МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

**ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет**

**им. Н.И. Лобачевского»**

**Копылова Г.Е.**

**Кравченко Г.А.**

**ЧАСТНАЯ (МЕДИЦИНСКАЯ) МИКРОБИОЛОГИЯ**

Учебно-методическое пособие

Рекомендовано методической комиссией института биологии и биомедицины

для студентов высших учебных заведений, обучающихся

по направлению подготовки 06.03.01 "Биология"

Нижний Новгород

2015

УДК 579.63

 ББК Е4 Р121.5

 К 15

К 15 Копылова Г.Е., Кравченко Г.А. ЧАСТНАЯ (МЕДИЦИНСКАЯ) МИКРОБИОЛОГИЯ: Учебно-методическое пособие – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2015 – 46 с.

 Рецензент: зав.лаб., доц., д.б.н. И.В. Соловьева

В учебно-методическом пособии освещены задачи частной, медицинской микробиологии, а также подробно представлены ее методы. Дана характеристика показательных микроорганизмов.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов института биологии и биомедицины, специализирующихся на кафедре молекулярной биологии и биомедицины, обучающихся по направление подготовки: 06.03.01 "Биология" и проходящих занятия в рамках спецкурса «Современные проблемы прикладной микробиологии» и спецпрактикума.

Ответственный за выпуск:

председатель методической комиссии института биологии и биомедицины ННГУ, д.п.н., профессор **И.М. Швец**

УДК 579.63

ББК Е4

**© Нижегородский государственный**

**университет им. Н.И. Лобачевского, 2015**

ОГЛАВЛЕНИЕ

**ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

**Патогенные кокки**

Возбудители стафилококковых инфекций

Морфологические и культурально-биохимические свойства

Устойчивость к факторам внешней среды

Антигены стафилококков

*Внутривидовое разнообразие стафилококков*

Факторы патогенности стафилококков

Лабораторная диагностика

Лабораторные диагностические тесты

Диагностические питательные среды для выделения и изучения

стафилококков

**Кишечные инфекции**

*Семейство кишечных бактерий*

Микробиологическая диагностика кишечных инфекций

*Микробиологическая диагностика коли-энтеритов*

Схема бактериологической диагностики коли-энтеритов

*Микробиологический диагноз бактериальной дизентерии*

*(шигеллеза)*

Лабораторная диагностика

Среды для выделения, культивирования, дифференциации и идентификации энтеробактерий

**Тифо-паратифозная группа бактерий**

Возбудители брюшного тифа и паратифов А и В

Лабораторная диагностика

*Молекулярно-генетические методы типирования изолированных штаммов сальмонелл*

**Контрольные вопросы**

**Список литературы**

 Предметом изучения медицинской микробиологии являются болезнетворные (патогенные) и условно-патогенные для человека микроорганизмы, а также разработка методов микробиологической диагностики, специфической профилактики и этиотропного лечения вызываемых ими инфекционных заболеваний.

 Выделяют шесть основных групп возбудителей инфекционных заболеваний человека:

Прионы (от англ. prion – Protein infection, Proteinaceous infectious (particle) – белковая инфекционная частица – новый класс инфекционных агентов;

Вирусы;

Бактерии;

Грибы;

Паразитические простейшие;

Паразитические черви (гельминты).

**ВОЗБУДИТЕЛИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

**Патогенные кокки**

 К патогенным коккам относятся стафилококки, стрептококки, пневмококки, менингококки, гонококки. Все они обладают способностью вызывать у человека воспалительные процессы, сопровождающиеся образованием гноя. Поэтому они называются гноеродными или пиогенными кокками.

 Среди патогенных кокков менингококки и гонококки являются наиболее выраженными паразитами человека, они не могут длительно сохраняться вне организма и в естественных условиях не вызывают заболеваний у животных.

 Степень органотропности у патогенных кокков выражена неодинаково. Она наиболее резко проявляется у пневмококков, менингококков и гонококков и менее выражена у стафилококков и стрептококков.

 Стафилококки и стрептококки обладают полиморфизмом. Не имея специфической локализации в организме, они вызывают воспалительные процессы кожи, подкожной клетчатки и слизистых (фурункулы, карбункулы, абсцессы, дерматиты, панариции, конъюктивиты), костной системы (остеомиелиты), внутренних органов (пневмонии, аппендициты, холециститы, менингиты), воспаление брюшины, а также сепсис. Стафилококки и стрептококки являются причиной послеоперационных осложнений. Стрептококки – возбудители подострого септического эндокардита, рожи, скарлатины, ревматизма.

