую коробку вложена инструкция по применению фагов и учету результатов.

Принцип. Штаммы *S. aureus* обладают избирательной чувствительностью к литическому действию ряда стафилококковых бактериофагов, составляющих Международный набор типовых фагов. Чувствительность исследуемого штамма к одному или нескольким типовым фагам определяет фаготип штамма, т.е. его фаговую метку.

Таблица 3

Схема идентификации *S. aureus*

NN вари- анта	Наличие				Ферментация маннита в анаэробных условиях	Принадлежность штамма к виду <i>Staphylococcus aureus</i>
	пигмента	леци- тиназы	коагу- лазы	ДНК-азы		
1	2	3	4	5	6	7
1.	+	+	+			да
2.	-	+	+			да
3.	+	-	+			да
4.	-	-	+			?
4а.	-	-	+	+		да
4б.	-	-	+	-		нет
4в.	-	-	+		+	да
4г.	-	-	+		-	нет
5.	-	-	-			нет
6.	-	+	-			нет
7.	+	-	-			нет
8.	+	+	-			?
8а.	+	+	-	+		да
8б.	+	+	-	-		нет
8в.	+	+	-		+	да
8г.	+	+	-		-	нет

Таблица 4

Схема идентификации *S. epidermidis* и *S. saprophyticus*

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

#### 4. Схема идентификации стафилококков

День 1.

Посев исследуемого материала на МЖСА или кровяной агар.

День 2.

А. Учет наличия лецитиназы и пигмента (МЖСА), гемолиза (кровяной агар).

Б. Приготовление и просмотр окрашенных по Граму мазков.

В. Постановка и учет каталазной реакции.

Г. Отсев чистой культуры на косой агар.

День 3.

А. Окончательный учет наличия пигмента.

Б. Постановка теста на ферментацию глюкозы в анаэробных условиях.

В. Постановка реакции плазмокоагуляции и предварительный учет ее результатов.

Г. Отсев чистой культуры на бульон.

День 4.

А. Учет ферментации глюкозы.

Б. Окончательный учет реакции плазмокоагуляции и сопоставление ее результатов с результатами определения лецитиназы и пигмента (см. табл. 3). В зависимости от этого:

а) при вариантах 1, 2 и 3 штамм идентифицируется как *S. aureus* - проводится фаготипирование;

б) при вариантах 5, 6 и 7 штамм не относится к *S. aureus* - проводится его дальнейшая идентификация: постановка тестов на устойчивость к новобиоцину (посев бульонной культуры), окисление маннита, тест на фосфатазу (посев агаровой культуры);

в) при вариантах 4 и 8 идентификация еще невозможна; постановка тестов на ДНК-азу или ферментацию маннита в анаэробных условиях.

День 5.

А. Предварительный учет ферментации глюкозы.

Б. Учет результатов фаготипирования *S. aureus* (см. пункт А дня 3).

В. Учет результатов определения устойчивости к новобиоцину, окисление маннита, фосфатазы (см. пункт Б дня 3); штамм идентифицируется либо как *S. epidermidis*, либо как *S. saprophyticus*, либо как *S. spp.* (табл. 4).



Идентификацию можно считать окончательной при положительном результате анаэробной ферментации глюкозы.

Г. Учет результатов определения ДНК-азы (см. пункт Б дня 3); при вариантах 4а и 8а (табл. 3) ход исследований тот же, что в пункте А дня 3; при вариантах 4б и 8б ход исследований тот же, что в пункте Б дня 3.

Д. Учет анаэробной ферментации маннита (см. пункт Б дня 3).

День 6.

А. Учет ферментации глюкозы.

Б. Учет ферментации маннита.

В. Учет результатов фаготипирования *S. aureus* и результатов определения устойчивости к новобиоцину, окисления маннита, фосфатазы коагулазонегативных стафилококков (раздел Б, день 4).

День 7.

А. Окончательный учет ферментации глюкозы.

Б. Учет ферментации маннита.

День 8.

А. Окончательный учет ферментации маннита, далее ход исследований как в разделе Г дня 4. Если положительный результат ферментации маннита получен ранее, то сроки исследования сокращаются.

День 9.

Учет результатов (см. раздел В дня 5).

1. Среда Хью-Лейфсона - см. раздел 3.2.

2. Среда с индикатором ВР и одним из углеводов - см. раздел 3.2.

3. Тест на каталазу - см. раздел 3.3.

## 2.2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

### МИКРОБОВ СЕМЕЙСТВА СТРЕПТОКОККОВЫХ

(Streptococcaceae)

Согласно классификации, представленной в "Кратком определителе бактерий Берги" (М., 1980 г.) семейство Streptococcaceae объединяет 5 родов, из них три рода Streptococcus, Aerococcus, Gemella включают представителей, которые могут быть патогенными для человека.

Род Streptococcus объединяет обширную, широко распространенную в природе группу грамположительных, факультативно анаэробных микроорганизмов, облигатным признаком которых является отрицательный каталитический тест. Род Streptococcus объединяет 21 вид стрептококков, различающихся по антигенным, биохимическим свойствам патогенности в отношении человека.

Облигатно патогенным для человека видом является *S. pyogenes* (группа А). Стрептококки этого вида являются возбудителями ряда острозаразных заболеваний, поражающих преимущественно детей и лиц молодого возраста. Они являются также причиной возникновения гнойно - воспалительных процессов разной

локализации и этиологическим фактором таких хронических заболеваний, как ревматизм, диффузный гломерулонефрит.

*S. pneumoniae* (пневмококк) является возбудителем острых пневмоний, часто сопровождающихся бактериемией, менингитов у детей, острых отитов, гнойных конъюнктивитов и др.

Среди многочисленных условно - патогенных для человека видов стрептококка лидирующее место занимают *S. agalactiae* (группа B), *S. faecalis* и *S. faecium* (группа D).

Названные виды стрептококков являются одной из частых причин различных заболеваний урогенитального тракта, постхирургических гнойно - воспалительных процессов кишечника и брюшины, тяжелых пуэрперальных инфекций и инфекций новорожденных. Иногда они участвуют в этиологии и патогенезе подострого эндокардита. *S. faecalis* и *S. faecium*, по месту естественного их обитания, в кишечнике человека и кишечнике различных животных, выделены в отдельную группу "энтерококков".

Представитель рода *Aerococcus* - *A. viridans* выделяется при заболеваниях мочеполового тракта и при эндокардитах.

Представитель рода *Gemella* - вид *G. haemolysans* выделяется из секрета бронхов и слизи дыхательных путей.

#### Установление принадлежности выделенных

##### культур к роду *Streptococcus*

Первый день. Идентификация стрептококков начинается с изучения колоний в первичных посевах патологического материала на чашках с 5% кровяным агаром.

По виду гемолиза на кровяном агаре стрептококки делятся на 3 группы.

1. Гемолитические стрептококки (*S. haemolyticus*), обуславливающие лизис эритроцитов с образованием вокруг колоний прозрачной зоны (полного просветления среды), шириной от десятых долей до нескольких миллиметров. Колонии гемолитических стрептококков бывают:

а) мукоидные, диаметром 1,5-2,5 мм, правильной круглой формы, блестящие, напоминающие своим видом капельки росы. Данный вид колоний характерен для содержащих капсулу свежевыделенных штаммов *S. pyogenes* (группы A);

б) шероховатые ("matt" форма), 1,5-2,5 мм в диаметре, круглые колонии, серовато - белого цвета, с характерным, слегка приподнятым центром.

Этот вид колоний также характерен для свежевыделенных, содержащих M-протеин, штаммов;

в) гладкие ("glossi" форма), мелкие, 1-1,5 мм в диаметре, колонии сферической формы с ровным краем, с блестящей влажной поверхностью. Этот тип колоний характерен для слабо вирулентных и авирулентных штаммов *S. pyogenes*, многих штаммов *S. agalactiae* и некоторых штаммов энтерококков.

2. Зеленыящие стрептококки *S. viridans*, образующие на кровяном агаре альфа - реакцию в виде полупрозрачной, зеленоватого оттенка зоны, обусловленной превращением гемоглобина в метгемоглобин. Зеленыящие стрептококки растут в виде мелких, 1,0-1,5 мм в диаметре, колоний серовато - зеленоватого цвета, с гладкой или шероховатой поверхностью. Этот тип колоний характерен для многих стрептококков вегетирующих постоянно на слизистой полости рта (*S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. bovis*), для отдельных штаммов *S. agalactiae*, а также для *S. faecalis*, *S. faecium*, *A. viridans*. Колонии пневмококка на кровяном агаре полупрозрачные, плоские с приподнятым краем и блюдцеобразным центром, вокруг колоний зеленыящая зона гемолиза.

R-формы образуют сферические колонии с неровными краями. III тип пневмококка иногда имеет вид серовато - мутных, слизистых колоний до 2 мм в диаметре, склонных к слиянию между собой.

3. Негемолитические стрептококки (*S. anhaemolyticus*), не реагирующие с эритроцитами и в процессе своего роста не вызывающие изменений кровяного агара.

Гемолитическая активность способствует выявлению патогенных штаммов стрептококка, не являясь, однако, дифференциально - диагностическим признаком их патогенности. Штаммы негемолитических стрептококков, выделенные от человека, практического значения не имеют, т.к., за очень редким исключением, они не связаны с инфекционным процессом.

Из колоний, подозрительных в отношении стрептококка, бактериальной петлей берут небольшое количество материала, делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют.

Микроскопия препаратов на данном этапе исследования предусматривает дифференциацию стрептококков от грамотрицательных гемофильных микроорганизмов, рост которых на кровяном агаре сходен с ростом гемолитических стрептококков.

В препаратах, приготовленных из колоний с плотных питательных сред, стрептококки располагаются парами, короткими цепочками, иногда образуют скопления, напоминающие грозди стафилококков.

Морфологические свойства стрептококков, особенно в первых генерациях, характеризуются выраженным полиморфизмом. Наряду с шарообразными формами в мазках содержатся вытянутые в длину грубые кокки разной величины, даже в пределах одной цепочки. Пневмококки представляют собой ланцетовидные диплококки с заостренными наружными концами, каждая пара кокков или несколько пар заключены в капсулу, образуя цепочки.

При обнаружении стрептококков в препарате оставшийся от микроскопического исследования материал колоний снимают петлей и инокулируют в питательный бульон с сывороткой крупного рогатого скота (10%) или глюкозы (0,2%), или высевают на питательную среду для выделения гемокультур стрептококков. Оптимальная температура культивирования стрептококков - 37 град. С.

Второй день. Просматривают пробирки с посевами, сделанными накануне. Характер роста стрептококков в жидких питательных средах определяется длиной цепочек. Соответственно этому различают:

а) придонно - пристеночный рост с образованием мелкокрошковатого осадка с сохранением полной прозрачности среды. Зернистый рост характерен для видов и штаммов стрептококка, образующих длинные цепочки (*S. pyogenes*);

б) придонный рост в виде пушистого рыхлого осадка, с сохранением полной прозрачности или равномерным более или менее интенсивным помутнением надосадочного слоя бульона (*S. pneumoniae*). С уменьшением длины цепочек возрастает склонность к диффузному росту (*S. agalactiae*, отдельные штаммы вирулентных *S. pyogenes*, *S. faecalis*, *S. faecium*);

в) диффузный рост с интенсивным помутнением бульона и

образованием небольшого однородного осадка (*S. faecalis*, *S. faecium*, отдельные штаммы *S. agalactiae*, единичные штаммы *S. pyogenes*).

Из содержимого пробирок бактериальной петлей берут небольшое количество материала, делают мазок, окрашивают его по Граму и микроскопируют. После установления чистоты выделенной культуры приступают к идентификации вида стрептококка.

#### Идентификация гемолитического стрептококка

*S. pyogenes* (группы А) <\*>

Идентификацию культур гемолитического стрептококка (группы А) осуществляют на третий день исследования серологическим методом Ленсфильд, модифицированным в лаборатории стрептококковых инфекций ИЭМ АМН СССР им. Н.Ф.Гамалеи.

-----

<\*> - Метод является дополнительным к основным методам идентификации.

Принцип. Образование видимого преципитата в результате взаимодействия группоспецифического полисахарида С с соответствующими ему антителами группоспецифической антистрептококковой сыворотки.

#### Ингредиенты

1. Солянокислый экстракт, приготовленный из испытуемых штаммов стрептококка.
2. Преципитирующая диагностическая сыворотка к стрептококку группы А.
3. 1% агар очищенный в 0,85% растворе хлорида натрия.

#### Приготовление группоспецифических антигенов

а) Колонии стрептококков, подлежащие исследованию, засевают во флаконы с 50 мл питательного бульона;

б) суточную бульонную культуру стрептококков, выращенную на питательном бульоне, отмывают большими объемами 0,85% раствора хлорида натрия, применяя для этой цели центрифугирование в течение 30 минут при 3 тыс. об/минуту.

К отмытому осадку микробных тел добавляют 0,06 моль/л соляную

кислоту, приготовленную на 0,85% растворе хлорида натрия, из

11

расчета: 0,5 мл раствора на 10 микробных клеток (число микробных

клеток определяют по оптическому стандарту мутности).

Приготовленную в соляной кислоте взвесь периодически встряхивают, кипятят 15 минут (от момента закипания) в водяной бане. После кипячения охлаждают и центрифугируют для отделения экстракта от микробной массы. Доводят рН экстракта до 7,0, добавляя в него 1 моль/л раствор едкого натра.

В качестве индикатора используют 0,01 мл 0,04% раствора бромтимолового синего. Во время нейтрализации экстракт из соломенно - желтого становится оливково - зеленым. Образующийся при добавлении щелочи осадок удаляют центрифугированием. Готовые экстракты хранят в холодильнике.

#### Техника постановки реакции преципитации в агаровом геле

для идентификации стрептококков группы А

На предметное стекло или тонкие стеклянные пластины наливают 1% расплавленный агар, приготовленный на 0,85% растворе хлорида натрия так, чтобы толщина его слоя не превышала 2 мм.

В застывшем прозрачном агаре при помощи трафарета и металлической полый трубочки вырезают контуры лунок диаметром 4 мм, агар из которых отсасывают при помощи капилляра пастеровской пипетки.

Одну лунку наносят в центре и 6 лунок - по радиусам на равном расстоянии от центра. Расстояние между краями центральной лунки и периферическими лунками должно составлять 3 мм.

Центральную лунку заполняют диагностической сывороткой к стрептококку группы А, концентрированную в 2,5 раза. Для этого к содержимому ампулы (0,5 мл высушенной сыворотки) добавляют 0,2 мл дистиллированной воды и оставляют на 5 минут при комнатной температуре для полного растворения сыворотки.

В периферические лунки вносят солянокислые экстракты, приготовленные из исследуемых культур стрептококка. Одна из периферических лунок служит для постановки контроля. Ее заполняют солянокислым экстрактом, содержащим полисахарид стрептококка гр. А, который в качестве эталона прилагается в лиофилизированном виде к каждой коробке диагностической стрептококковой сыворотки группы А. После заполнения лунок стекла с агаром помещают во влажную камеру (на сетку эксикатора с водой) и оставляют при комнатной температуре. Просмотр пластин производят через 2-3 часа и окончательно - через 24 часа от момента постановки реакции. Перед учетом реакции пластины с агаром погружают на 20 минут в 10% раствор хлорида натрия для устранения неспецифической реакции с тейхоевой кислотой, которая может находиться в солянокислом экстракте исследуемого штамма стрептококка. Экстракты, содержащие полисахаридные антигены стрептококка группы А, образуют с соответствующими антителами диагностической сыворотки тонкие, молочно - белого цвета линии преципитата, расположенные между центральной и соответствующей антигену стрептококка группы А периферической лункой.

#### Идентификация стрептококков *S. agalactiae* (группа В)

Штаммы гемолитических и зеленеющих стрептококков, выделенные при пуперальных инфекциях, инфекциях новорожденных и заболеваниях урогенитального тракта дифференцируют с *S. agalactiae* группы В.

Для идентификации *S. agalactiae* используют CAMP-тест.

#### CAMP-тест

Австралийские ученые Christiae, Atkins, Munch-Petersen (1944) предложили оригинальный метод, получивший название CAMP-теста по первым буквам фамилий его авторов.

Принцип. Выращивание на кровяном агаре *S. agalactiae* совместно со стафилококком, продуцентом токсина, ведет к усилению лизиса эритроцитов и соответственно - увеличению образуемых зон гемолиза.