 Большинство заболеваний, вызываемых патогенными кокками не контагиозны. Эпидемически распространяются скарлатина, рожа, менингит, гонорея. Источником инфекции являются здоровые носители и больные люди. Механизм передачи разнообразен, но в основном капельный. Исключение составляет гонорея, передающаяся половым путем. Восприимчивость людей к кокковым заболеваниям неодинакова. Иммунитет отсутствует лишь к гонорее.

Грамположительные кокки широко распространены в природе. В естественных условиях встречаются сапрофитные виды, не отличающиеся от патогенных кокков по своей морфологии.

Возбудители стафилококковых инфекций

 Стафилококки открыты Л. Пастером в 1880 г. Стафилококки принадлежат к порядку Bacillales, семейству Staphylococcaceae, роду Staphylococcus. В настоящее время выделяют следующие виды стафилококка: S. aureus, S. capitis, S. еpidermidis, S. haemolyticus, S. hominis, S. lugdunensis, S. saprophyticus, S. warneri, S. xylosus и др.

 Из 19 видов Staphylococcus, представленных в руководстве Bergen (2004), только 3 вида связаны с организмом человека: S. aureus – стафилококк золотистый, S. еpidermidis (ранее названный S. albus) – стафилококк эпидермальный, S. saprophyticus – стафилококк сапрофитный. Заболевания, отличающиеся разнообразием клинических проявлений, вызывают золотистые, реже – эпидермальные и ещё реже – сапрофитные стафилококки.

Морфологические и культурально-биохимические свойства

 Стафилококки представляют собой клетки сферической формы диаметром 0,5-1,5 мкм, своим расположением в мазке напоминающие гроздья винограда, поскольку их деление происходит в трех взаимно перпендикулярных плоскостях. Иногда клетки могут располагаться поодиночке, попарно или в виде коротких цепочек. Они неподвижны и не образуют спор. Клеточная стенка представляет собой многослойную структуру толщиной 70-80 нм. В состав клеточной стенки входят пептидогликановый слой, покрывающий цитоплазматическую мембрану, и отрицательно заряженные полимеры – тейхоевые кислоты. Часть тейхоевых кислот ковалентно связана с пептидогликаном, а часть – с липидами цитоплазматической мембраны. У S. aureus эти полимеры состоят из рибитолфосфата – это так называемые рибитолтейхоевые кислоты, а у S. epidermidis – из молекул глицеролфосфата – это глицеролтейхоевые кислоты. У S. saprophyticus выделяют оба типа тейхоевых кислот. Клеточная стенка бывает покрыта полисахаридной капсулой.

 Стафилококки активно растут практически на всех искусственных средах, обычно образуя непрозрачные гладкие блестящие колонии. При выращивании на кровяном агаре, вокруг колоний патогенных стафилококков, продуцирующих гемолизины, образуется зона гемолиза. При культивировании в аэробных условиях стафилококки синтезируют пигменты на питательных средах с содержанием крови, молока, картофеля или углеводов. Цвет пигмента колоний может быть различен (белый, оранжевый, желтый, кремовый) у разных штаммов одного и того же вида, поэтому пигментообразование не является дифференциальным (видовым) признаком. В анаэробных условиях или в жидкой питательной среде пигмент не образуется.

 Стафилококки – факультативные анаэробы, каталазоположительные и оксидазонегативные, хорошо растут в присутствии кислорода, но легко переносят и отсутствие кислорода, а некоторые штаммы являются строгими анаэробами.

 Температурный оптимум роста 25-35°С, предпочтительна слабощелочная реакция среды. Стафилококки хорошо переносят повышенное осмотическое давление, поэтому селективной питательной средой для них может быть среда с высоким содержанием хлорида натрия (до 15%). Такую концентрацию соли другие бактерии не переносят, вследствие чего солевые среды являются элективными для стафилококков.

 Стафилококки являются хемоорганотрофами с окислительным и бродильным типами метаболизма. Они расщепляют многие углеводы в аэробных и анаэробных условиях. Дифференциально-диагностическое значение имеет тест на способность стафилококков сбраживать глюкозу и маннит в анаэробных условиях.

Устойчивость к факторам внешней среды

 Стафилококки устойчивы к действию света, к высушиванию, экстремальным температурам и химическим агентам. Они не погибают при 60°С в течение 1 часа, отдельные штаммы выдерживают 80°С на протяжении 30 минут. Большинство штаммов погибает при воздействии температурой 100°С в течение 5 минут.

 Стафилококки относительно устойчивы к действию фенола и этилового спирта (в 3% растворе фенола погибают через 30 минут, а в 50 % этиловом спирте – через 10 минут).