#### Ход исследования

На пластинку кровяного агара, толщиной не более 3 мм, через центр чашки сплошной линией наносят суточную бульонную культуру стафилококка <\*>, продуцирующего бета - токсин. Спустя несколько минут на эту же чашку высевают штаммы стрептококка, подлежащие идентификации. Суточные бульонные культуры стрептококков наносят отдельными штрихами, параллельными друг другу и перпендикулярными по отношению к линии посева стафилококка, не доходя до нее 2 мм. На одну чашку высевают не более 4 штаммов стрептококка. Посевы инкубируют при 37 град. С в течение 18-15 часов. При положительном результате реакции в месте пересечения посевов стрептококка со стафилококком гемолиз приобретает форму бабочки.

-----

<\*> - Используют штамм *S. aureus* Sg N 511.

#### Дифференциация гемолитических и зеленающих

##### стрептококков с энтерококками

Культуры гемолитических и зеленающих стрептококков, клетки которых при микроскопическом исследовании представляют собой грамположительные, полиморфные кокки, располагающиеся парами, короткими цепочками или небольшими скоплениями, необходимо дифференцировать с энтерококками.

Первый день. Суточную бульонную культуру стрептококка, для идентификации ее с энтерококками, высевают:

а) на желчно - щелочной агар (ЖЩА),

б) в молоко с 0,1% метиленового синего.

Второй и третий дни. 1. На ЖЩА - растут только энтерококки. Колонии их круглые, блестящие, с ровным краем, синеватого цвета, слегка выпуклые, появляются большей частью на третьи сутки инкубирования в термостате при 37 град. С.

2. В пробирках с молоком энтерококк редуцирует метиленовый синий, вследствие чего уже через 16-20 часов после посева и инкубации в термостате среда обесцвечивается и из голубой становится кремового цвета.

Способность микробных культур к росту на ЖЩА и редуцированию 0,1% метиленового синего в молоке указывает на принадлежность исследуемой культуры к группе энтерококков.

#### Дифференциация энтерококков внутри группы <\*>

Внутри группы энтерококки делятся по ферментативным, редуцирующим и гемолитическим свойствам на ряд видов и подвидов. Дифференциация культур энтерококка внутри группы ведется по схеме, представленной в таблице 5.

-----

<\*> - Дополнительное исследование при проведении более глубокой дифференциации.

Первый день. Бульонные культуры энтерококков для установления их видовой принадлежности высевают параллельно на 3 среды:

а) на энтерококковую дифференциально - диагностическую среду (ЭДДС) для определения гемолитической, протеолитической активности и способности редуцировать ТТХ,

б) на сахарно - дрожжевой агар для испытания резистентности исследуемой культуры к теллуриту калия,

в) в столбик с 0,2% агаром для определения подвижности энтерококков.

### Дифференциация энтерококков внутри группы

Виды и подвиды	Резистентность к теллуриту калия	Энтерококковая дифференциально-диагностическая среда			Подвижность в 0,2% агаре
		редукция ТТХ	гемолиз	протеолиз	
1	2	3	4	5	6
<i>S. faecalis</i>	+	+	-	-	-
<i>S. faecalis</i> subsp. <i>zymogenes</i>	+	+	+	+/-	-
<i>S. faecalis</i> subsp. <i>liquefaciens</i>	+	+	-	+	-
<i>S. faecium</i>	-	-	+/-	-	-
Подвижные энтерококки	+	+	+/-	-	+

Второй день. 1. Через 15-18 часов предварительно учитывают гемолитическую активность энтерококков, ввиду того, что при инкубации в термостате многие штаммы энтерококков вырабатывают кислые продукты метаболизма со снижением pH питательной среды до 3,8-4,2, разрушением гемоглобина и появлением вокруг колоний зон бурого цвета.

При учете ферментативной (гемолитической и протеолитической) активности определяется 4 возможных варианта изменения ЭДДС:

- а) гемолитически активные штаммы энтерококков образуют вокруг колоний белые зоны, соответствующие цвету молочного агара,
- б) у протеолитически активных штаммов появляются четко выраженные темно - красные или бурые зоны вокруг колоний,
- в) при наличии обоих (гемолитического и протеолитического) ферментов среда вокруг колоний просветляется, приобретая вид обычного питательного агара,
- г) штаммы энтерококков, не продуцирующие этих ферментов, среду не изменяют.

В конце первых суток инкубации учитывают на этой же среде способность исследуемых культур к редукции 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ). *S. faecalis* и его варианты (*S. faecalis* subsp. *zymogenes*, *S. faecalis* subsp. *liquefaciens*), восстанавливающие ТТХ, растут в виде вишнево - красных колоний с белыми ободками.

Вид *S. faecium* не восстанавливает ТТХ - колонии его бесцветны или окрашены в слабо - розовый цвет.

Подвижные формы энтерококков, обладая слабой редуцирующей активностью, образуют (особенно в первичном посеве материала) карликовые колонии розовых оттенков разной интенсивности.

2. На сахарно - дрожжевом агаре с теллуритом калия (0,07%) растут только штаммы вида *S. faecalis*, устойчивые к высоким концентрациям теллурита калия. В процессе роста они восстанавливают теллурит калия, образуя при этом черные колонии, окруженные узким бесцветным ободком.

3. В полужидком (0,2%) агаре, засеянном уколом, подвижные формы энтерококков вызывают диффузное помутнение всего столбика среды, тогда как неподвижные виды (*S. faecium*, *S. faecalis* и его разновидности) растут только по ходу прокола.

Таким образом, основными тестами дифференциации видов *S. faecalis*, *S. faecium* являются редукция ТТХ и устойчивость к теллуриту калия.

*S. faecalis* и его варианты: *S. faecalis zymogenes*, *S. faecalis liquefaciens* различаются по образованию гемолитического и протеолитического ферментов.

Основным диагностическим признаком подвижных энтерококков, позволяющим дифференцировать их от всех остальных видов этой группы, является подвижность.

#### Идентификация пневмококков (*S. pneumoniae*)

##### Оптохиновый тест

Чистую культуру засевают на агар, содержащий 1:50.000-1:100.000 оптохина. На следующие сутки учитывают результат. Пневмококки не растут в присутствии оптохина.

Можно использовать бумажные диски с 6 мкг оптохина, которые накладываются после посева на поверхность среды (посев лучше производить секторами). У пневмококков вокруг диска образуется зона задержки роста не менее 18 мм.

##### Тест с желчью

Основан на способности 10% желчи и 2% раствора оксихолатов лизировать пневмококк. В две пробирки с 2-3 мл сыровоточного бульона с 10% желчи крупного рогатого скота и без нее добавляют 0,5-1 мл испытуемой бульонной культуры и выдерживают 1 час при 37 град. С. При лизисе пневмококка отмечается просветление бульона по сравнению с контролем. При сомнительном результате пробирки оставляют при комнатной температуре до следующего дня и проводят окончательный учет результатов.

Можно использовать диски, пропитанные 20% раствором желчи. Диски накладывают на выросшую культуру и чашки инкубируют в термостате 1-2 часа. По окружности диска на расстоянии 1-2 мм пневмококки лизируются, а стрептококки остаются без изменения.

##### Серологические тесты

Основаны на реакции полисахаридных антигенов капсулы с соответствующими антисыворотками. Используют реакции Нейфельда и агглютинации на стекле.

Реакция Нейфельда ("набухания капсулы") основана на увеличении капсулы пневмококков в присутствии иммунной сыворотки. На мазок с чистой культурой наслаивают диагностическую поливалентную сыворотку, добавляют по 1 капле раствора метиленового синего и накрывают покровным стеклом; выдерживают при 37 град. С от 10 минут до 1 часа (в зависимости от активности сыворотки). Затем микроскопируют, сравнивая с контрольным мазком, где вместо сыворотки использовали физиологический раствор.

Реакцию агглютинации ставят на стекле с диагностическими сыворотками, оценивая интенсивность реакции в баллах (крестах).

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



## Биопроба <\*>

Используется для выделения пневмококков из материала и изучения вирулентности чистой культуры. Гомогенизированный 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 1 мышь. Производят посев крови из сердца на кровяной агар, можно также исследовать печень, селезенку.

-----

<\*> - Рекомендуется как дополнительный тест.

Вирулентность изучают, заражая белых мышей путем введения

внутрибрюшинно по 0,5 мл различных разведений чистой культуры

-8 -1

пневмококка (начиная с 10 до 10<sup>-8</sup>). Заражают по 4 мыши на каждое

разведение. Через 5-7 дней определяют LD 50, по величине которой

судят о вирулентности выделенной культуры.

## Питательные среды

1. Кровяной агар для постановки CAMP-теста. К 2% питательному агару, pH 7,4-7,6, добавляют 0,2% глюкозы и эритроциты барана или крупного рогатого скота. Эритроциты из цитратной крови трижды промывают изотоническим раствором хлорида натрия с целью удаления антигемолизина, который может содержаться в сыворотке, затем ресуспендируют их в том же растворе до первоначального объема крови. К агару добавляют 5% взвеси эритроцитов.

2. Желчно - щелочной агар (ЖЩА). Сухой питательный агар - 35,0 г; дрожжевой автолизат - 20,0 мл; глюкоза - 10,0 г; дистиллированная вода - 600 мл. Агар расплавляют, профильтровывают, добавляют свежей бычьей желчи - 400,0 мл и карбонат натрия - 5,0 г.

Стерилизуют готовую среду автоклавированием при 112 град. С в течение 15 минут. Перед разливкой в чашки к среде прибавляют 50,0 мл свежей крови (барана, кролика или человека), 12,5 мл 0,01% раствора кристаллического фиолетового и 20 мл раствора гидроксида калия (KOH).

3. Молоко с метиленовым синим. Свежее молоко доводят до кипения, оставляют на сутки, освобождают от сливок, вторично кипятят, снова оставляют на сутки и вторично снимают верхний слой. Обезжиренное таким образом молоко фильтруют через толстый слой ваты, подщелачивают 10% раствором карбоната натрия до pH 7,2. К 100 мл молока прибавляют 2,0 мл 1% водного раствора метиленового синего. Приготовленную таким образом среду разливают по 5,0 мл в стерильные пробирки, стерилизуют текущим паром 3 дня по 30 минут.

4. Энтерококковая дифференциально - диагностическая среда (ЭДДС). Сухой питательный агар - 35 г, автолизат дрожжевой для приготовления питательных сред - 20 мл, глюкоза - 10 г, дистиллированная вода - 800 мл. Расплавляют при нагревании, профильтровывают, стерилизуют при 112 град. С в автоклаве 15 минут, pH 7,2-7,4.

Перед разливкой в чашки в питательную среду добавляют ТТХ - 0,1 г; водного раствора кристаллического фиолетового 0,01% - 12,5 мл; налидиксовой кислоты - 0,1 г; стерильного обезжиренного молока, подогретого до 44-45 град. С - 200 мл; свежей дефибринированной крови (животных или человека) - 50 мл. Содержимое тщательно размешивают и разливают по чашкам по 7 мл.

5. Сахарно - дрожжевой питательный агар с теллуридом калия. Сухой питательный агар - 35 г, дрожжевой автолизат - 20 мл, глюкоза - 10 г, дистиллированная вода - 1000 мл. Приготовленную смесь расплавляют при нагревании, добавляют лимоннокислого натрия - 5,0 г.

Стерилизуют среду при 112 град. С в течение 15 минут, pH 7,2-7,4. Перед разливкой среды в стерильные чашки добавляют 50 мл лошадиной сыворотки, 0,1 г налединовой кислоты и 0,7 г (35 мл 2% водного раствора) теллурида калия, тщательно размешивают.

6. Питательный бульон с глюкозой. К 100 мл питательного бульона, pH 7,2-7,4, прибавляют 0,2 г глюкозы.

Приготовленную среду стерилизуют дробно 3 дня подряд по 20 минут или однократно 15 минут при 0,5 атм. в автоклаве.

7. 5% кровяной агар. К 100 мл 2% питательного агара, расплавленного и остуженного до 45 град. С, pH 7,4-7,6, соблюдая правила асептики, добавляют 5 мл дефибрированной бараньей, лошадиной или кроличьей крови. Смесь тщательно перемешивают, разливают в чашки слоем 3-4 мм.

8. Сывороточный питательный бульон. (см. раздел 3.2.).

### 2.3. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

#### МИКРОБОВ СЕМЕЙСТВА НЕЙССЕРИЕВЫХ (Neisseriaceae)

Семейство нейссериевых (Neisseriaceae) объединяет группу аэробных парных кокков и парных палочек, грамотрицательных, неподвижных, не образующих спор.

Семейство включает 4 рода: *Neisseria*, *Branhamella*, *Moraxella*, *Acinetobacter*.

В род нейссерия (*Neisseria*) согласно Берги (1980) включено 6 видов, которые выделяются от человека: патогенные виды - *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, и так называемые, непатогенные нейссерии - *N. mucosa*, *N. siccae*, *N. subflava*, *N. flavescens*.

*N. meningitidis* - является возбудителем эпидемического цереброспинального менингита, менингококкцемии, менингоэнцефалита и назофарингита. Значительно реже менингококк является причиной пневмоний, эндокардитов, полиартрита и иридоциклитов. *N. gonorrhoeae* - возбудитель венерического заболевания гонореи. Гонококки могут быть причиной артритов, эндокардитов, конъюнктивитов, тонзиллитов.

Так называемые непатогенные нейссерии являются комменсалами. У ослабленных больных признана их роль в развитии менингитов, эндокардитов, сепсиса, пневмоний, отитов и синуситов, бронхиальной астмы. Не доказано их значение как возбудителей уретритов, цервицитов и инфекций верхних дыхательных путей.

В род бранхамелла (*Branhamella*) пока включен один вид *B. catarrhalis*. Он обнаруживается на слизистых верхних дыхательных путей и мочеполового тракта. Описаны случаи выделения *B. catarrhalis* при менингитах, острых фарингитах, бронхитах.

Род моракселла (*Moraxella*) состоит из 7 видов, встречающихся у человека. Иногда моракселлы могут быть причиной воспалительных заболеваний человека - конъюнктивитов (*M. lacunata*), вульвовагинитов, менингитов (*M. nonliquefaciens*, *M. osloensis* и др.).

Род ацинетобактер (*Acinetobacter*) представлен 2 видами *A. calcoaceticus* и *A. lwoffii*. Описаны случаи их выделения при менингитах, бронхоэктатической болезни, конъюнктивитах и при хронических отитах.

Патогенные виды нейссерий не стойки в окружающей среде, очень требовательны к условиям культивирования, растут на питательных средах с добавлением нативного белка (5% крови, 10%-20% сыворотки). Культивирование проводят при повышенной влажности среды в атмосфере, содержащей 5%-10% CO<sub>2</sub>. Посев лучше производить на свежеприготовленных средах, после предварительного подогрева сред в термостате. При подозрении у больного менингококковой инфекции следует руководствоваться методическими указаниями согласно приказа МЗ СССР N 98 от 29 января 1981 года. При подозрении на гонорею следует руководствоваться "Методическим письмом по культуральной диагностике гонореи" МЗ СССР от 28 марта 1969 года N 10-83/14-34 и "Методическими рекомендациями по приготовлению

безасцитных питательных сред для культуральной диагностики гонореи" МЗ СССР от 15 июня 1973 года N 10-83/9-95.

#### Ход микробиологического исследования

Первый день. В зависимости от локализации воспалительного процесса исследуют спинномозговую жидкость, мокроту, отделяемое конъюнктивы, среднего уха, уретры и т.д.

#### Бактериоскопический метод

Мазки из исследуемого материала окрашивают по Граму. Обнаружение в мазках грамотрицательных диплококков, расположенных внутри лейкоцитов, позволяет заподозрить патогенные виды нейссерий (менингококк или гонококк). Наличие в мазках из патологического материала грамотрицательных кокков или мелких овоидных палочек, расположенных парами или короткими цепочками, характерно для других представителей семейства нейссериевых.

#### Культуральный метод

Патологический материал засевают на 5% кровяной и 10% сывороточный агар, pH 7,2-7,4.

Все посевы выращивают при 37 град. С в атмосфере, содержащей приблизительно 10% CO<sub>2</sub> (в эксикаторе с зажженной свечой).

Второй день. Через 24 часа просматривают засеянные чашки. Менингококки на кровяных средах растут в виде непрозрачных, беловато - серых, крупных колоний, с блестящей поверхностью и ровными краями, маслянистой консистенции. Менингококки не лизируют эритроциты.

На свежеприготовленном сывороточном агаре менингококки имеют вид бесцветных, опалесцирующих, плоских, круглых колоний с ровным краем, не имеющих валика и уплотнения в центре.

Непатогенные нейссерии растут на поверхности кровяного агара в виде круглых гладких колоний с ровными краями, блестящей поверхностью или шероховатых колоний неправильной формы с неровными краями с причудливо изрезанной поверхностью, некоторые имеют желтый пигмент.

Различные виды *Moraxella* хорошо растут на кровяных и сывороточных средах в виде крупных полупрозрачных, круглых, влажных, иногда слизистых колоний с небольшой зоной гемолиза или без него.