 Важнейшим свойством стафилококков является их выраженная приобретенная устойчивость к антибиотикам, контролируемая плазмидами. Большую роль в патологии человека играют метициллинорезистентные стафилококки, с которыми связывают эпидемические вспышки внутрибольничных инфекций.

 Антигены стафилококков

 Стафилококки обладают разнообразными антигенами, локализованными в основном в клеточной стенке, S. aureus имеет также капсульный антиген. Из компонентов клеточной стенки антигенами являются пептидогликан, белок А, расположенный снаружи пептидогликана. Наличие белка А характерно для S. aureus. Этот белок способен к неспецифическому соединению с Fc-фрагментами IgG, в связи с чем стафилококки, обладающие белком А, способны агглютинироваться нормальной человеческой сывороткой и давать неспецифическое свечение при обработке гетерологичными флюоресцирующими сыворотками. В настоящее время на этом феномене основан метод, применяемый для диагностики ранней инфекции.

 Капсульный антиген S. aureus имеет сложное строение. Он состоит из уроновых кислот, моносахаридов и аминокислот.

 У стафилококков описаны и видоспецифические антигены. Видоспецифичными АГ являются тейхоевые кислоты. Тейхоевые кислоты – это группа сложных соединений, состоящих из многоатомных спиртов, фосфата, сахаров, аминосахаров и аминокислот. Они обнаружены в клеточной стенке многих Грам+ бактерий, причем состав их варьирует в зависимости от вида бактерий. Так, в клеточной стенке S. aureus находится рибиттейхоевая кислота, S. epidermides – глицеринтейхоевая, у S. saprophyticus – выявляют оба типа кислот. Антитела к рибиттейховой кислоте в высоком титре обнаружены в сыворотке крови взрослых и детей с тяжелой стафилококковой инфекцией (эндокардит, септицемия, остеомиелит). Определение уровня антител к рибиттейхоевой кислоте является надежным и специфическим методом серологической диагностики.

 Антигенными свойствами обладают также внеклеточные ферменты: нуклеаза, каталаза, протеаза, плазмокоагулаза и другие. По наличию коагулазы все стафилококки разделяют на две группы; среди патогенных видов коагулаза-положителен лишь S. aureus; остальные виды называют коагулаза-отрицательными. Этот признак, как и ряд других, имеет диагностическое значение (табл. 1).

 Стафилококки подразделяются на коагулазоположительные и коагулазоотрицательные. Коагулазоположительные стафилококки наиболее вирулентны; кроме того, способность S. aureus вырабатывать коагулазу – один из основных дифференциальных признаков этого вида. На основании различий в антигенном составе выделяют 10 серотипов коагулазоположительных стафилококков.

 Один из вариантов внутривидовой гетерогенности стафилококков – фаговары. Установлено, что специфические бактериофаги реагируют с 60 % коагулазоположительных стафилококков. Поскольку этот процесс специфический, он используется для маркировки штаммов стафилококков. Для удобства бактериофагам присвоены определенные номера, и штаммы стафилококка, лизирующиеся определенным фагом, имеют номер этого фага и обозначаются как соответствующий фаговар. Это касается только штаммов S. auresus. Большинство других стафилококков относятся к нетипирующимся фаготипам. Фаготипирование используется в эпидемиологических целях для выявления источника инфекции, так как фаги высокоспецифичны. В случаях внутрибольничных инфекций данным методом можно точно выявить носителя патогенного штамма.

Таблица 1

Дифференциальные признаки стафилококков,

имеющих основное медицинское значение

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Признак | S. aureus | S. epidermidis | S. saprophyticus |
| Наличие пигментаСпособность к росту в анаэробных условияхРост на средах с 10 % NaClРост при:15°С 45°СОбразование кислоты при ферментации углеводов в аэробных условиях:ксилозаарабинозараффинозасахарозаманнитманнозатрегалозалактозагалактозафруктозаксилитВосстановление нитратовЩелочная фосфатазаГиалуронидазаУрезаКоагулаза (на сыворотке кролика)ФибринолизинГемолитическая активностьДНК-азаЧувствительность к новобиоцину | ±++++–––+++++++–+++±+±+++ | –+±–+–––+–±–±±+–++±+–±––+ | +±++±–––+±–+±–+±––+–––– |

*Внутривидовое разнообразие стафилококков*

Факторы патогенности стафилококков

 Основной фактор, определяющий патогенность стафилококков – это их способность образовывать ферменты и токсины.