Микробы рода *Acinetobacter* (*A. calcoaceticus*, *A. lwoffii*) хорошо растут как на кровяных, сывороточных средах, так и на питательных средах без добавок нативного белка, в виде крупных, белых, круглых, блестящих колоний, часто слизистых. Можно наблюдать небольшую зону гемолиза вокруг колоний (непостоянно).

В мазках из гладких колоний микробы рода нейссерий имеют вид грамотрицательных бобовидных, округлых кокков, расположенных парами и довольно равномерно распределяющихся в поле зрения; в мазках из шероховатых колоний - грамотрицательные кокки располагаются в виде скоплений; клетки микробной популяции имеют однородное окрашивание у нейссерий, полиморфно окрашены у менингококков; у гонококков, вследствие лизиса части клеток, всегда имеются более светлоокрашенные особи.

Моракселлы и ацинетобактер при окраске по Граму имеют форму коротких или округлых палочек, часто напоминают кокки, но могут встречаться самые разнообразные формы клеток, даже нитевидные.

Следующим этапом в изучении колоний является определение их каталазной и оксидазной активности.

#### Тест на каталазу

Все микробы семейства нейссериевых обладают ферментом каталазой, способным расщеплять 10% раствор перекиси водорода с образованием пузырьков газа.

#### Тест на цитохромоксидазу

Принцип. (См. раздел 3.3.).

#### Реактивы

Свежеприготовленный 1% водный раствор диметил - парафенилендиамина гидрохлорида.

Ход исследования. На 18-20 часовую культуру на чашке наливают реактив и, наклонив чашку, дают ему стечь. Через 20-30 секунд колонии микробов, обладающие цитохромоксидазой, приобретают пурпурную окраску. Можно снять колонию с чашки и растереть ее в капле реактива на стекле или на бумажке, пропитанной реактивом. В этом случае окрашиваться в красный цвет будет капля или бумажка.

Снимать колонию для этой реакции нужно только платиновой петлей (другой металл катализирует реакцию) или запаянным концом пастеровской пипетки. Можно использовать готовые системы индикаторные бумажные - СИБ (см. раздел 3.3.). Такой диск помещают на сектор с посевом или исследуемую культуру наносят пипеткой на увлажненный диск.

Оксидазой обладают все микробы семейства нейссериевых, за исключением рода *Acinetobacter*.

Таким образом, на второй день по результатам морфологического изучения колоний, микроскопии мазков, данных каталазной и оксидазной активности можно дать ответ о предполагаемом роде микроба семейства нейссериевых - для микробов родов нейссерия и бранхамелла характерны граммотрицательные диплококки, положительная реакция на каталазу и оксидазу; для микробов рода моракселла - граммотрицательные овоидные палочки, положительная реакция на каталазу и оксидазу; для микробов рода ацинетобактер - граммотрицательные овоидные палочки, реакция на каталазу - положительная, на оксидазу - отрицательная.

Колонии, подозрительные для представителей родов семейства нейссериевых, отсевают секторами на чашку Петри или на косяки с сывороточным агаром для получения чистой культуры, требующей видовой идентификации и определения ее чувствительности к антибиотикам. Если при первичном посеве выросла чистая культура, выделенная из спинномозговой жидкости, крови, слизистой конъюнктивы, пунктатов органов, то эта культура может считаться возбудителем патологического процесса и требует идентификации ее до вида.

Третий день. Для проверки чистоты культур, выделенных с сывороточного агара, проводят бактериоскопию мазков, окрашенных по Граму. Повторно уточняют каталазную и оксидазную активность чистых культур. Для определения видовой принадлежности чистых выделенных культур проводят их изучение по биохимическим свойствам. Определяют чувствительность к антибиотикам. При необходимости определить вид возбудителя микробов из семейства нейссериевых лучше сеять взвесь культур, смытых инактивированной лошадиной сывороткой, уколом на столбики полужидкой среды Хью-Лейфсона, содержащей глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу и фруктозу; на среды для определения редукции нитратов и нитритов; на питательный агар с 5% сахарозы для определения полисахаридообразования; на агар на гидролизате казеина для учета йодной реакции и чашки с 5% желчным агаром с добавлением 20% сыворотки. Чистая культура, подозрительная на менингококки, подвергается серогруппированию с помощью агглютинации на стекле или преципитации в геле

с поливалентной (А, С, Х, Y, Z) и групповыми менингококковыми сыворотками (А, В, С, D, Х, Y, Z, 29 Е, 135 W).

Культуры, подозрительные на марокселлы и ацинетобактер, следует посеять дополнительно на среды с цитратом, мочевиной и провести определение желатиназы.

Четвертый день. Просматривают посевы, сделанные в предыдущий день. Учитывают рост на желчном агаре, сахаролитическую активность, ставят реакцию с водным раствором Люголя на продукцию полисахарида, а также учитывают данные утилизации цитрата, гидролиза мочевины и наличие желатиназы. В этот день выдают окончательный ответ с указанием вида микроорганизма.

Видовые особенности нейссерий и других представителей семейства нейссериевых представлены в таблицах 6, 7, 8.

Таблица 6

Культуральные и биохимические свойства  
видов рода Neisseria и рода Branhamella

Вид	Ката-лаза	Окси-даза	Пиг-мент	Глю-коза	Маль-тоза	Фрук-тоза	Саха-роза	Лак-тоза	Редукция	
									нитратов	нитр
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
N. gonorrhoeae	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
N. meningitidis	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+/-
N. subflava	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
N. flava	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
N. perflava	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
N. sicca	+	+	+/-	+	+	+	+	-	-	+
N. mucosa	+	+	+/-	+	+	+	+	-	+	+
N. flavescens	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
B. catarrhalis	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+

Таблица 7

Культуральные и биохимические свойства  
видов рода Moraxella, встречающихся у человека

Вид	Окси-даза	Ката-лаза	Уре-аза	Цит-рат	Фенилала-ниндеза-миназа	Жела-тиназа	Редукция		Рост на 5% желчи	Гем-лиз
							нитра-тов	нитри-тов		

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>M. lacunata</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>M. nonliquefaciens</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>M. phenylpyruvica</i>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>M. osloensis</i>	+	+	-	-	-	-	+/-	-	-	-
<i>M. atlantae</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	...
<i>M. kingae</i>	+	-	-	-	-	-	-	N2	-	бета
<i>M. uretralis</i>	+	+	-	+/-	-	-	-	N2	-	...

Все виды моракселл углеводы не утилизируют, за исключением *M. kingae*.

... - нет данных,

N2 - восстановление до газа.

Таблица 8

#### Биохимические свойства видов *Acinetobacter*

Вид	Оксидаза	Каталаза	Глюкоза	Лактоза	10% лактоза
1	2	3	4	5	6
<i>A. calcoaceticus</i>	-	+	+	+	+
<i>A. lwoffii</i>	-	+	-	-	-

#### Питательные среды

1. Сывороточный агар (см. раздел 3.2.).
2. Кровяной агар (см. раздел 3.2.).
3. Среда Христенсена с мочевиной (см. раздел 2.6.).
4. Среда Симмонса (см. раздел 2.6.).
5. Среда для определения фенилаланиндезаминазы (см. раздел 2.6.).
6. Желчный агар, 0,5%.

Принцип: ингибция желчью роста патогенных видов нейссерий (менингококков, гонококков).

#### Приготовление среды

В необходимое количество расплавленного и охлажденного питательного агара добавляют 5% фильтрованной через стерильную вату желчи, перемешивают, разливают по флаконам и стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 минут или автоклавируют при 0,5 атм. (110 град. С) в течение 30 минут.

Перед разливом в чашки Петри в каждый флакон с расплавленным и охлажденным до температуры 50 град. С желчным агаром добавляют 20% инаktivированной в течение 30 минут лошадиной сыворотки.

#### 7. Среда для определения продукции

полисахаридов на агаре с 5% сахарозы

Принцип: способность отдельных видов нейссерий образовывать крахмалоподобные вещества при расщеплении сахарозы.

Ингредиенты:

питательный агар,

сахароза,

сыворотка,

раствор Люголя.

Для приготовления раствора Люголя берут калия йодистого - 2 г, дистиллированной воды - 10 мл, йода кристаллического - 1 г. Смесь хорошо закупоривают, оставляют на сутки. Затем добавляют дистиллированной воды 300 мл.

Приготовление среды. К расплавленному и охлажденному до 50 град. С питательному агару с 5% сахарозы добавляют 20% сыворотки и разливают в чашки Петри.

Ход исследования. Производят густой высев культуры петлей, по секторам. На одну чашку можно посеять несколько штаммов. Через 48 часов инкубации в термостате на поверхность выросшей культуры наносят 1 каплю водного раствора Люголя. Реакция считается положительной при образовании бурого окрашивания выросшей культуры.

#### 8. Среда для постановки йодного теста у N. sicca

Принцип: способность N. sicca на средах с казеиновым гидролизатом образовывать крахмалоподобное вещество.

Ингредиенты:

0,25% водный раствор йода,

натрий хлористый (NaCl).

Приготовление. Питательный агар готовят на бульоне из казеинового гидролизата (аминный азот 1,6 г/л) с добавлением 1,5-2% агара, 0,5% NaCl, pH 7,2-7,4, стерилизуют при 1 атм. 15 мин.

Ход исследования. Реакцию на йод определяют на культуре, выращенной бляшками на указанном выше агаре. На культуру пастеровской пипеткой наносят 1 каплю 0,25% раствора йода в дистиллированной воде. Положительная реакция характерна только для вида *N. sicca*, она проявляется появлением синего окрашивания бактериальной массы.

#### 9. Полужидкая среда Хью-Лейфсона

с индикатором Андрее

Принцип (см. раздел 3.2.).

Ингредиенты:

пептон - 0,2 г,

натрий хлористый - 0,5 г,

калий фосфорнокислый, двузамещенный - 0,03 г,

углевод (лактоза, глюкоза, сахароза, мальтоза, фруктоза) - 1 г,

агар - 0,3 г,

индикатор Андрее - 2 мл,

вода дистиллированная - 100 мл.

Для приготовления индикатора Андрее берут 1 г кислого фуксина, растирают в ступке с 64,0 мл 1 моль/л едкого натра и добавляют 400 мл дистиллированной воды. Раствор на сутки ставят в термостат при 37 град. С, двое суток выдерживают на свету и затем сохраняют в темном месте. Индикатор должен быть бесцветным. Для приготовления среды к воде добавляют пептон, натрий хлористый и агар. Смесь подогревают до расплавления агара. Затем добавляют калий фосфорнокислый двузамещенный и один из углеводов. Продолжают кипятить 2-3 минуты. Смесь подщелачивают 20% раствором едкого натра до pH 7,2-7,4, доводят объем среды до первоначального и добавляют 2 мл раствора индикатора Андрее. Среду фильтруют через ватно - марлевый фильтр, разливают в пробирки по 5 мл и стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 20 минут.

Ход исследования. Посев уколом на столбики полужидкой среды Хью-Лейфсона, содержащей глюкозу, лактозу, мальтозу, сахарозу, фруктозу. О разложении углеводов судят по появлению розового окрашивания через 18-24 часа со времени посева, иногда окрашивание появляется через 48 часов.

#### Биохимические методы исследования

##### Определение редукции нитратов и нитритов

###### 1. Определение редукции нитратов

Принцип. Метод основан на способности микроорганизмов восстанавливать соли азотной кислоты (нитраты) до солей азотистой кислоты (нитриты) и далее до последующих продуктов восстановления (аммиак, молекулярный азот, окись азота, гидроксилламин). Редукция нитратов в нитриты определяется с помощью реактива Грисса, а газообразные продукты - с помощью поплавка.



Ингредиенты:

бактопептон,

калий азотнокислый ( $\text{KNO}_3$ ),

сульфаниловая кислота,

альфа - нафтиламин,

уксусная кислота - 5 моль/л,

цинк металлический.

Приготовление нитратного бульона. Берут  $\text{KNO}_3$  - 1,0 г; бактопептона - 5,0 г; добавляют воды дистиллированной до 1000 мл, pH 7,4. Нитратный бульон разливают в химически чистые пробирки с поплавками по 5 мл. Автоклавируют при 0,5 атм. (115 град. С) в течение 20 минут.

Приготовление реактива Грисса. Раствор 1. 0,8 г сульфаниловой кислоты растворяют в 100 мл 5 моль/л уксусной кислоты при слабом нагревании.

Раствор 2. 0,6 г альфа - нафтиламина растворяют в 100 мл 5 моль/л уксусной кислоты при слабом нагревании.

Растворы хранят в посуде из темного стекла с притертыми пробками. Перед употреблением 1 и 2 раствора смешивают в равных объемах.

Ход исследования. Перед посевом в среду добавляют 20% инактивированной сыворотки. Посевы выдерживают в термостате при 37 град. С до 5-7 дней.

После инкубации в каждую пробирку с культурой вносят реактив Грисса по 0,1 мл.

Оценка результатов. Появление красного окрашивания через 30 секунд после добавления реактива Грисса свидетельствует о редукции нитратов до нитритов - реакция положительная. Отсутствие окрашивания свидетельствует о том, что реакция отрицательная или произошло восстановление до последующих продуктов. Поэтому при отсутствии окрашивания в пробирку добавляют на кончике скальпеля порошок металлического цинка и результат оценивают: окраска не проявляется - нитраты в среде отсутствуют, т.к. редуцированы бактериями до нитритов и далее - до последующих продуктов восстановления (реакция положительная); появляется красное окрашивание - нитраты в среде редуцированы до нитритов, но не бактериями, а цинком (реакция отрицательная).

## 2. Определение редукции нитритов

Принцип. Метод основан на способности микроорганизмов восстанавливать соли азотной кислоты (нитриты) до аммиака, гидросиламина, окиси азота, двуокиси азота, молекулярного азота.

Ингредиенты:

бактопептон,

калий азотистокислый ( $\text{KNO}_2$ ),

сульфаниловая кислота,

альфа - нафтиламин,

уксусная кислота - 5 моль/л.

Приготовление нитритного бульона. Берут калий азотистокислый (KNO<sub>2</sub>) - 0,2 г, добавляют бактопептона - 5,0 г, воды дистиллированной - до 1000 мл, рН 7,4. Нитритный бульон разливают в химически чистые пробирки с поплавками по 5 мл. Автоклавируют при 0,5 атм. (115 град. С) в течение 20 минут.

Приготовление реактива Грисса (см. определение редукции нитратов).

Ход исследования. Перед посевом в среду добавляют 20% инактивированной сыворотки. Посевы выдерживают в термостате при 37 град. С в течение 5-7 дней. После инкубации в каждую пробирку с культурой вносят реактив Грисса (по 0,1 мл смеси равных объемов реактивов 1 и 2, которые смешивают непосредственно перед употреблением).

Оценка результатов. Красное окрашивание - реакция отрицательная; отсутствие красного окрашивания указывает на восстановление нитритов - реакция положительная; наличие газа в поплавке при отсутствии окрашивания, редукция нитритов до газообразных компонентов - реакция слабоположительная.

### 3. Определение желатиназы (см. раздел 2.5.)

## 2.4. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

### МИКРОБОВ РОДА ГЕМОФИЛУС (*Haemophilus*)

Род гемофилус (*Haemophilus*) по международной классификации бактерий (Берги, 1980) охватывает двадцать разнообразных видов мелких неподвижных не образующих спор грамотрицательных палочек.

Наибольший удельный вес среди заболеваний человека, вызываемых гемофилами, принадлежит палочке инфлюэнцы (*Haemophilus influenzae*). Этот микроб, как потенциальный возбудитель, выделяется от больных при острых, реже хронических, заболеваниях верхних и нижних дыхательных путей (ринитах, синуситах, фарингитах, трахеитах, эпиглосситах, бронхитах, пневмониях, абсцессах, эмпиемах), гнойных менингитах, эндокардитах, сепсисе, воспалениях суставов. *H. arthrophilus* выделяется при подострых эндокардитах человека; *H. aegyptius* является причиной тяжелых остро протекающих конъюнктивитов; *H. parainfluenzae*, *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus* - нормальные обитатели респираторного тракта человека, но при определенных условиях первые два вида могут вызывать эндокардиты, а после вирусных инфекций - вторичные острые заболевания ротовой полости, глотки, трахеи и бронхов. *H. dysenteriae* вызывает мягкий шанкр - венерическое заболевание с четко выраженной клинической картиной. Для диагностики мягкого шанкра применяют в основном микроскопическое исследование содержимого язвы. *H. dysenteriae* - грамотрицательная палочка с характерным расположением в мазках - в виде длинных параллельных цепочек. Форма палочек напоминает восьмерку, челнок; иногда наблюдается полиморфизм. Бактериологическое исследование при мягком шанкре применяют очень редко, процент положительных результатов невысок, биологические свойства микроба изучены недостаточно.