 Стафилококки образуют разнообразные внеклеточные ферменты: плазмокоагулазу, гиалуронидазу, протеазы, эстеразы, лизоцим, фосфатазу, эндонуклеазы, активно гидролизируют желатин, восстанавливают нитраты. Патогенные стафилококки обладают способностью продуцировать токсины, которые характеризуются летальным, гемолитическим и дермонекротическим действием, отличаются друг от друга по механизму действия. К ним относятся мембраноповреждающие токсины или мембранотоксины. Они образуют каналы в цитоплазматической мембране эритроцитов, лейкоцитов и других клеток, что приводит к нарушению осмотического давления и лизису соответствующих клеток. Ранее их называли гемолизинами, полагая, что они лизируют только эритроциты. Мембранотоксины отличаются друг от друга по антигенным свойствам «мишени» и другим признакам. α-токсин (α-гемолизин) ингибирует миграцию как полиморфноядерных лейкоцитов, так и моноцитов (вызывает лизис эритроцитов и моноцитов), обладает дермонекротическим и кардиотоксическим действием. Он представляет собой белок с выраженными иммуногенными свойствами. Из него получен анатоксин, использующийся для лечения и профилактики стафилококковых заболеваний.

 β-гемолизин (β-токсин) – наряду с мембраноповреждающим действием на эритроциты угнетает хемотаксис полиморфноядерных лейкоцитов.

 γ –гемолизин (γ-токсин) – разрушает эритроциты, лейкоциты и клетки соединительной ткани.

 Способность некоторых стафилококков вызывать пищевые отравления связана с образованием энтеротоксинов. Известно 6 энтеротоксинов, различающихся по антигенным свойствам.

 Лейкоцидин – экзотоксин, вызывает лизис клеточных мембран, а также лизис моноцитов и гранулоцитов.

 В патогенном действии стафилококков значительная роль принадлежит внеклеточным ферментам. Наличие коагулазы, свертывающей плазму крови, является важным и постоянным критерием патогенности стафилококков. Большие концентрации коагулазы, циркулирующие в организме больного, приводят к понижению свертываемости крови, нарушению гемодинамики, прогрессирующему кислородному голоданию тканей. Образуемый стафилококками фибринолизин растворяет фибрин, ограничивающий местный воспалительный очаг, чем приводит к генерализации инфекции.

 Важное свойство стафилококков – способность синтезировать гиалуронидазу, субстратом действия которой является гиалуроновая кислота, скрепляющая элементы соединительной ткани. Благодаря действию этого фермента стафилококки расщепляют гиалуроновую кислоту и легко проникают вглубь тканей.

 Плазмокоагулаза вызывает свертывание плазмы крови. Стафилококки, продуцирующие этот фермент, покрываются фибриновым чехлом, защищающим их от фагоцитоза.

 Лецитиназа разрушает лецитин в составе клеточных мембран лейкоцитов и других клеток, что способствует лейкопении.

 Определенную роль в проявлении патогенных свойств стафилококков играет белок А. Его способность неспецифически реагировать с Fc-фрагментом иммуноглобулинов приводит к образованию комплекса белок A-YgG. Этот комплекс инактивирует комплемент, что в свою очередь ослабляет фагоцитарную реакцию. Взаимодействие белка А с комплементом вызывает повреждение тромбоцитов.

 Важным фактором вирулентности стафилококков (особенно при формировании хронических форм инфекции) является способность продуцировать биопленку, которая облегчает адгезию и формирование микроколоний микроорганизмов на слизистых оболочках и раневой поверхности. Биопленка представляет собой экзополисахаридный матрикс, продуцируемый стафилококками, внутри которого возбудитель очень устойчив к воздействию иммунной системы и факторов окружающей среды. Заболевания, вызванные микроорганизмами, продуцирующими биопленку, трудно поддаются лечению (в том числе антибиотикотерапии) и чаще всего требуют оперативного вмешательства. Нередко стафилококковая инфекция задерживается на стадии колонизации. Однако механизмы, при помощи которых одни люди колонизируются стафилококком, т.е. становятся носителями, а другие нет – не ясны. Далеко не всегда стафилококковый процесс ограничивается колонизацией. Возбудитель стремится расширить очаг поражения для увеличения своей популяции.

Лабораторная диагностика

 Материалом для исследования при лабораторной диагностике стафилококковой инфекции служат гной, кровь, отделяемое слизистых оболочек, моча, промывные воды желудка, фекалии, пищевые продукты (рис. 1).

 Изучение выделенной чистой культуры имеет задачей прежде всего дифференциацию патогенного стафилококка от сапрофитных, которые вследствие их большой распространенности могут обсеменить исследуемый материал.

Лабораторные диагностические тесты

 Для суждения о видовой принадлежности стафилококков исследуемую культуру, выращенную на среде первичного посева, исследуют на наличие комплекса признаков, свойственных патогенным стафилококкам.