Микробы рода гемофилов, особенно *H. influenzae*, чаще являются причиной заболеваний детей раннего и лиц пожилого возраста, вторичных бактериальных инфекций у больных, ослабленных хроническими соматическими, онкологическими заболеваниями.

При культивировании на искусственных питательных средах гемофилы нуждаются в факторах X и V, источником которых является свежая кровь человека и животных. По потребностям в указанных факторах при росте на искусственных питательных средах различные представители гемофилов дифференцируются внутри рода (см. табл. 9). Фактор крови X - гемин, активизирует пероксидазы, чем стимулирует рост гемофильных бактерий. Фактор крови V - никотинамидадениндинуклеотид восстановленный (NADH) содержится преимущественно в эритроцитах, являясь составной частью витаминов группы B, принимает участие в окислительно - восстановительных процессах при росте клеток.

Наиболее физиологичными средами для гемофилов являются среды с гретой кровью ("шоколадный" агар). Более пышный рост гемофилов на средах с гретой кровью объясняется тем, что нагревание крови способствует освобождению из эритроцитов факторов роста и разрушению присутствующих в ней ингибиторов V фактора.

## Ход микробиологического исследования

Первый день.

Выделение гемофильных микробов из материалов от больных и их идентификацию следует проводить по этапам.

Бактериоскопический метод: мазки из исследуемого материала или культуру, окрашенные по Граму, просматривают под микроскопом с иммерсией. Обнаружение в мазках мелких палочек равномерно окрашенных в бледно - красный цвет позволяет заподозрить наличие в исследуемом материале гемофилов.

Культуральный метод: исследуемый материал засевают бактериологической петлей на чашку с кровяным или шоколадным агаром. Кровь, посеянную на жидкие питательные среды, термостатируют при 37 град. С в атмосфере с 5%-10% CO<sub>2</sub> полученной в эксикаторе с зажженной свечой.

Второй день.

На агаре с нативной кровью (5%-10%) гемофилы растут в виде чрезвычайно мелких полупрозрачных колоний (диаметр 0,5 мм и менее), не имеющих характерных особенностей, их трудно дифференцировать от колоний других видов бактерий.

На шоколадном агаре гемофилы растут в виде полупрозрачных, сероватых, нежных, сочных колоний диаметром от 1 до 2 мм; в зависимости от состояний популяции могут формировать три вида колоний: крупные, круглые слизистые колонии (М-форма); круглые, полупрозрачные голубоватые колонии размером до 1 мм (S-формы); очень мелкие, менее 1 мм в диаметре, непрозрачные колонии (R-форма). В мазках из М- и S-колоний, окрашенных по Граму, видны мелкие грамотрицательные палочки; для R-форм характерен полиморфизм, встречаются и нитевидные формы. При окраске тушью по Гинсу у М- и S-форм вокруг клеток видна капсула, хорошо выраженная у М-форм и небольшая у S-форм. При росте на шоколадном агаре культура *H. influenzae* обладает "мышиним" запахом, что является одним из характерных признаков этой группы микробов.

Для накопления биомассы, необходимой при идентификации культур по биохимическим тестам, после микроскопирования подозрительные колонии отсевают штрихом в пробирки на шоколадный агар.

Одновременно проводят повторный высеv подозрительных колоний на питательный агар без крови и дрожжевых добавок. Посевы помещают в термостат при 37 град. С на 18-24 часа.

Отсутствие роста культуры на питательном агаре без крови и обнаружение в мазках из колоний, выросших на шоколадном агаре, мелких грамотрицательных палочек с капсулой или без нее, является первым этапом подтверждения выделения одного из видов гемофильных микробов.

При росте на шоколадном агаре большого числа однотипных колоний культуру можно изучить на наличие ферментов каталазы, оксидазы, уреазы, бета - галактозидазы, образование индола, редукции нитратов (таблица 9), определяют чувствительность к антибиотикам.

Таблица 9

### Биохимические свойства видов рода *Haemophilus*

	Фак-	Ката-	Окси-	бета-	Уреаза	Редук-	Индол	Гемо-	Глю-	Ла
--	------	-------	-------	-------	--------	--------	-------	-------	------	----

Виды	торы роста	лаза	даза	галакто- зидаза		ция нитра- тов		лиз	коза	то
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>H. influenzae</i>	XV	++	-	-	+	+	+/-<*>	-	+	-
<i>H. aegyptius</i>	XV	+	-	+	+	+	-	-	+	-
<i>H. parainfluenzae</i>	V	+	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	XV	+	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>H. aphrophilus</i>	X	+ <*>	-	+	-	+	-	-	+	+
<i>H. ducreyi</i>	X	-	-	-	-	+	-	-	-	-

-----

<\*> - Положительная реакция у капсульных штаммов.

<\*> - Положительная реакция слабая.

Эти тесты позволяют подтвердить выделение гемофилов и дать ориентировочный ответ о выделении *H. influenzae* уже через 24 часа после получения материала для бактериологического исследования.

Третий день. Из культур, выросших на шоколадном агаре, готовят мазки и окрашивают по Граму и Гинсу. Культуру идентифицируют до вида по тестам (см. табл. 9 и 10).

В ряде случаев при исследовании спинномозговой жидкости, крови, особенно при отсутствии четких результатов при бактериоскопии, культуру гемофилов необходимо отдифференцировать от менингококков, нейссерий, пневмококков и др. (см. табл. 10).

Таблица 10

Основные дифференцирующие признаки *H. influenzae*

от некоторых других микробов, возбудителей

бактериальных инфекций человека одной локализации

Вид, род	Рост на агаре		Морфология клеток (окраска по Граму)	Ката- лаза	Окси- даза	бета- галакто- зидаза	Уреаза
	без крови	с гретой кровью					
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>H. influenzae</i>	-	+ <*>	Грамотрицательные мелкие палочки	+	-	-	+
<i>N. meningitidis</i>	-	+	Грамотрицательные бобовидные диплоко- кки	+	+	-	-
<i>Neisseria</i> sp.	+	+	Грамотрицательные крупные кокки	+	+	-	-
<i>Branhamella</i>	+	+	-"	+	+	-	-
<i>Moraxella</i>	-	+	Грамотрицательные кокко-бациллы	+	+	-	-

Acinetobacter	+	+	-"-	+	-	-	+/-
S. pneumoniae	-	+ <*>	Грамположительные диплококки	-	-	+	-

-----

<\*> - Характерный "мышинный" запах.

<\*> - Вокруг колоний цвет среды зеленеет.

Регистрируют результаты реакции на ферменты каталазу, оксидазу, бета - галактозидазу и уреазу. Это позволяет уже на 3-й день исследования, т.е. через 48 часов, определить вид микроба.

Четвертый день. Регистрируют результаты по дополнительным биохимическим тестам. На основании комплекса изученных биологических свойств проводят окончательную идентификацию выделенных культур.

Выдается окончательный ответ о выделении того или иного вида из рода Haemophilus.

#### Окраска по Гинсу

Принцип. Капсула микроба обнаруживается в виде неокрашенной каймы вокруг окрашенного фуксином тела микроба на черном фоне.

Реактивы. Тушь, раствор "водного фуксина".

Для приготовления "водного фуксина" фуксин Циля разводят в 10 раз дистиллированной водой. Разведенный фуксин очень не стоек, его готовят непосредственно перед окрашиванием препарата. (Фуксин Циля - см. раздел 3.1.).

Ход исследования. Тушь разводят в 10 раз дистиллированной водой. На предметное стекло наносят каплю туши, исследуемую культуру тщательно перемешивают с тушью и, пользуясь покровным или шлифованным стеклом, готовят тонкий мазок по типу мазков крови. После подсушивания мазка на воздухе, фиксируют на пламени и докрашивают "водным фуксином" (5-10 мин.). Бактерии окрашиваются в красный цвет, капсулы остаются неокрашенными, они резко выделяются на черно - коричневом фоне.

#### Питательные среды

1. Сухой питательный агар (см. раздел 3.2.).
2. Кровяной агар (см. раздел 3.2.).
3. Агар с гретой кровью (см. раздел 3.2.).

4. Среда Гисса (определение сахаролитических ферментов)

Ингредиенты:

индикатор Андрее,

пептон,

натрий хлористый,

углеводы (глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза, фруктоза).

Для приготовления индикатора Андрее берут кислого фуксина - 1,0 г, 1 моль/л едкого натра - 64 мл, дистиллированной воды - 400 мл.

Приготовление среды. К 100 мл дистиллированной воды прибавляют 1 г пептона, 0,5 г натрия хлористого, 2 мл индикатора Андрее, нагревают до 80 град. С, pH 7,2. Затем среду кипятят 5 минут, фильтруют и доливают до первоначального объема дистиллированной водой. Добавляют 1 г одного из углеводов. Стерилизуют 3 дня текучим паром по 30 минут или при 0,5 атм. 15 минут.

Ход исследования. В пробирки после посева культуры добавляют 2-3 капли инактивированной сыворотки лошади или крупного рогатого скота для более активного расщепления углеводов. При расщеплении углеводов среда из бесцветной становится красной.

## Биохимические методы исследования

### 1. Определение фермента уреазы

Принцип. Метод основан на способности микроорганизмов, обладающих ферментом уреазой, расщеплять мочевины до аммиака, за счет которого происходит изменение pH среды в щелочную сторону, что определяется по изменению цвета индикатора.

#### Реактивы

Мочевина.

Калий фосфорнокислый однозамещенный ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

Калий фосфорнокислый двузамещенный ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).

Натрий хлористый ( $\text{NaCl}$ ).

Феноловый красный, 0,25% раствор.

Спирт 96%.

Приготовление растворов. Раствор А: 2 г мочевины растворяют в 2 мл 96% спирта и 4 мл дистиллированной воды. Раствор Б: 0,1 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,1 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5 г  $\text{NaCl}$ ; 1 мл 0,25% раствора фенолового красного; дистиллированной воды до 100 мл. Раствор автоклавируют 30 минут при 0,5 атм.

Ход исследования. Перед исследованием берут 1 часть раствора А и 19 частей раствора Б, смешивают, разливают по 0,1 мл в агглютинационные пробирки (стерильно) и вносят испытуемую культуру в количестве 1-2 петель. Пробирки помещают в термостат при 37 град. С на 30 минут. При наличии у бактерий фермента уреазы среда приобретает ярко - малиновое окрашивание. Длительность наблюдения за реакцией до 18-24 часов.

## 2. Определение бета - галактозидазы

Принцип. Метод основан на способности микроорганизмов, обладающих ферментом бета - галактозидазой, гидролизовать ONPG (о-нитрофенил-бета-D-галактопиранозид) - бесцветный субстрат, освобождая о-нитрофенол - желтого цвета.

### Реактивы

о-нитрофенил-бета-D-галактопиранозид (ONPG).

Для изготовления раствора 150,63 мг ONPG растворяют в 100 мл стерильного физиологического раствора, рН 6,7, раствор бесцветный. Раствор хранят в склянке из темного стекла в холодильнике не более 3 недель.

Ход исследования. В стерильные агглютинационные пробирки разливают по 0,5 мл раствора ONPG и вносят одну полную петлю испытуемой культуры. Инкубация при 37 град. С 2-4 часа. Положительная реакция определяется по появлению ярко - желтого окрашивания за счет о-нитрофенола.

## 3. Определение индолообразования

Принцип. Метод основан на способности микроорганизмов расщеплять аминокислоту триптофан с образованием индола.

### Реактивы

Пара-(диметиламино)-бензальдегид.

Ортофосфорная кислота, чда, хч, концентрированная.

Спирт 96%.

Для приготовления индикаторных бумажек берут пара-(диметиламино)-бензальдегида - 5 г; ортофосфорной кислоты концентрированной - 10 мл; спирта 96% - 50 мл.

Раствором смачивают фильтровальную бумагу, высушивают, нарезают полосками, хранят в темной посуде.

Ход исследования. Пробирки с питательным бульоном засеивают одной петлей культуры и добавляют 2-3 капли инактивированной лошадиной сыворотки. Под пробку помещают индикаторную бумажку на индол, пропитанную пара-(диметиламино)-бензальдегидом. При образовании индола через 18-24 часа инкубации при 37 град. С желтая бумажка приобретает розово - малиновый цвет.

4. Определение редукции нитратов (см. раздел 2.3.)

5. Тест на каталазу (см. раздел 3.3.)

6. Для определения ферментов оксидазы,

уреазы, бета - галактозидазы, образования индола,

ферментации углеводов - рекомендуется использовать

систему индикаторных бумажек (СИБ), (см. раздел 3.3.)

Определение потребностей в X и V факторах крови <\*>

Чашки Петри с простым агаром и агаром с 5% крови засевают: одну половину - исследуемой культурой, другую - исследуемой культурой в смеси с взвесью *Staphylococcus aureus*. Если наблюдается рост на агаре с кровью, то исследуемый микроб требует только X фактора. Если рост наблюдается на кровяном агаре совместно со стафилококком, то исследуемый микроб требует X и V факторов. Если наблюдается рост вместе со стафилококком на простом агаре, то микробы требуют V фактора. Если наблюдается рост на простом агаре на секторе без стафилококка, то исследуемая культура не относится к гемофилам.

-----

<\*> - Используется в качестве дополнительного метода.

## 2.5. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

### МИКРОБОВ РОДА КОРИНЕБАКТЕРИЯ (*Corynebacterium*)

Род коринебактерия (*Corynebacterium*) объединяет большое число видов грамположительных неподвижных, не образующих спор палочек. *C. diphtheriae* - вид, патогенный для человека, вызывает системное бактериально-токсическое заболевание - дифтерию зева, носа, трахеи, реже - глаз, ушей, половых органов, кожи. *C. minutissimum* описана как возбудитель эритразмы, характерных кожных поражений человека. Другие виды коринебактерий обычно выделяются со слизистых и кожи здорового человека, но иногда являются причиной инфекционно - воспалительных процессов.

В последние годы описаны случаи язвенно - некротических заболеваний человека с поражениями зева, носа, трахеи, легких, при которых выделялись некоторые виды коринебактерий. Так, *C. ulcerans* могут вызывать дифтериеподобные заболевания с поражением слизистых верхних дыхательных путей; *C. pseudotuberculosis* - абсцессы с язвенно - некротическими очагами, язвенные лимфадениты; *C. enzymicum* - очень редко тяжелую абсцедирующую бронхопневмонию; *C. ruogenes*, *C. haemolyticus* - язвенно - некротические поражения в виде фарингитов, тонзиллитов, гингивитов, стоматитов, уретритов. *C. xerosis* - обитатель слизистой слезного канала, может быть причиной длительно и вяло протекающих конъюнктивитов.

Для подтверждения этиологической значимости в патологическом процессе *C. xerosis* необходимо провести повторное исследование материала с количественным учетом числа выросших колоний. Для *C. pseudodiphtheriticum*, которая обычно обитает на слизистых носа, глотки, слухового канала и поверхности кожи, возможность вызывать воспалительные процессы в местах обычного обитания не доказана. Этот вид



рассматривается как представитель нормальной микрофлоры слизистых и кожи человека. При повторном выделении из крови, спинномозговой жидкости и других, обычно стерильных субстратов, все перечисленные виды коринебактерий следует оценивать как потенциальных возбудителей, и при этом требуется проведение терапевтических мероприятий. Следует обращать внимание на выделение гемолитических (токсигенных) штаммов, которые при первичном посеве формируют значительное количество колоний или растут в виде чистой культуры. Такой выделенный вид коринебактерий можно рассматривать как возбудитель воспалительного процесса или дифтериеподобного заболевания.

#### Ход бактериологического исследования

Первый день. Все поступившие материалы засевают на 5% кровяной агар штрихом, тщательно втирая их по секторам с целью получения отдельных колоний. Посевы помещают в термостат при 37 град. С.

Одновременно с посевами из поступившего материала готовят 2-3 мазка, один из которых окрашивают по Граму. Мазки просматривают под микроскопом с иммерсией. Обнаружение грамположительных палочек с характерной морфологией и расположением позволяет заподозрить наличие коринебактерий. Для уточнения проводят микроскопию мазков, окрашенных щелочным раствором метиленового синего. Если в мазках видны слегка изогнутые изящные палочки с булабовидными утолщениями на концах, располагающиеся в виде войлока, пакета булавок, цифры V, содержащие темно - окрашенные зерна на концах, то следует заподозрить наличие *C. diphtheriae*, о чем срочно сообщить лечащему врачу и далее вести исследование в соответствии с "Инструкцией по бактериологическому исследованию на дифтерию" (Приказ МЗ СССР N 580 от 26 июня 1974 г.).

У других видов коринебактерий палочки более толстые, короткие, обычно располагаются в виде частокола; реже встречаются булабовидные утолщения и темно - окрашенные зерна, расположенные на одном конце.