1. Для подтверждения принадлежности культуры к роду Staphylococcus ставят реакцию на каталазу на стекле.

Тест на каталазу.

Каталаза (греч. кatalysis - разрушение) – фермент, способствующий расщеплению перекиси водорода на воду и молекулярный кислород.

2Н2О2 → 2Н2О + О2

Тест основан на том, что с первых же секунд контакта перекиси водорода с каталазой начинается её расщепление, сопровождающееся выделением пузырьков кислорода. Каталазную активность определяют при нейтральном значении рН в условиях комнатной температуры.

На чистое, хорошо обезжиренное предметное стекло наносят каплю 3 % раствора перекиси водорода и эмульгируют в ней 1 каплю исследуемой культуры.

При наличии каталазы в микробной культуре в капле раствора перекиси водорода на предметном стекле в первые 2-3 секунды появляются пузырьки кислорода. Независимо от интенсивности газообразования (бурное или умеренное) реакция учитывается как положительная. Появление единичных пузырьков или наступление газообразования в более поздние сроки (13-15 сек.) расценивается как реакция сомнительная, требующая повторной постановки. Отсутствие газообразования или появление одиночных пузырьков газа через продолжительное время после добавления реактива определяется как реакция отрицательная. Для получения более быстрого результата, позволяющего ориентировочно отличить культуру стафилококка от каталазоположительных микрококков, отсевают культуру на кровяной агар (КА). Микрококки никогда не образуют зон гемолиза в отличие от большинства штаммов стафилококка, особенно S. aureus.

1. При положительной реакции на каталазу, культуру отсевают на среду Хью-Лейфсона с глюкозой для выявления ферментации в анаэробных условиях.

Испытуемую культуру засевают уколом в 2 пробирки со средой; содержимое одной из них заливают стерильным вазелиновым маслом слоем 1 см. Инкубируют при 37°С 72 часа до изменения цвета среды хотя бы в одной пробирке. При окислении углевода в пробирке под маслом, без доступа кислорода, цвет среды остается зеленым, без масла – становится желтым. При ферментации в пробирке под маслом и в пробирке без масла цвет становится желтым. В случае отсутствия разложения углевода в обеих пробирках сохраняется первоначальный сине-зеленый цвет.

На основании этого теста патогенные стафилококки дифференцируют от сходных по морфологии сапрофитных стафилококков (S. aureus не расщепляет глюкозу).



Рис. 1. Схема микробиологического исследования при стафилококковых инфекциях

1. Реакция плазмокоагуляции

Тест на плазмокоагуляцию применяется для внутривидовой дифференциации стафилококков. Является одним из наиболее достоверных признаков патогенности.

Тест основан на свертывании плазмы в результате продукции плазмокоагулирующим возбудителем тромбиноподобного вещества. Известны две формы плазмокоагулазы:

– связанная с клеточной стенкой микроорганизма;

– находящаяся в клетке в свободном виде.

Свободная коагулаза действует на протромбин, способствуя образованию тромбиноподобного продукта, который, вступая во взаимодействие с фибриногеном, образует сгусток фибрина. Тест определения свободной коагулазы воспроизводится пробирочным методом.

Для постановки теста необходимо иметь коммерческую сухую плазму крови кролика с цитратом натрия. Перед употреблением сухую плазму крови необходимо растворить в стерильном физрастворе из расчета 1 мл на ампулу и сделать разведение 1:5 (1 мл плазмы + 4 мл физраствора).

Постановка реакции: в стерильную пробирку с 0,5 мл разведенной кроличьей плазмы вносят колонию (или петлю) испытуемого штамма стафилококка. Контролем служит пробирка с плазмой, но без культуры. Пробирки инкубируют в термостате при 37°С до 24 часов. Результат оценивают через 1, 2, 4 часа. Реакция считается положительной, когда образуется сгусток (или желеобразная масса), который не разрушается при легком встряхивании. Время наступления плазмокоагуляции соответствует уровню ферментативной активности микробов. Если разжижение сгустка происходит в более поздние сроки, то судят о наличии фибринолизина.

Если в течение первых 4 часов сгусток не образовался, посевы оставляют в термостате на 24 часа для окончательного учета результатов реакции.