При микроскопии первичных мазков (особенно приготовленных из гнойного отделяемого) можно наблюдать своеобразную морфологию клеток, напоминающую по расположению коринеформные бактерии: грамположительные длинные тонкие или короткие толстые палочки с утолщениями на одном конце. В отличие от коринебактерий четко видны или ветвящиеся формы, или раздвоение на концах палочек, коккобациллярные клетки, располагающиеся парами или цепочками. Такая морфология микробов характерна для микробов родов *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*. Эта группа грамположительных, не образующих спор палочек, включает микроаэрофильные и облигатноанаэробные формы. Поэтому при посеве материала на кровяной агар, рост культур этих микроорганизмов или отсутствует, или может появиться на 3-5 сутки инкубации в виде очень мелких сероватых крошковидных колоний (*Actinomyces israelii*, *Propionibacterium acne*).

Второй день. Через 20-24 часа все посевы просматривают на наличие роста культуры. На кровяном агаре можно наблюдать рост колоний, которые, в зависимости от вида коринебактерий, имеют некоторые особенности строения и своеобразную морфологию клеток.

1. Колонии, размером от 1 до 2-3 мм, чаще круглые, непрозрачные, сероватые (S-форма) или шероховатые, крошковидные, исчерченные, с неровным краем колонии (R-форма), и под ними зона полного гемолиза эритроцитов.

В мазках из выросших колоний, окрашенных по Граму, видны грамположительные прямые или слегка изогнутые полиморфные палочки, располагающиеся кучками в виде рассыпанных булавок или римской цифры V или буквы L. Палочки не ветвятся, клетки содержат метакрохроматические зерна (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*).

2. Колонии круглые, непрозрачные, маслянистые мелкие или крупные, кремовые, бледно - желтые, оранжево - коричневые, гладкие без зон гемолиза.

В мазках из крупных колоний равномерно окрашенные грамположительные палочки расположены частоколом. Встречаются редкие булабовидные и зернистые с одного конца формы (*C. xerosis*, *C. pseudodiphthericum*). В мазках из мелких колоний видны полиморфные грамположительные булабовидные, четкообразные палочки, иногда коккоидные формы с маленькой краевой капсулой (*C. enzymicum*).

3. Очень мелкие до 1 мм или крупные 1-2 мм колонии, гладкие, круглые, непрозрачные, окруженные большой прозрачной зоной полного гемолиза эритроцитов. В мазках из описанных колоний видны мелкие

грамположительные коккобациллы, которые расположены в виде разреженных цепочек или пунктира, они напоминают стрептококки, но это - дифтероидные формы коринебактерий (*C. pyogenes*, *C. haemolyticus*).

Для выделения чистых культур и накопления биомассы описанные колонии отсевают на 10% сывороточный агар.

Если на чашках с кровяным агаром обнаружен рост однотипных колоний с идентичной морфологией клеток, то культуру, снятую петлей с питательной среды, исследуют для выявления наличия ферментов уреазы, желатиназы и способность утилизировать углеводы (см. таблицу 11).

Третий день. Из культур, выросших на сывороточном агаре, делают мазки, окрашивают по Граму для подтверждения наличия грамположительных палочек, характерных по морфологии и расположению для коринебактерий. Культуру используют для идентификации по тестам, представленным в таблице 11. При необходимости культуру используют для оценки чувствительности к антибиотикам.

Регистрируют результаты изучения биохимических свойств штаммов из однотипных колоний с кровяного агара. Если свойства культуры соответствуют одному из видов коринебактерий, то исследования заканчивают и дают ответ о выделении соответствующего вида. (Таблица 11).

Наблюдение за посевами крови, которые выдерживают в термостате, ведут ежедневно. При выявлении роста и обнаружении в мазках, окрашенных по Граму, клеток, характерных для коринебактерий, делают высев на 10% сывороточный агар. Идентификацию выделенных культур проводят по этапам, описанным выше.

Четвертый день. Проводят учет результатов по биохимическим тестам для идентификации выделенных культур. В соответствии с данными таблицы 11 дают ответ о выделенном из исследуемого материала виде коринебактерий. Для потенциальных возбудителей заболевания указывают чувствительность культур к антибиотикам.

Таблица 11

#### Биохимические свойства микробов рода *Corynebacterium*

Виды	Гемо-лиз	Катала-за <*>	Уреа-за <*>	Желатина-за <*>	Цистина-за <***>	Редукция нитратов	Глю-коза
1	2	3	4	5	6	7	8
<i>C. diphtheriae</i>	d	+	-	-	+	+	+
<i>C. pseudodiphthericum</i>	-	+	+	-	-	+	-
<i>C. xerosis</i>	-	+	-	-	-	+	+
<i>C. pseudotuberculosis</i>	+	+	d	d	-	d	+
<i>C. enzymicum</i>	-	+	...	-	-	(+)	+
<i>C. ulcerans</i>	+	+	+	+	-	-	+
<i>C. pyogenes</i>	++	-	-	+ - <****>	-	-	+
<i>C. haemolyticum</i>	++	(+)	-	-	-	-	+
Неопределенная груп-па <***>	-	+	-	-	-	-	+
<i>C. minutissimum</i>	-	+	-	-	-	-	+

<\*> - Тесты, обязательные при идентификации возбудителя дифтерии.

<\*> - Тесты на цистиназу, расщепление крахмала и определение экзотоксина проводятся в соответствии с Приказом

Министерства здравоохранения СССР N 580 от 26 июня 1974 г.

<\*\*\*> - Выделяют из крови ослабленных больных.

<\*\*\*\*> - +/-: + мелкие колонии; - крупные колонии.

... - Нет данных.

(+) - Слабая положительная реакция.

d - Реакция, вариабельная у разных штаммов.

#### Окраска щелочным раствором метиленового синего

по Леффлеру

#### Реактивы

Дистиллированная вода - 99 мл

1% раствор едкого калия (KOH) - 1 мл

Метиленовый синий - 3 г

Спирт 96% - 30 мл

Для приготовления раствора 3 г метиленового синего растворяют в 30 мл спирта 96%, смешивают с 1 мл 1% раствора KOH и добавляют 99 мл дистиллированной воды.

Ход исследования. Исследуемый материал наносят на чистые обезжиренные предметные стекла, растирают его тонким равномерным слоем по поверхности стекла, высушивают на воздухе. Препарат фиксируют 3 мин. в 96% спирте, высушивают, затем наносят каплю щелочного раствора метиленового синего и окрашивают в течение 3-10 минут, смывают оставшийся краситель струей холодной воды и высушивают.

#### Питательные среды

1. Питательный агар (см. раздел 3.2.).

2. Кровяной агар (см. раздел 3.2.).

3. Сывороточный агар (см. раздел 3.2.).

4. Среды Гисса (см. раздел 2.4.).

#### Биохимические методы

1. Определение каталазы (см. раздел 3.3.).

2. Определение уреазы (см. раздел 2.4.).

3. Редукция нитратов (см. раздел 2.3.).

#### 4. Определение желатиназы по методу Ле-Минора

Принцип. Метод основан на способности протеолитического фермента желатиназы гидролизовать желатину до водорастворимых соединений.

#### Реактивы

Засвеченная и проявленная фото- и киноплёнки.

Калий фосфорнокислый однозамещенный 1/15 моль/л.

Натрий фосфорнокислый двузамещенный 1/15 моль/л (высушенный на воздухе в течение 12-14 дней).

Приготовление растворов:

Раствор А. Растворяют 9,078 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  в 1 л дистиллированной воды.

Раствор Б. Растворяют 11,876 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  в 1 л дистиллированной воды.

Для получения фосфатного буфера, 1/15 моль/л, pH 7,1 берут 33,4 мл раствора А и 66,6 мл раствора Б и смешивают.

#### Ход исследований

Используют фото- и киноплёнку, предварительно засвеченную, проявленную и фиксированную. Плёнку нарезают на квадраты размером 5x5 мм, стерилизуют в чашках Петри в автоклаве при 0,5 атм. (115 град. С) 30 минут (для предупреждения слипания плёнок их помещают между прокладками фильтровальной бумаги). Стерильную плёнку помещают в пробирки со взвесью 18-20 часовой агаровой культуры микробов в 1/15 моль/л растворе фосфатного буфера pH 7,1. Просветление 3/4 или всей поверхности плёнки считается положительным результатом. Срок наблюдений - 1-5 дней.

## 2.6. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

## МИКРОБОВ СЕМЕЙСТВА ЭНТЕРОБАКТЕРИЕВЫХ

(Enterobacteriaceae)

Семейство кишечных энтеробактерий (Enterobacteriaceae) объединяет грамотрицательные анаэробные и факультативно анаэробные бактерии, не образующие спор, капсульные и бескапсульные, подвижные или неподвижные, хорошо растущие на обычных питательных средах.

Облигатным признаком его представителей является ферментация глюкозы с образованием кислых или кислых и газообразных продуктов. Отношение к другим углеводам может у энтеробактерий варьировать.

Для энтеробактерий характерна способность восстанавливать нитраты, проявлять каталазную активность. Энтеробактерии не имеют фермента цитохромоксидазы.

Для дифференциации энтеробактерий от других семейств грамотрицательных бактерий основными тестами являются: тест на цитохромоксидазу, восстановление нитратов в нитриты, тест на каталазную активность и OF-тест (окислительно - ферментативный тест Хью-Лейфсона) для определения биохимических реакций с углеводами.

Наибольшее признание нашла в настоящее время классификация семейства Enterobacteriaceae, представленная в "Кратком определителе бактерий Берги", М., 1980 г. (см. таблицу 12).

Таблица 12

### Классификационная схема семейства Enterobacteriaceae

("Краткий определитель бактерий Берги", М., 1980)

Триба	Род	Вид (подрод)
1	2	3
I. Escherichieae	1. <i>Escherichia</i>	1. <i>E. coli</i>
	2. <i>Edwardsiella</i>	1. <i>E. tarda</i>
	3. <i>Citrobacter</i>	1. <i>C. freundii</i> 2. <i>C. intermedius</i>
	4. <i>Salmonella</i>	1. Подрод I ( <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. hirschfeldii</i> <*>, <i>S. typhi</i> , <i>S. paratyphi</i> A, <i>S. schotmuelleri</i> <***>, <i>S. typhimurium</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. gallinarum</i> ) 2. Подрод II ( <i>S. salamae</i> ) 3. Подрод III ( <i>S. arizonae</i> ) 4. Подрод IV ( <i>S. houtenae</i> )
	5. <i>Shigella</i>	1. <i>Sh. dysenteriae</i> 2. <i>Sh. flexneri</i> 3. <i>Sh. boydii</i> 4. <i>Sh. sonnei</i>
II. <i>Klebsiella</i>	1. <i>Klebsiella</i>	1. <i>K. pneumoniae</i> 2. <i>K. rhinoscleromatis</i> 3. <i>K. ozaenae</i>
	2. <i>Enterobacter</i>	1. <i>E. cloacae</i> 2. <i>E. aerogenes</i>
	3. <i>Hafnia</i>	1. <i>H. alvei</i>
	4. <i>Serratia</i>	1. <i>S. marcescens</i>
III. <i>Proteae</i>	1. <i>Proteus</i>	1. <i>P. vulgaris</i>

		2. <i>P. mirabilis</i> 3. <i>P. morganii</i> 4. <i>P. rettgeri</i> 5. <i>P. inconstans</i> A B
IV. Yersinieae	1. <i>Yersinia</i>	1. <i>Y. pestis</i> 2. <i>Y. pseudotuberculosis</i> 3. <i>Y. enterocolitica</i>
V. Erwinieae	1. <i>Erwinia</i>	Группы 1. <i>Amylovora</i> (вкл. 6 видов) 2. <i>Herbicola</i> (вкл. 3 вида) 3. <i>Carotovora</i> (вкл. 4 вида)

-----

<\*> - *S. hirschfeldii* соответствует *S. paratyphi* C.

<\*> - *S. schottmuelleri* соответствует *S. paratyphi* B.

В отличие от прежних представлений теперь считают, что практически любой представитель семейства энтеробактерий может быть причастен, при определенных обстоятельствах, к возникновению инфекционного процесса различной локализации.

#### Ход микробиологического исследования

Первый день.

Идентификация энтеробактерий начинается с изучения их колоний на пластинчатых средах. Для целей клинической микробиологии это, в первую очередь, среды Эндо или ЭМС-агар (с эозин - метиленовым синим), обладающие дифференциально - диагностическими свойствами. При исследовании кишечного содержимого могут быть использованы дополнительно среды Плоскирева, висмут - сульфитный агар, слабощелочной и кровяной агар.

На среде Эндо колонии представителей семейства Enterobacteriaceae обычно выпуклые с правильными очертаниями (круга), более или менее опалесцирующие, иногда слизистые. Они могут быть окрашены в красный цвет с наличием металлического блеска или без него (лактозоположительные энтеробактерии), бесцветными (лактозоотрицательные), могут приобретать розоватый или сероватый оттенок с более или менее выраженным темным центром, особенно у более крупных колоний.

Диаметр и окраска колоний могут варьировать не только в зависимости от родовой принадлежности, но и от массивности роста. В среднем диаметр колоний составляет 1-2 мм, мелкие бесцветные колонии - росинки - характерны в 1 сутки роста для иерсиний (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*) <\*>.

-----

<\*> - Такие чашки необходимо дополнительно инкубировать при комнатной температуре еще 18-20 часов.

*P. vulgaris* и *P. mirabilis* обычно дают вуалеобразный рост ("роение"), а представители родов *Klebsiella* и *Enterobacter* чаще образуют сочные слизистые розовые колонии диаметром 2-3 мм. Шигеллы, сальмонеллы, гафнии, нероящиеся представители рода протеев обычно образуют более "нежные" колонии небольших размеров. Часть штаммов серраций дает розово - красные, с фуксиновым оттенком пигментированные колонии.

Намеченные для дальнейшего изучения колонии снимают бактериологической петлей (или иглой) и засевают штрихом по косяку и уколом в столбик комбинированной среды для первичной идентификации. Наиболее принятыми в отечественных лабораториях являются среды Клиглера, Олькеницкого и их модификации. Эти

двух(лактоза, глюкоза) и трех- (лактоза, глюкоза, сахароза) сахарные среды, включающие для выявления образования сероводорода: аммоний - железо (II) - сульфат (соль Мора), натрий тиосульфат (гипосульфит) и мочевины, позволяют после 18-20-часовой инкубации их при 37 град. С составить предварительное заключение о возможной родовой принадлежности выделенных культур и определить набор необходимых тестов для идентификации рода и вида.

Для иерсиний дополнительная и параллельная инкубация посевов при комнатной температуре обеспечивает более четкое проявление биохимических реакций.

Второй день.

Учет результатов посева в среду для первичной идентификации.

Микроскопия окрашенных по Граму мазков.

Микробы семейства Enterobacteriaceae дают на поверхности скошенной части среды Клиглера, Олькеницкого (или модификации) влажный, однородный, опалесцирующий рост без пигментообразования (за исключением представителей рода *Serratia*).

Ферментация глюкозы - облигатное свойство всех энтеробактерий - проявляется в изменении окраски столбика среды (цвет зависит от используемого в среде индикатора, а также интенсивности кислотообразования).

При наличии в составе среды мочевины (среда Олькеницкого и ее модификации) окраска столбика среды не меняется в случаях выделения энтеробактерий, гидролизующих мочевины (многие представители родов *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, вида *E. cloacae*, кроме *P. inconstans*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, иногда *S. marcescens*). В этих случаях кислые продукты ферментации глюкозы нейтрализуются щелочными продуктами гидролиза мочевины.

Особенности гидролиза мочевины клебсиеллами и иерсиниями не всегда позволяют выявить этот признак при включении мочевины в комбинированную среду. Более надежным для них является определение уреазной активности в средах с мочевиной по Кристенсену или по Преусу, для чего параллельно с посевом в комбинированную среду делают посев в пробирку со средой Кристенсена.

Неизменная окраска столбика среды, не содержащей мочевины (среда Клиглера), свидетельствует о выделении микробов, не относящихся к семейству Enterobacteriaceae <\*>.

-----

<\*> - Для подтверждения такого заключения используют тест на цитохромоксидазу (отрицательный у энтеробактерий), а при необходимости и другие в соответствии с "Определителем Берги", 1980.

Кроме кислотообразования, по наличию разрывов (отслаиванию среды от стенок или дна пробирки) в столбике комбинированной среды судят об образовании при ферментации глюкозы газообразных продуктов (газообразование характерно для большинства эшерихий, эдвардсиелл, цитробактеров, подавляющего большинства сальмонелл, представителей трибы клебсиелл, отдельных видов протей).

Почернение среды, появляющееся в средней или нижней части столбика, происходит при образовании выделенным микробом сероводорода, что свойственно, представителям рода *Salmonella*, видов *S. freundii*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *Edwardsiella* и некоторым представителям рода *Erwinia*.

Способность ферментировать лактозу (а в трех - сахарной среде и сахарозу) оценивают по изменению окраски скошенной части комбинированной среды. Обычно лактозоположительными бывают представители родов *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*. Ферментация лактозы нередко коррелирует с ферментацией сахарозы. В неясных случаях следует проверить эти свойства путем посева культур в среды Гисса с соответствующими углеводами.

Таким образом, через 18-20 часов инкубации посева в комбинированную среду и одновременно в среду с мочевиной по Кристенсену или по Преусу возможен учет 4-5 признаков, характеризующих выделенную культуру, что позволяет значительно сузить диапазон подозреваемых родковых групп.

Сходное сочетание биохимических реакций (отношение к лактозе, глюкозе, мочеvine, образование сероводорода) может наблюдаться одновременно у нескольких родовых групп семейства *Enterobacteriaceae*, и для их дифференциации необходимо использовать дополнительные тесты, минимально необходимые для установления родовой, а, в ряде случаев, и видовой принадлежности. Известно немало рекомендаций по составу таких минимальных наборов дифференциальных тестов для определения рода в семействе *Enterobacteriaceae*. В таблице 13 (нижняя часть) представлены тесты, наиболее остро необходимые и относительно более доступные практическическим бактериологическим лабораториям.

Второй день завершают посевами на среды минимального дифференцирующего ряда и скошенный питательный агар (таблица 13).

Посев в среду с мочевиной по Кристенсену или по Преусу не повторяют, если он был сделан на этапе отбора колоний.

Для большей четкости и надежности результатов полезно учитывать следующее:

а) при "скашивании" среды Кристенсена с мочевиной высота столбика должна превышать длину скошенной части. Посев делают штрихом по скошенной части. С культурами протеев (кроме *P. inconstans*) положительные результаты могут быть получены в течение дня, но окончательный учет производят через 18-24 часа;

б) для определения индола используют индикаторные бумажки, пропитанные реактивом Эрлиха или Ковача;

в) для воспроизведения тестов с метиловым красным и Фогеса - Проскауэра кроме классического метода с жидкой средой Кларка можно использовать полужидкую среду Кларка, что позволит в этой же пробирке определить подвижность изучаемого микроба;

г) при испытании подвижности культуры в полужидком агаре следует делать укол петлей на глубину 1-1,5 см, а не до дна пробирки;

д) при выделении лактозоотрицательных, безгазовых культур, не образующих сероводород и не гидролизующих мочеvinу, к числу дополнительных родовых тестов следует добавить ацетатный (или цитратный по Кристенсену) для более надежной дифференциации шигелл (не растущих на ацетатной среде и цитратной среде Кристенсена) от эшерихий, вырастающих обычно на первые, иногда вторые сутки.

Третий день.

Проводится регистрация результатов испытываемой культуры в минимальном ряду тестов. В соответствии с таблицей 13 делают заключение о родовой принадлежности выделенной культуры.

В клинической микробиологии идентификация энтеробактерий завершается обычно определением рода и вида выделенной культуры и, лишь при наличии эпидемиологических показаний, и иногда для утверждения этиологической значимости, она дополняется определением биоваров (по старой терминологии биотипов), а в некоторых родовых группах условно патогенных энтеробактерий - определением сероваров (по старому серотипов) (*Escherichia*, *Citrobacter*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*). Определение рода и вида энтеробактерий основывается на изучении совокупности биохимических тестов. Попытки пренебрегать определением минимального ряда родовых биохимических тестов неизбежно влекут за собой ошибочную диагностику, исключают возможность выявления всего многообразия условно - патогенных энтеробактерий, связываемых в настоящее время с патологией у человека.

Определение по минимальному набору тестов родов *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Hafnia*, *Serratia* (включающих, согласно "Краткого определителя бактерий Берги", по одному виду) позволяет одновременно делать заключение о выделении соответствующих видов *E. coli*, *E. tarda*, *H. alvei* или *S. marcescens*.

Наличие фуксинокрасного или розового пигмента может подтверждать принадлежность выделенной культуры к виду *S. marcescens*, но отсутствие пигмента не исключает такого заключения.

Если по предварительным данным не исключена принадлежность культуры к родам *Hafnia* или *Yersinia*, целесообразно сделать посев в 2 пробирки со средой Кларка, одну из которых оставить до следующего дня при комнатной температуре, а другую - при 37 град. С, с последующим воспроизведением тестов с метиловым красным и Фогеса - Проскауэра (см. табл. 13). Дополнительным признаком в пользу выделения *Hafnia* может быть особенно бурное (в сравнении с другими энтеробактериями) выделение кислорода в пробе с 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на предметном стекле (тест на каталазу).



На III день идентификации культуры, отнесенные по данным учета минимального ряда к родам *Salmonella*, *Citrobakter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Yersinia* подвергают дальнейшему изучению с целью определения вида (подрода).

При внутриродовой дифференциации требуются различные наборы биохимических тестов для разных родов. Соответствующие сведения приведены в таблице 14.

В связи с неразработанностью внутривидовой идентификации *Erwinia* ответ ограничивают определением группы *Herbicola* (см. табл. 13).

При наличии показаний и возможностей в этот же день культуры, отнесенные к родам *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobakter*, *Proteus*, *Escherichia*, испытывают в реакциях агглютинации с родовыми и групповыми агглютинирующими сыворотками согласно существующим наставлениям.

Для серологического изучения используют суточные культуры на скошенном питательном агаре, засеваемом одновременно с посевами на минимальный ряд родовых тестов. (2 день идентификации).

Четвертый день.

Учет результатов внутриродовой дифференциации (табл. 14). Выдача ответа.

Таблица 13

Основные признаки межродовой дифференциации

семейства Enterobacteriaceae

(родовые группы даны в соответствии с Берги, 1980)

	Тест или субстрат	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Edward-siella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Citrobakter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobakter</i>
1	2	3	4	5	6	7	8	9
По результатам посева на комбинированную среду (Олькеницкого или сходную)	Лактоза	+, -	-	-	-	+, x	+	+
	Глюкоза (газ)	+, -	-	+	+, -	+	+	+
	Сероводород	-	-	+	+, -	+, -	-	-
	Мочевина (оринентир.)	-	-	-	-	x	x, -	-
Дополнительные тесты для определения родовой принадлежности	Цитрат Симмонса	-	-	-	+, -	+	+	+
	Мочевина (по Кристенсену или Преусу)	-	-	-	-	-, x	+	(+), -
	Индол	+, -	+, -	+	-	-, +	-, +	-
	Тест с метиловым красным	+	+	+	+	+	-, +	-
	Тест Фогеса-Проскауэра	-	-	-	-	-	+, -	+
	Фенилаланиндезаминаза	-	-	-	-	-	-	-
	Лизиндекарбоксилаза	+, -	-	+	+, -	-	+	-, +

Подвижность	+, -	-	+	+	+	-	+
Ацетат	+	-	x	x	x	+	+

+ 90% и более положительных реакций.

(+) Замедленно положительные реакции (через двое и более суток).

- 90% и более отрицательных реакций.

+, - чаще положительные, реже отрицательные реакции.

x различные биохимические реакции.

В таблице даны свойства типичных штаммов.

-----

<\*> - Без учета свойств *Y. pestis*.

Таблица 14

### Основные признаки внутриродовой дифференциации

семейства Enterobacteriaceae <\*>

Тест или субстрат	Shigella				Salmonella				Citrobacter <*>		Klebsiella			Enterobacter
	dys-ent.	flex-ner.	boy-dii	son-nei	подроды				fre-un-dii	in-ter-med.	pne-um-on.	ozae-nae	rhi-nosc.	cloa-cae
	I	II	III	IV	I	II	III	IV						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Адонит									-	+				-, +
Дульцит					+	+	-	-			-, +	-	-	-, +
Инозит											+			x
Маннит	-	+	+	+										
Салицин	-	-	-	-	-	-	-	-			+	+	+	
Сорбит	x	x	x	-										
Сахароза	-	-	-	(+)										
Мальтоза														
Малонат					-	+	+	-	-	x	+	-	+, -	+
Желатин					-	(+)	(+)	(+)	-, +	+, -				+
Орнитин-декар-боксила-за	-	-	-	+					-, +	+	-			+
Лактоза	-	-	-	(+)	-	-	+, x	-			+	x	(x)	
Глюкоза (газ)	-	-, +	-	-							+	x	-	
Серово-дород									+	-				

Мочевина									x	+, (+)	+	x	-	+, -
Цитрат Симмонса											+	x	-	
Индол				-					-	+				
Лизинде-карбоксиллаза	-	-	-	-							+	-, +	-	-
Реакция с метиловым красным											-, +	+	+	
Реакция Фогеса-Пр.											+	-	-	
Подвижность											-	-	-	+

-----

<\*> - В таблицу не включены роды (*Escherichia*, *Edwardsiella*, *Hafnia*, *Serratia*), представленные одним видом, и род *Ervinia*, для которого заканчивают идентификацию определением группы *Ervinia herbicola*.

<\*> - В вид *Citrobacter intermedius* входит как биовар *Citrobacter divespus* (вид - по Ewing, 1973-1975 г.г.), см. обозначение таблицы 13.

#### Питательные среды

##### 1. Трехсахарная среда Олькеницкого

#### Ингредиенты

Питательный агар, рН 7,2-7,4 - 1000 мл

Лактоза - 1,0 г

Аммоний - железо (II) сульфат (Соль Мора) - 0,2 г

Натрий тиосульфат (Гипосульфит) - 0,3 г

Сахароза - 10,0 г

Глюкоза - 1,0 г

Мочевина - 10,0 г

Феноловый красный, 0,4% водн. р-р - 4,0 мл

Приготовление раствора индикатора: феноловый красный - 0,1 г растворяют в 25,0 мл стерильной дистиллированной воды. Раствор можно хранить в холодильнике до 10 дней.

Приготовление среды. Соль Мора и гипосульфит растворяют предварительно в дистиллированной воде в пробирках, углеводы и мочевины также растворяют отдельно в дистиллированной воде в колбе на водяной бане. Все ингредиенты добавляют к расплавленному агару, размешивают и фильтруют через стерильную марлю, устанавливают pH 7,2-7,4; вносят индикатор и разливают по 5-6 мл в пробирки.

Стерилизуют при 0,5 атм. 20 минут или текущим паром 3 дня подряд по 20 минут. Среду охлаждают в скошенном положении для получения столбика высотой 2,5 см и косяка длиной 4 см. Готовая среда - бледно-розового цвета.

#### Ход исследования

Сеют уколом в столбик и штрихом по скошенной поверхности. Инкубируют при 37 град. С 18-20 часов.

Кислотообразование вызывает появление желтой окраски, разложение мочевины (увеличение pH) - покраснение; образование сероводорода приводит к почернению в столбике.

#### 2. Трехсахарная среда с мочевиной

(Модификация среды Олькеницкого)

#### Ингредиенты

Среда Гисса с лактозой и индикатором - 45,0 г

ВР (сухая)

Глюкоза - 1,1 г

Сахароза - 10,0 г

Мочевина - 10,0 г

Натрий тиосульфат (гипосульфит) - 1,0 г

Аммоний-железо (II) сульфат (Соль Мора) - 0,2 г

Дистиллированная вода - до 1000 мл.

Приготовление. Среду разливают в пробирки по 5-7 мл, стерилизуют при 0,5 атм. 15 минут.

#### Ход исследования

Посев и инкубацию проводят как для среды Олькеницкого. Кислотообразование изменяет цвет среды на голубой (до интенсивного синего); культуры, гидролизующие мочевину, не изменяют окраски среды или придают ей розовато - красный цвет; образование сероводорода вызывает почернение среды в столбике.

### 3. Среда Кристенсена с мочевиной

#### Ингредиенты

##### Раствор I.

Пептон - 1,0 г

Натрий хлористый - 5,0 г

Глюкоза - 1,0 г

Калий фосфорнокислый однозамещенный - 2,0 г

Феноловый красный (раствор 1:500) - 6,0 мл

Мочевина - 20,0 г

Дистиллированная вода - 100,0 мл

pH 6,8-6,9, стерилизуют фильтрованием через фильтр Зейтца.

##### Раствор II.

Агар-агар - 15,0 г

Дистиллированная вода - 900,0 мл

Стерилизуют при 0,5 атм. 15 минут.

Приготовление. К охлажденному до 50-55 град. С раствору II добавляют 100 мл раствора I, перемешивают, разливают асептически в стерильные пробирки, среду охлаждают в наклонном положении для получения столбика и косяка. Готовая среда желтого цвета.

#### Ход исследования

Делают массивный посев по всей поверхности косяка. Инкубируют при 37 град. С. Производят учет через 2, 4, 6 часов и на следующий день. В отдельных случаях при отрицательных результатах наблюдают до 4-7 дней (возможны замедленные реакции). Положительный результат - красное окрашивание.

### 4. Среда для выявления декарбоксилаз аминокислот

#### Ингредиенты

Пептон - 5,0 г

Дрожжевой экстракт - 3,0 г

или

Аутолизат дрожжей - 12,0-15,0 мл

или

Диализат дрожжей - 12,0-15,0 мл

Глюкоза - 1,0 г

Бромтимоловый синий, 1,6% спиртовой раствор - 1,0 мл

Дистиллированная вода - 1000 мл

Приготовление. Основу среды делят на 3 части, к одной из них добавляют 1% L-лизина, ко второй части - 1% L-орнитина; третью часть используют как контрольную (без добавления аминокислот). При использовании DL-аминокислот их добавляют в концентрации 2%, так как энтеробактерии проявляют активность в отношении L-изомеров.

Все порции среды разливают по 2-3 мл в серологические пробирки. Стерилизуют при 0,5 атм. 30 минут. Готовая среда имеет светло - зеленый цвет.

#### Ход исследования

Посев производят минимальными дозами с косяка 16-18-часовой агаровой культуры в среды с аминокислотами и в контрольную среду. После посева во все пробирки вносят стерильное вазелиновое масло (слоем 4-5 мм) для получения более надежных и четких результатов.

Инкубируют при 37 град. С. Большинство положительных реакций у энтеробактерий выявляется на первые - вторые сутки, предельный срок наблюдения 4 суток.

При декарбоксилировании аминокислот, положительном результате, среда приобретает синий цвет за счет накопления щелочных продуктов. При отрицательном результате цвет среды желтый; в контрольной пробирке должна быть желтая окраска среды (в результате подкисления среды за счет ферментации глюкозы).

#### 5. Среда для определения фенилаланиндезаминазы

##### Ингредиенты

Дрожжевой экстракт - 3,0 г

L-фенилаланин - 1,0 г

или

DL-фенилаланин - 2,0 г

Натрий фосфорнокислый двузамещенный - 1,0 г

Натрий хлористый - 15,0 г

Агар-агар - 12,0 г

Дистиллированная вода - 1000,0 мл

Приготовление. Среду разливают по 3-4 мл в серологические пробирки, стерилизуют при 1 атм. 10 минут и скашивают обычным образом.

#### Ход исследования

Посев испытуемых культур производят массивной дозой, инкубируют при 37 град. С 20-24 часа. Для оценки результатов на поверхность выросшей культуры наносят 4-5 капель 10% раствора хлористого железа.

Положительная реакция - от интенсивного зеленого до светло - зеленого окрашивания косяка и свободной жидкости (характерна для представителей рода *Proteus*), отрицательная реакция - без изменения окраски.

#### 6. Среда Симмонса

##### Ингредиенты

Натрий - аммоний фосфорнокислый двузамещенный - 1,5 г

Магний сернокислый - 0,2 г

Калий фосфорнокислый однозамещенный - 1,0 г

Натрий лимоннокислый трехзамещенный - 3,0 г

Дистиллированная вода - до 1000,0 мл

Агар-агар - 20,0 г

1,5% спиртовой раствор бромтимолового - 10,0 мл

синего (индикатор)

Приготовление. Все соли растворяют сначала в небольшом объеме дистиллированной воды, соединяют с расплавленным предварительно в дистиллированной воде агар - агаром, доводят объем до 1000 мл, устанавливают pH 7,2.

Добавляют в соответствии с прописью раствор индикатора, который придает готовой среде зеленую окраску, фильтруют и разливают по 5-7 мл в пробирки. Стерилизуют при 1 атм. (120 град. С) - 15 минут. Скашивание среды производят таким образом, чтобы получить столбик высотой 2,5 см и скошенную поверхность (косяк) длиной 4 см. Это имеет значение для сроков учета результатов посева.