Если первичный посев материала был сделан только на кровяной агар, культуру пересевают на среду, содержащую яичный желток, для выявления лецитиназы (лецитовителлазы). О присутствии лецитиназы судят по появлению четко выраженной зоны помутнения с радужным венчиком по периферии вокруг колоний стафилококка, продуцирующих лецитиназу. При отсутствии плазмокоагулазы, но при наличии пигмента и /или лецитиназы для идентификации S. aureus необходимо поставить дополнительные тесты, которые помогают судить о видовой принадлежности и являются признаками патогенности. Это тест на определение ДНК-азной активности и ферментацию маннита в анаэробных условиях путем посева на среду Хью-Лейфсона с маннитом.

Определение ДНК-азной активности стафилококков

В расплавленный МПА добавляют ДНК из расчета 1 мг на 1 мл агара. Навеску ДНК предварительно растворяют в 3-5 мл дистиллированной воды, подщелоченной 4-5 каплями 2М раствора гидроксида натрия (NaOH). В расплавленный МПА добавляют растворенную навеску ДНК, перемешивают и прогревают в кипящей водяной бане 20 мин. Для постановки теста перед разливкой в чашки Петри добавляют по 0,5 мл стерильного фармакопейного 10 % раствора хлорида кальция (CaCl2). [0,08 мл СаCl2 на 1 мл среды]. Испытуемые культуры засевают штрихами или бляшками и инкубируют сутки при 37°С. Через 24 часа на поверхность агара с культурами наливают 0,1 н раствор HCl на 3-5 мин.

При наличии ДНКазы вокруг роста культуры появляются зоны просветления за счет деполимеризации ДНК бактериальной ДНКазой. Положительный результат обеих проб или хотя бы одной из них позволяют отнести выделенный штамм к коагулазоотрицательному S. aureus.

Коагулазоположительные культуры кокков, не обладающие ни золотисто-желтым пигментом, ни лецитиназой, ДНКазой и анаэробной ферментацией маннита к виду S. aureus не относятся.

Культура стафилококка, не являющаяся видом S. aureus, но нередко формирующая белые колонии, может относиться к видам S. epidermidis и S. saprophyticus. Эти представители нормальной флоры кожи и слизистых человека могут иногда вызвать гнойно-септические заболевания у ослабленных лиц, быть причиной внутрибольничных инфекций.

Для их идентификации необходимо поставить три дополнительных теста:

на устойчивость к антибиотику новобиоцину дисковым методом, тест на щелочную фасфатазу и на окисление маннита (путем посева на среду с маннитом и индикатором) (табл. 2).

Определение фосфатазной активности

 К расплавленному МПА добавляют 10 % раствор фенолфталеина из расчета 0,008 мл на 1 мл среды. Чашки засевают бляшками и инкубируют сутки при 37°С. После инкубации вокруг посевов образуются светло-розовые зоны за счет образовавшегося свободного фенолфталеина. Реакция усиливается при помощи аммиака. Для этого на крышку чашки Петри наносят 5-6 капель 25 %-ного раствора гидроокиси аммония (NH4OH) и ставят её под перевёрнутую (вверх дном) чашку с выросшими испытуемыми культурами. Бляшки культур, образующих фосфатазу, приобретают малиновое окрашивание. Фосфатазоотрицательные культуры сохраняют характерный для каждого штамма пигмент.

Определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

 Метод бумажных дисков. Исследуемую выделенную чистую культуру засевают сплошным «газоном» на поверхность агара в чашках Петри. Затем стерильным пинцетом накладывают на агар бумажные диски, пропитанные раствором определенного антибиотика и окрашенные в разные цвета. Необходимо следить, чтобы диски располагались на одинаковом расстоянии друг от друга, от центра чашки и ее краев. Засеянные чашки выдерживают сутки в термостате при оптимальной для роста микроорганизмов температуре.

Таблица 2

Дифференциация видов S. epidermidis и S. saprophyticus

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Вид стафилококка | Устойчивость к новобиоцину | Наличие фосфатазы | Окисление маннита |
| S. epidermidis | – | + | – |
| S. saprophyticus | + | – | + |

Результаты определяют измерением зоны задержки роста микроба. Наличие роста вокруг диска свидетельствует о нечувствительности данного микроба к антибиотику. Зона задержки роста диаметром 15 мм является показателем малой чувствительности микроба к антибиотику. При диаметре зоны 15-25 мм микроорганизм обладает средней чувствительностью. Зона более 25 мм указывает на высокую чувствительность к антибиотику.

Диагностические питательные среды для выделения и изучения стафилококков

Сахарный бульон

 Бульон предназначен для выращивания грамположительных кокков.

 К МПБ с рН 7,4±2 прибавляют глюкозу в количестве 0,5-1,0 %. Перед добавлением глюкозу растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды. Приготовленную среду стерилизуют 3 дня подряд текучим паром по 30 мин. Глюкозу можно добавлять, используя 40%-ный стерильный раствор глюкозы.

Кровяной агар

 Для выращивания большинства кокков требуется создать условия, близкие к естественным в организме, поэтому питательные среды должны содержать жидкость животного происхождения: кровь, сыворотку, желчь.

 Для определения гемолитической активности бактерий используют дефибринированную кровь барана, лошади, кролика, донора.

 К расплавленному и остуженному до 45-50°С 2%-ному агару добавляют 5-10 % стерильной дефибринированной крови животного (кроличьей, лошадиной, бараньей) или человеческой, не содержащей консервантов или антибактериальных препаратов. Смесь тщательно перемешивают, избегая образования пены, и разливают в стерильные чашки Петри.

Желточно-солевой агар

Среда предназначена для выделения стафилококков и выявления пигмента.

Для приготовления среды используют МПА с добавлением 10 % хлорида натрия. (Агар стерилизуют в автоклаве в течение 20 мин. при температуре 121°С).

 Перед употреблением среду расплавляют, охлаждают до

45-50°С и добавляют 20 % (по объему) желточной взвеси. Желток асептически извлекают из яйца, взбалтывают с 200 мл стерильного физиологического раствора. Среду быстро перемешивают и разливают в чашки Петри. Готовая среда полупрозрачна, имеет беловатый цвет с легким кремовым оттенком.

 Учет результатов производят через 36-48 часов инкубации в термостате при 37°С. На этой среде хорошо выявляются пигментные свойства микроорганизмов, обусловленные липохромным пигментом. Вокруг колоний можно видеть радужный венчик за счет образования лецитовителлазы (лецитиназы). Добавление к среде 10 % стерильного снятого молока усиливает пигментообразование.

Желточно-солевой агар по Г.Н. Чистовичу.

 Среда предназначена для определения лецитиназной активности стафилококков.

 К МПА добавляют 20 % желточной взвеси (1 желток куриного яйца на 150-200 мл стерильного физраствора).

 При определении лецитиназной активности по методу Чистовича исследуемую культуру стафилококка засевают на среду штрихами или бляшками. Посевы помещают в термостат при 37°С. Вокруг колоний стафилококка, продуцирующих лецитиназу, образуются четко выраженные зоны помутнения с радужным венчиком по периферии.

Молочно-солевой агар

 К расплавленному и остуженному до 60°С МПА, содержащего 6,5% хлористого натрия, добавляют 10% стерильного обезжиренного молока, тщательно перемешивают и разливают в стерильные чашки Петри.

 Хлорид натрия в повышенной концентрации подавляет рост части сопутствующей флоры, что облегчает выделение чистой культуры. Молоко (10%) способствует лучшему выявлению пигмента колоний стафилококка.

Среда Хью-Лейфсона

 Предназначена для определения способа утилизации углеводов микроорганизмами по анаэробному или аэробному пути (ферментация, окисление или отсутствие утилизации).

Состав (на 1 л дистиллированной воды):

пептон – 2 г

NaCl – 5 г

KH2PO4 х 3H2O – 0,3 г

глюкоза – 10 г

бромтимоловый синий – 0,05 г

агар – 2 г

Глюкоза может быть заменена на другие углеводы.

Цветные среды Гисса с углеводами

 Углеводные среды применяют для дифференциации бактерий по способности ферментировать углеводные субстраты.

 При ферментации углеводов происходит образование смеси кислот (молочной, уксусной, углекислоты и др.), которые снижают значение pH.

Конечными продуктами ферментации углеводов и спиртов в большинстве случаев являются кислоты, спирты, альдегиды и газообразные вещества (H2 и CO2). Для обнаружения ферментации углеводов в среды Гисса вводят индикатор (индикатор Андреде, бромтимоловый синий и др.). Для выявления газообразования в жидких средах применяют трубки-поплавки (маленькие трубочки, запаянные с одного конца). Образующийся газ вытесняет жидкость из поплавков. Газ скапливается у запаянного конца трубки.

Состав (на 1 л дистиллированной воды):

Пептон – 10 г

NaCl – 5 г

Углевод – 5-10 г

Индикатор Андреде – 10 мл или 1 мл 1,6%-ого раствора бромтимолового синего

рН – 7,2 ±0,2

 К 1000 мл дистиллированной воды добавляют 10 г пептона и 5 г хлорида натрия. Устанавливают рН. Добавляют 5-10 г одного из испытуемых углеводов, а затем индикатор Андреде или бромтимоловый синий.

 Готовую среду разливают по 3 мл в пробирки вместе с поплавками, расположенными запаянным концом кверху. Среду стерилизуют при 112°С в течение 20 мин. Во время стерилизации поплавки доверху заполняются питательной средой.