#### Ход исследования

Посев производят минимальной дозой культуры (16-18-часовой агаровой культуры или суспензии ее в изотоническом растворе хлористого натрия). Массивный посев может приводить к ложноположительным результатам. Инкубируют при 37 град. С. Учитывают через 18-20 часов, при отрицательных результатах - до 4 суток.

Положительный результат - рост культуры и изменение окраски среды в синий цвет (при индикаторе бромтимоловом синем).

#### 7. Среда Кларка

(для постановки тестов

с метиловым красным и Фогеса - Проскауэра)

#### Ингредиенты

Пептон - 5,0 г

Глюкоза - 5,0 г

Калий фосфорнокислый двузамещенный - 5,0 г

Дистиллированная вода - до 1000 мл

Приготовление. Все ингредиенты растворяют в небольшом количестве (80-100 мл) дистиллированной воды при подогревании на водяной бане в течение приблизительно 20 мин. Раствор охлаждают до 20 град. С, фильтруют, доводят дистиллированной водой объем до 1000 мл и разливают в бактериологические пробирки по 5 мл. Стерилизуют дробно, 3 дня подряд, текучим паром.

#### Ход исследования

Посев - обычным порядком, инкубируют при 37 град. С от 1 до 5 суток.

#### Среда Кларка

(для определения подвижности микробов)

Приготовление. К 100 мл жидкой среды Кларка добавляют 0,3 г агара и разливают в бактериологические пробирки по 5 мл. Стерилизуют дробно, 3 дня подряд, текучим паром.

#### Ход исследования



Посев проводят уколом в столбик 0,3% агара в пробирке. Подвижные микробы растут в толще среды по ходу укола.

#### Тест с метиловым красным

Принцип. Определение интенсивности кислотообразования за счет глюкозы.

Реактив. Раствор метилового красного (0,01 г метилового красного растворяют в 30,0 мл этилового спирта 96%, затем дистиллированной водой доводят до 50,0 мл).

Ход исследования. К 5 мл 3-5 суточной испытуемой культуры на среде Кларка добавляют 5 капель раствора метилового красного. Положительная реакция - красное окрашивание, при сдвиге pH в кислую зону ниже 6; отрицательная реакция - желтое окрашивание, при pH в зоне 6,0-7,0; слаболожительная реакция - красновато - оранжевый цвет.

#### Тест Фогеса - Проскауэра

Принцип. Определение ацетилметилкарбинола - ацетоина.

Реактив. 20% раствор едкого калия (KOH).

Ход исследования. К определенному объему суточной испытуемой культуры на среде Кларка добавляют такой же объем (аа) 20% раствора едкого калия. Встряхивают и помещают в термостат при 37 град. С, желательно в наклонном положении для большей аэрации. Учет проводят через 3-4 часа и на следующий день. Положительная реакция - оранжево - розовое окрашивание верхнего слоя жидкости; отрицательная реакция - неизменная окраска.

#### Модификация Баррита - (более чувствительная)

К 5 мл 1-3-суточной испытуемой культуры на среде Кларка добавляют 3 мл 5% альфа - нафтола в абсолютном спирте и 1 мл 40% KOH. В течение 5-15 мин. при положительном результате на поверхности жидкости появляется розовое или красное окрашивание.

### 8. Питательные среды, выпускаемые промышленностью

(см. раздел 3.2.)

#### Биохимические методы исследования

1. Системы индикаторные бумажные (СИБ) для межродовой дифференциации энтеробактерий (см. раздел 3.3.).

2. Системы индикаторные бумажные (СИБ) для полной идентификации энтеробактерий (до вида), (см. раздел 3.3.).

## 2.7. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ

### МИКРОБОВ РОДА ПСЕВДОМОНАС

(*Pseudomonas*)

Род *Pseudomonas* относится к семейству *Pseudomonadaceae*. Среди достаточно большого числа микроорганизмов, входящих в этот род, наибольшее значение для медицины и ветеринарии представляют виды *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка) и *P. mallei*.

Кроме того, сейчас все чаще можно выделить из различного патологического материала и другие псевдомонады, такие как *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. ceratiae*, которые являются возбудителями различных гнойных поражений. Инфекции, вызываемые представителями рода *Pseudomonas*, часто имеют госпитальный характер.

Характерной особенностью большинства штаммов, принадлежащих к данному роду, является положительный тест на образование цитохромоксидазы, а также образование различных пигментов (сине - зеленого, зеленовато - желтого, флюоресцирующего, фиолетового, красного и др.). В зависимости от условий роста и состава питательной среды пигменты образуются в различных количественных соотношениях, и поэтому окраска культуральной среды может меняться, иногда какой-либо из пигментов может утрачиваться совсем.

Все виды, входящие в этот род, каталазо - положительны, дают отрицательные реакции на индол, не реагируют с метиловым красным и не образуют ацетилметилкарбинола.

#### Ход микробиологического исследования

Первый день. При целенаправленном исследовании на псевдомонады в случае госпитальной вспышки инфекции, вызванной синегнойной палочкой, посев производят на селективную среду ЦПХ-агар бактериологической петлей или ватным тампоном. В случае исследования воздуха при определении обсемененности больничных помещений синегнойной палочкой седиментационным методом экспозиция открытых чашек с агаром составляет 2-3 часа.

Если исследование не является целенаправленным в отношении выявления псевдомонад, то посев производят на любую из общепринятых питательных сред: 1,5% питательный агар, 5% кровяной агар, агар Эндо. Все посевы инкубируют в термостате при 37 град. С в течение 18-24 часов.

Второй день. Засеянные накануне исследуемым материалом агаровые чашки просматривают и отмечают колонии, подлежащие дальнейшему изучению. Различают 5 морфологических типов колоний: 1) плоские колонии неправильной формы; 2) колонии, напоминающие кишечную палочку; 3) складчатые ("цветок маргаритки"); 4) слизистые, редко дающие пигментацию при первичном выделении, образующие слизистый налет, со временем приобретающий зеленую окраску; 5) карликовые, которые появляются только через 18 часов. На кровяном агаре вокруг колоний видны зоны гемолиза. Очень часто можно наблюдать феномен "радужного лизиса" культур, который характеризуется наличием нежного блестящего металлического налета и зон лизиса. На среде Эндо культуры синегнойной палочки образуют бледно - розовые колонии небольших размеров. Культуры синегнойной палочки образуют синий или зеленовато - синий или фиолетовый пигменты, проникающие в субстраты. Один из них - пиоцианин, дающий синюю или сине - зеленую окраску. Другой - флюоресцеин - дает зеленовато - желтое окрашивание, флюоресцирующее в проходящем свете в УФ-лучах.

Пиоцианин образуют только штаммы синегнойной палочки, другие представители рода *Pseudomonas* могут образовывать флюоресцеин.

При просмотре мазков, окрашенных по Граму, выявляются грамтрицательные палочки размером 1,5-3,0 x 0,4-0,6 мкм, располагающиеся одиночно, парами или короткими цепочками, не образующими спор, но продуцирующие слизь, окружающую микробную клетку тонким слоем.

Таким образом, уже на второй день можно идентифицировать примерно 75% выделенных культур синегнойной палочки по наличию роста на селективной среде, морфологии колоний, образованию сине - зеленого пигмента (пиоцианина) и специфическому запаху жасмина или земляничного мыла.

Беспигментные колонии, выросшие на селективной среде, и колонии, подозрительные на псевдомонады, с других сред исследуют на способность образовывать цитохромоксидазу. Для этого можно использовать индикаторные бумажки СИБ.

Исследуемую культуру наносят на смоченную физиологическим раствором индикаторную бумажку. При положительной реакции на месте нанесения культуры появляется синее окрашивание бумаги в течение 30 секунд.

Беспигментные колонии, давшие положительный цитохромоксидазный тест, отбирают и суспендируют в 0,5 мл физиологического раствора, а затем отсеивают на следующие питательные среды.

Среда Кинг А используется для усиления способности синегнойной палочки продуцировать сине - зеленый пигмент пиоцианин. Некоторые штаммы синегнойной палочки образуют на этой среде другой пигмент - пиорубин, дающий красное окрашивание.

Среда Хью-Лейфсена с глюкозой. Применяют для определения способности псевдомонад окислять глюкозу до глюконовой кислоты только в аэробных условиях. Посев производят уколом в 2 столбика агара, один из которых заливают 1 мл стерильного вазелинового масла. Посевы инкубируют в термостате в течение 18-24 часов при температуре 37 град. С. При положительной реакции происходит порозовение среды в столбике без вазелина, а при отсутствии роста в анаэробных условиях цвет среды не меняется.

Ацетамидный агар является дифференциальной средой для синегнойной палочки, поскольку она обладает способностью использовать ацетамид в качестве единственного источника азота и углерода.

2 косяка с питательным агаром для определения способности культур к росту при 42 град. С и 5 град. С.

Все засеянные среды инкубируют в течение 18-24 часов при температуре 37 град. С, кроме последних, которые ставят соответственно в термостат при 42 град. С и в холодильный шкаф.

Третий день. Просматривают результаты посевов второго дня. На среде Кинг А в случае высева синегнойной палочки вокруг выросших колоний можно видеть сине - зеленое окрашивание, однако, оно может и отсутствовать, если штамм не образует пиоцианина. Если данный микроорганизм принадлежит к роду *Pseudomonas*, то окисление глюкозы происходит только в аэробных условиях. Рост культур на ацетамидном агаре, способность культур расти при температуре 42 град. С и отсутствие роста при 5 град. С позволяет отнести выделенную культуру к виду *P. aeruginosa*. Если культура выросла на ацетамидном агаре, но не выросла при 42 град. С, то она принадлежит к виду *P. putida*. *P. fluorescens* характеризуется неспособностью утилизировать ацетамид и расти при 42 град. С, но хорошо растет при 5 град. С. Основные дифференциальные признаки флуоресцирующих псевдомонад приведены в табл. 15.

Таблица 15

Основные дифференцирующие признаки флуоресцирующих  
псевдомонад (*Pseudomonas*)

Тест или субстрат	Вид		
	<i>Ps. aeruginosa</i>	<i>Ps. fluorescens</i>	<i>Ps. putida</i>
1	2	3	4
Цитохромоксидаза	+	+	+

Пигмент пиоцианин	+	-	-
Флуоресценция	+	+	+
Глюкоза	+	+	+
Рост на ацетамидном агаре	+	-	+
Рост при 5 град. С	-	+	-
Рост при 42 град. С	+	-	-
Желатиназа	+	+	-

#### Типирование штаммов *P. aeruginosa*

1. Серологическое типирование культур *P. aeruginosa*. Этот метод используется, главным образом, для следующих целей: 1) выявления наличия или отсутствия штаммов синегнойной палочки преобладающих серологических типов; 2) обнаружения идентичности штаммов, выделенных от больных и из окружающей среды; 3) выявления доминирования штаммов специфических серотипов в определенный период времени. Серологическое типирование культур синегнойной палочки производят методом агглютинации на стекле с использованием набора, состоящего из поливалентных сывороток к 12 групповым О-антигенам или с 23 адсорбированными моноспецифическими сыворотками к 23 факторам О-антигена. Серологическое типирование культур - достаточно легко и четко воспроизводимый метод, и дифференциация с его помощью достаточно стабильна из-за моноспецифичности серологических типов.

2. Пиоцино- и фаготипирование клинических штаммов синегнойной палочки являются вспомогательными методами, позволяющими более детально дифференцировать эти культуры при проведении эпидемиологического анализа вспышек инфекции и изучения эпидобстановки в стационаре. Эти методы, однако, пока еще не нашли широкого распространения из-за отсутствия стандартных фагов и пиоцинов.

#### Питательные среды

##### 1. ЦПХ-агар

Принцип. К питательной основе добавляют 0,2% N-цетилпиридиния хлорида - катионного поверхностно-активного вещества, подавляющего рост 24 видов микроорганизмов, возможных ассоциантов псевдомонад в клиническом материале (особенно в отделяемом ран, мокроте, фекалиях).

#### Ингредиенты

Пептон ферментативный - 20,0 г

Калий сернокислый - 7,0 г

Магний хлористый - 1,5 г

Магний сернокислый - 1,5 г

N-цетилпиридиний хлорид - 2,0 г

Агар-агар - 10,0 г

Вода дистиллированная - 1000,0 мл

pH среды 6,8-7,0

Приготовление. Все ингредиенты смешивают, среду доводят до кипения, кипятят 2-3 минуты до расплавления агара и разливают в чашки Петри. Активность среды сохраняется в течение 1 месяца при хранении при 4 град. С.

## 2. Среда Кинг А

### Ингредиенты

Пептон - 20,0 г

Глицерин - 10,0 г

Калий сернокислый - 10,0 г

Магний хлористый - 1,4 г

Вода дистиллированная - 1000 мл

Агар - агар - 20,0 г

Приготовление. Все ингредиенты смешивают, кипятят до расплавления агар - агара, разливают во флаконы и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм. в течение 20 минут.

## 3. Среда Хью-Лейфсона (см. раздел 3.2.)

## 4. Среда с ацетамидом

### Ингредиенты

Натрий хлористый - 5,0 г

Магний сернокислый - 0,2 г

Аммоний фосфорнокислый однозамещенный - 1,0 г

Калий фосфорнокислый двузамещенный - 1,0 г

Ацетамид - 20,0 г

Агар-агар - 15,0 г

Вода дистиллированная - 1000 мл

pH среды 6,7-6,8

Приготовление. Все ингредиенты смешивают, кипятят до расплавления агар-агара, разливают во флаконы и стерилизуют в автоклаве при 1 атм.

20 минут.

## 5. Питательная желатина

### Ингредиенты

Питательный бульон - 100 мл

Желатина - 12,0 г

Натрий двууглекислый 10% раствор

pH 7,0

Приготовление. К 100 мл питательного бульона добавляют 12 г измельченной желатины. Ставят для набухания на 1 час при комнатной температуре, затем на водяную баню при температуре 40-45 град. С для растворения. С помощью 10% раствора натрия двууглекислого устанавливают pH 7,0. Стерилизуют при 0,5 атм. 20 мин.

Ход исследования. Исследуемую культуру петлей засевают уколом в столбик питательной желатины. Инкубируют при температуре 22 град. С в течение 30 дней с ежедневным наблюдением за ростом и наличием эффекта разжижения.

## 3. ОБЩИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

#### Окраска препаратов

#### Окраска метиленовым синим

Реактивы. 1% раствор метиленового синего (1 г метиленового синего растворяют в 100 мл холодной дистиллированной воды, фильтруют через бумажный фильтр).

Ход исследования. Материал наносят на чистые обезжиренные предметные стекла, растирают его тонким равномерным слоем по поверхности стекла, или на обезжиренное стекло наносят каплю воды, в которой суспендируют культуру. Препарат высушивают на воздухе и фиксируют погружением на 3 мин. в 96% этиловый спирт. Фиксированный препарат высушивают, затем наносят 1% раствор метиленового синего на 1-10 мин. (в зависимости от материала). Тщательно смывают оставшийся краситель струей холодной воды, высушивают. Смотрят с иммерсией: объектив x90 иммерсионный, окуляр x7 или x10.

Оценка результатов. Препарат синего цвета. Ядра клеток окрашены в синий цвет, протоплазма - в голубой цвет разной интенсивности. Бактериальная флора прокрашивается в синий цвет разной интенсивности.

### Окраска по Граму

Принцип. В зависимости от химической структуры бактерии обладают способностью удерживать краситель кристаллический фиолетовый или обесцвечиваться в спирте.

Реактивы.

1. Карболовый раствор кристаллического фиолетового. Растирают в ступке 1 г кристаллического фиолетового с 2 г фенола (карболовой кислоты) до кашицеобразной консистенции, прибавляют небольшими порциями 10 мл спирта и окончательно разводят 100 мл дистиллированной воды, сливают во флаконы, оставляют на сутки, затем фильтруют.

2. Раствор Люголя: йодистого калия 2 г растворяют в 300 мл дистиллированной воды, в полученном растворе растворяют 1 г кристаллического йода, фильтруют через бумажный фильтр.

3. Разведенный фуксин Циля. Растирают в ступке 1 г фуксина, прибавляют, растирая, 5 г фенола (карболовой кислоты) и 10 мл спирта 96%, затем при постоянном помешивании небольшими порциями доливают 100 мл дистиллированной воды. Раствор краски фильтруют через влажный бумажный фильтр. Фуксин Циля очень стойкий и может храниться долгое время во флаконе темного стекла с притертой пробкой. К 1 мл фуксина Циля добавляют 9 мл дистиллированной воды. Раствор очень нестойкий, поэтому его готовят непосредственно перед употреблением в необходимых количествах.

Ход исследования. На обезжиренное стекло наносят каплю воды, в которой суспендируют культуру. Препарат высушивают и фиксируют над пламенем горелки. На фиксированный мазок накладывают кусочек фильтровальной бумаги и на нее наливают карболовый раствор кристаллического фиолетового на 1/2-1 мин. Сливают краситель и, не смывая, наливают раствор Люголя приблизительно на 1 мин. до почернения мазка. Сливают раствор Люголя и прополаскивают препарат в спирте 96% в течение 1/2-1 мин., пока не перестанут стекать фиолетовые струйки красителя. Затем препарат промывают струей водопроводной воды и дополнительно докрашивают в течение 1/2-1 мин. водным раствором фуксина Циля. Краситель сливают, препарат промывают и высушивают.

Микроскопируют с иммерсией: объектив x90 иммерсионный, окуляр x7 или x10. Грамположительные микробы окрашиваются в сине - фиолетовый цвет, грамотрицательные - в розовый и красный.

При правильной окраске препарат оранжево - красного цвета на тонких участках, лилово - фиолетового на толстых. Высокое качество окраски обеспечивается своевременным прекращением обесцвечивания мазков. При недообесцвечивании мазков грамотрицательные бактерии могут сохранять фиолетовую окраску, а в переобесцвеченных мазках грамположительные микробы могут быть окрашены в оранжево - красный цвет.

### Окраска по Цилю - Нильсену

Принцип. Метод основан на способности микобактерий туберкулеза после окрашивания их фуксином удерживать краситель даже после длительного обесцвечивания в серной кислоте.

Реактивы.

1. 1% раствор основного фуксина. 1 г основного фуксина растирают с 2-3 каплями глицерина, добавляют по капле 10 мл 96% этилового спирта и 90 мл 5% раствора фенола. Раствор оставляют на сутки, затем фильтруют через бумажный фильтр. Хранят в темном месте при комнатной температуре в хорошо закрытой посуде.

2. 5% раствор фенола (карболовой кислоты).

3. 20% серная кислота.
4. Этиловый спирт 96%.
5. Соляная кислота, концентрированная.
6. 0,025% раствор метиленового синего, 0,25 г метиленового синего на 1 л дистиллированной воды.
7. 3% солянокислый спирт. 3 мл концентрированной соляной кислоты доводят до 100 мл этиловым спиртом.
8. Глицерин.

Ход исследования. Материал готовят путем растирания его между двумя стеклами или на обезжиренное стекло наносят осадок исследуемого материала. Препарат высушивают и фиксируют над пламенем горелки.

Окрашивание мазка. На фиксированный препарат накладывают полоску фильтровальной бумаги размером немного меньше предметного стекла, но так, чтобы она закрывала мазок полностью. Наливают на нее раствор карболового фуксина, и нагревают препарат над пламенем горелки до появления паров. Остудив препарат, снимают пинцетом бумажку и смывают остатки краски водой. Мазок обесцвечивают в 20% серной кислоте или в 3% солянокислом спирте до слегка розовато - сероватого цвета и тщательно промывают водой. Обесцвеченный мазок подкрашивают в течение 30 секунд 0,025% раствором метиленового синего. Микроскопируют с иммерсией.

Микобактерии туберкулеза окрашиваются в красный цвет, а другие микробы и клеточные элементы - в голубой.

#### Окраска по Романовскому

Принцип. Окраска позволяет выявить ядерные элементы и волютиновые гранулы бактериальной клетки за счет сродства к основным краскам.

Реактивы.

1. Краситель Гимзы (готовый реактив).
2. Метиловый спирт или смесь Никифорова (смесь равных объемов этилового спирта и эфира этилового).
3. Дистиллированная вода, pH 7,2.

Ход исследования. Препарат фиксируют метиловым спиртом (смесью Никифорова) 5 мин. Высушивают на воздухе и окрашивают рабочим раствором красителя Гимзы (2 капли на 1 мл дистиллированной воды, имеющей pH 7,2), 20 мин. Промывают дистиллированной водой и после просушивания микроскопируют.

При микроскопировании ядерные элементы имеют красно - фиолетовый цвет, цитоплазма - слабо - розовый. В более молодых культурах цитоплазма окрашивается в сине - фиолетовый цвет. У бактерийных палочек ядра окрашены в темный красно - фиолетовый цвет, волютин - в вишнево - красный.

### 3.2. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ

(питательные среды)

Питательные среды, выпускаемые промышленностью



Питательный агар - изготовитель

Дагестанский

НИИПС (гор.

Махачкала)

Питательный бульон -"-

Агар Эндо -"-

Агар с эозин - метиленовым синим (ЭМС-агар) -"-

Бакто - агар Плоскирева -"-

Висмут - сульфит агар -"-

Среда с индикатором ВР и одним из углеводов -"-

(глюкозой, лактозой, мальтозой, сахарозой

или маннитом)

Тиамин - цистин глутаминовый агар -"-

Среда для определения чувствительности -"-

к антибиотикам (АГВ)

Агар цитратный Кристенсена -"-

Агар цитратный Симмонса -"-

Среда Рессаля -"-

Агар ацетатный - изготовитель

МНИИВС им.

Мечникова

(гор. Петрово -

Дальнее) .

Агар элективный солевой для стафилококков -"-

"Среда для контроля стерильности" -"-

Среда Клиглера -"-

Питательные среды, приготовляемые  
в бактериологических лабораториях

Кровяной агар. Приготовление среды. В качестве основы используют сухой питательный агар. По прописи, указанной на этикетке, готовят 2% агар, pH 7,4-7,6. К расплавленному и охлажденному до 45 град. С агару, соблюдая правила асептики, добавляют 5% (5 мл крови на 100 мл питательной среды) дефибринированной бараньей, лошадиной или кроличьей крови, цитратной или дефибринированной крови человека без антибактериальных препаратов. Смесь тщательно перемешивают, чтобы не образовалось пены, и разливают в стерильные чашки Петри, предварительно подогретые в термостате, слоем 3-4 мм. Слой агара должен быть равномерно окрашен в красный цвет. Хранят не более двух недель в целлофановых мешках при 4 град.-6 град. С.

#### Агар с гретой кровью (шоколадный агар)

Принцип. Прогревание крови способствует освобождению из эритроцитов факторов роста X (гемин) и V (никотинамидадениндинуклеотид), необходимых для культивирования гемофилов.

Приготовление. 1. К 100 мл расплавленного и охлажденного до 80 град. С питательного агара, pH 7,4, добавляют 10 мл дефибринированной крови лошади или человека (без консервантов), тщательно перемешивают, после чего помещают в водяную баню и, постоянно встряхивая, держат при температуре 70 град. С - 80 град. С до тех пор, пока цвет агара не станет шоколадным (25-30 мин.).

2. 5 мл дефибринированной крови кролика и 100 мл питательного агара тщательно взбалтывают и ставят на 2-3 минуты в водяную баню при 80 град. С. Затем добавляют еще 5 мл крови и вновь ставят в водяную баню на 2-3 минуты. При приготовлении шоколадного агара следует обратить внимание на правильный прогрев, при слишком слабом прогреве агар будет иметь коричнево - красный цвет, при слишком сильном - темно - коричневый. Шоколадный агар должен иметь светло - коричневую окраску. Среду разливают в чашки Петри. Хранят не более двух недель в целлофановых мешках при 4 град.-6 град. С.

#### Сахарный бульон

Приготовление среды. К 100 мл питательного бульона, pH 7,2-7,4, прибавляют 1 г глюкозы. Стерилизуют текущим паром 3 дня подряд по 30 минут или при 0,5 атм. 30 минут.

#### Сывороточный бульон

Приготовление среды. К 80 мл стерильного питательного бульона, pH 7,2-7,4, стерильно добавляют 20 мл лошадиной или бычьей сыворотки. Среду разливают в пробирки по 5 мл, выдерживают 2 суток в термостате для контроля стерильности, а затем хранят в холодильнике.

#### Сывороточный агар

Приготовление среды. В качестве основы используют 1,5% агар, pH 7,4, тиамин - цистин - глутаминовый; для коринебактерий - питательный агар, pH 7,6. К 90 мл расплавленного и остуженного до температуры 50 град. С агара добавляют 10 мл инаktivированной при температуре 56 град. С в течение 30 минут сыворотки, консервированной хлороформом, или без консерванта. После перемешивания среду разливают в чашки. Среда годна к употреблению только в течение 48 часов при хранении ее в холодильнике. Перед посевом чашки, хранившиеся в холодильнике, должны быть подогреты до температуры 37 град. С.

### Среда Тароцци

Приготовление среды. Нежирное мясо или печень (можно плаценту) нарезают мелкими кусочками и заливают трехкратным количеством питательного бульона, pH 7,4-7,6. Кипятят 30 минут. Затем бульон фильтруют, а кусочки мяса или печени промывают на сите водопроводной водой и просушивают фильтровальной бумагой. Распределяют во флаконы по 15-20 г (8-10 кусочков) и в пробирки по 2-3 кусочка печени или мяса и заливают по 300 мл бульона во флаконы и по 5-6 мл в пробирки. Стерилизуют 30 мин. при 1 атм.

### Желточно-солевой агар

Приготовление среды. В качестве основы используют селективный солевой агар для стафилококков. По прописи, указанной на этикетке, готовят 1,8-2% агар, pH 7,2-7,4. К расплавленному и охлажденному до 45 град. - 50 град. С агару, соблюдая правила асептики, добавляют 20% желточной взвеси (асептически извлеченный из яйца желток взбалтывают с 200 мл изотонического раствора хлорида натрия). Смешивают тщательно агар с желточной взвесью, разливают по 20 мл в чашки Петри. Хранят в холодильнике в течение двух недель.

### Среда Хью-Лейфсона

Принцип. Среда позволяет уловить изменения pH даже при слабом окислении углеводов, что достигается заменой аминокислот питательной среды пептоном. В этой среде отсутствуют щелочные продукты расщепления аминокислот, которые могут нейтрализовать кислые продукты при утилизации углеводов.

### Ингредиенты

Пептон - 2,0 г

Натрий хлористый - 5,0 г

Калий фосфорнокислый двузамещенный ( $K_2HPO_4$ ) - 0,3 г

Глюкоза - 10,0 г

Агар - 3,0 г

Бромтимоловый синий - 0,03 г

Дистиллированная вода - 1000,0 мл

Приготовление среды. К воде прибавляют пептон, натрий хлористый и агар. Смесь подогревают до расплавления агара. Затем добавляют калий фосфорнокислый двузамещенный и глюкозу. Продолжают кипятить 2-3 минуты. Смесь подщелачивают 20% раствором едкого натра до pH 7,4-7,5, доводят объем среды до первоначального и добавляют 3 мл 1% водного раствора бромтимолового синего. Среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают по 10-15 мл в стерильные пробирки. Стерилизуют при 0,5 атм. 20 минут. Цвет среды до стерилизации - синий, после автоклавирования - травянисто-зеленый, pH 7,1-7,2. При кислом pH среда желтеет.

### Среда Сабуро

Приготовление. На 1 л дистиллированной воды 10,0 г пептона, 18,0 г агар - агара. Нагревают до расплавления агара, добавляют 40,0 г глюкозы, pH 5,8, стерилизуют при 0,5 атм. (116 град. С) 30 минут.

### Селенитовый бульон

Среда обогащения - для накопления сальмонелл и шигелл.

### Ингредиенты

Натрий селенистокислый кислый ( $\text{NaHSeO}_3$ ) - 4 г

Пептон (чешский "Спофа" или венгерский "Рихтер") - 5 г

Натрий фосфорнокислый двузамещенный ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) - 7 г

Натрий фосфорнокислый однозамещенный ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) - 3 г

Лактоза - 4 г

Приготовление. 1. Основной питательный раствор включает пептона - 5 г, натрия фосфорнокислого двузамещенного - 7 г, натрия фосфорнокислого однозамещенного - 3 г, лактозы - 4 г, дистиллированной воды - 1000 мл, pH раствора 6,9-7,1. Стерилизуют текучим паром два дня подряд по 30 мин. Срок хранения при 4-6 град. С в течение 1-2 месяцев.

2. 10% раствор кислого селенистокислого натрия готовят на стерильной дистиллированной воде extempore. Раствор селенита стерилизации не подлежит.

Для получения готовой среды (extempore) 2 мл 10% раствора кислого селенистокислого натрия добавляют к 50 мл основного раствора. Приготовленную среду по 5 мл асептически разливают в стерильные пробирки с хорошо подогнанными пробками. Стерилизацию готовой среды не производят.

### 3.3. БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Готовые наборы, выпускаемые промышленностью

1. Системы индикаторные бумажные (СИБ) для ускоренной идентификации вибрионов. (12 наименований: глюкоза, лактоза, сахароза, арабиноза, маннит, инозит, лизин, орнитин, аргинин, оксидаза, уреаза, индол). Набор N 50 и 100.

2. Системы индикаторные бумажные (СИБ) для межродовой дифференциации энтеробактерий (9 наименований: лактоза, бета - галактозидаза, цитрат натрия, индол, мочевины, фенил - аланин, сероводород, лизин, малонат натрия). Набор N 50 и 100.

3. Системы индикаторные бумажные (СИБ) для полной идентификации энтеробактерий до вида (25 наименований: глюкоза, лактоза, сахароза, арабиноза, маннит, инозит, рамноза, ксилоза, мальтоза, сорбит, адонит, салицин, дульцит, индол, уреазы, оксидазы, бета - галактозидаза, лизин, орнитин, сероводород, фенил - аланин, утилизация малоната натрия, цитрата натрия, желатиназы). Набор N 25 и 100.

#### Тест на каталазу

Принцип. Метод основан на способности микроорганизмов, имеющих фермент каталазу, расщеплять перекись водорода, образуя воду и газообразный кислород.

Реактивы. 3-10% раствор перекиси водорода.

Ход исследования. На предметное стекло наносят каплю 10% перекиси водорода, в нее вносят стеклянной палочкой культуру и растирают круговыми движениями. При положительной реакции происходит пенообразование.

#### Цитохромоксидазный тест

Принцип. Метод основан на способности микроорганизмов, образующих фермент цитохромоксидазу, изменять цвет реактива из бесцветного в синий.

Реактивы.

1. 1% водный раствор диметил-пара-фенилендиамин гидрохлорид.

2. 1% спиртовой раствор альфа-нафтола.

Ход исследования. Приготовить смесь, состоящую из 3-х частей 1% водного раствора диметил-пара-фенилендиамина гидрохлорида и 2-х частей 1% спиртового раствора альфа-нафтола.

Приготовленную смесь нанести каплями на выросшие на чашке колонии. Микроорганизмы, образующие фермент цитохромоксидазу, в течение 20-30 секунд окрашиваются в темно-синий цвет.

Суточную агаровую культуру наносят в виде штриха платиновой петлей или стеклянной палочкой на диски или полоски фильтровальной бумаги (длиной 3 мм), пропитанные указанным реактивом. При положительной реакции появляется синее окрашивание в течение 30 секунд.

Начальник

Главного управления

лечебно - профилактической помощи

А.М.МОСКВИЧЕВ

Приложение N 2  
к приказу Министерства  
здравоохранения СССР  
от 22 апреля 1985 г. N 535

### ЗАДАНИЕ

НА РАЗРАБОТКУ СУХИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД, ТЕСТ - НАБОРОВ,  
АГГЛЮТИНИРУЮЩИХ СЫВОРОТОК ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ,  
ВЫЗВАННЫХ УСЛОВНО - ПАТОГЕННЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ

1. Питательные среды.
  - 1.1. Селективный агар для выделения условно - патогенных возбудителей раневой инфекции.
  - 1.2. Селективная среда для выделения пневмококков.
  - 1.3. Селективная среда для выделения стрептококков.
  - 1.4. Селективная среда для выделения синегнойной палочки.
  - 1.5. Расширенный набор сухих питательных сред для идентификации энтеробактерий.
    - 1.5.1. Малонат агар.
    - 1.5.2. Фенилаланин агар.
    - 1.5.3. Среда Кларка.
  - 1.6. Сухая среда для выделения гемокультур и культивирования стрептококков.
  - 1.7. Среда для выделения и культивирования анаэробов (клостридий).
  - 1.8. Среда для выделения неспорообразующих анаэробов (бактероидов).
2. Тест - системы идентификации по типу систем индикаторных бумажных (СИБ).
  - 2.1. Семейство стрептококковых (*Streptococcaceae*).
  - 2.2. Неферментирующие бактерии.
3. Диагностические сыворотки.

3.1. Агглютинирующие сыворотки.

3.1.1. Для идентификации бактерий рода гемофилус (*Haemophilus*).

3.1.2. Для идентификации бактерий рода клебсиелла (*Klebsiella*).

3.1.3. Для идентификации бактерий рода провиденция (*Providenciae*).

3.1.4. Для идентификации бактерий рода стрептококков *S. pneumoniae*.

3.2. Преципитирующие сыворотки.

3.2.1. Сыворотки стафилококковые энтеротоксические.