 Готовая среда бесцветная или имеет розовый оттенок – с индикатором Андреде, травянисто-зеленый – с индикатором бромтимоловым синим.

 Вследствие роста бактерий, сопровождающегося расщеплением углеводов с образованием кислых продуктов распада, цвет среды изменяется (табл. 3): с индикатором Андреде она становится ярко-розовой; с бромтимоловым синим – желтой. Образование газа в среде определяют по наличию пузырьков, собирающихся в поплавке.

Индикатор Андреде:

Фуксин кислый – 1 г

Натрия гидроксид

(NaOH) 1 н раствор – 64 мл

Вода дистиллированная – 400 мл

 Фуксин кислый растворяют в гидроксиде натрия, после растворения краски прибавляют 400 мл дистиллированной воды, настаивают 24 часа при 37°С (в термостате) и 2 суток держат на свету при комнатной температуре. Хранят во флаконе темного стекла с резиновой или хорошо притертой пробкой.

Таблица 3

Изменение цвета индикатора Андреде

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| рН среды | 5,3 – 5,5 | 6,0 – 6,25 | 6,5 – 6,7 | 6,9 – 7,0 | 7,2 – 7,4 |
| Цвет индикатора | Интенсивнокрасный | Красный | Розовый | Бледно-розовый | Бесцветный |

Питательные среды для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

Агар Мюллера-Хинтона

 Среда принята комитетом ВОЗ как стандарт для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам.

Состав (г/л):

Вытяжка из говядины – 300

Гидролизат казеина кислотный – 17,5

Крахмал 1,5

Агар 17,0

рН 7,3±0,2

 38 г сухой смеси суспендируют в 1000 мл дистиллированной воды. Кипятят до полного растворения. Устанавливают рН. Стерилизуют автоклавированием при 121°С в течение 15 мин.

**Кишечные инфекции**

*Семейство кишечных бактерий*

 Семейство кишечных бактерий (Enterobacteriaceae) объединяет обширную группу грамотрицательных неспорообразующих палочек. Они широко распространены в природе, обитают в кишечнике человека и животных. Среди них встречаются сапрофиты, условно-патогенные бактерии и патогенные виды.

 К патогенным бактериям этого семейства относятся возбудители брюшного тифа, паратифа, колиэнтеритов, дизентерии, кишечных отравлений.

 Предполагают, что родоначальником всех этих групп была кишечная палочка. В ходе эволюционного развития многие ее разновидности приспособились к паразитическому существованию и приобрели патогенные свойства. Доказательством единого происхождения кишечных бактерий является общность морфологических, тинкториальных и культуральных свойств. Все они хорошо растут на простых питательных средах, в присутствии и в отсутствии кислорода. Ферментативная активность хорошо выражена у сапрофитов этого семейства (кишечная палочка) и снижается по мере возрастания патогенных свойств (сальмонеллы, шигеллы). Эти различия имеют таксономическое значение и используются для родовой дифференциации энтеробактерий (табл. 4).

 Каждый род кишечных бактерий отличается от другого антигенными свойствами. Антигенное строение служит одним из существенных критериев, на которых основывается классификация, а также идентификация энтеробактерий.

 У кишечных бактерий обнаружено несколько видов антигенов. Основное значение имеют три: 1) О – соматический антиген; 2) Н – жгутиковый антиген; 3) К – антиген (поверхностный или капсульный). О-, К- и Н – антигены имеют сложный состав, чем обусловлены многочисленные внутри- и межродовые антигенные связи. О-антиген является составной частью липополисахарида наружного слоя клеточной стенки. Специфичность О-антигена определяется детерминантными сахарами (гексозами и аминосахарами), ковалентно связанными с базисной частью липополисахаридов. Н-антиген локализован в жгутиках клетки. Он состоит из белка флагеллина. Перекрестные реакции по Н-антигену с представителями других родов энтеробактерий слабо выражены.

 Капсульные К-антигены по химическим свойствам относятся к кислым полисахаридам. У E. coli они могут быть подразделены на две группы, различающиеся по молекулярной массе, составу кислот, термостабильности, электрофоретической подвижности и температурному режиму. К К-антигенам относятся Vi-антиген (антиген вирулентности) возбудителя брюшного тифа (S. typhi), который обнаруживается также у S. paratyphi и у некоторых штаммов рода Citrobacter. У сальмонелл известен М-антиген (также относится к К-антигенам), представляющий собой кислый полисахарид, нерастворимый в воде и разрушающийся под действием кислоты и спирта.

 Все эти антигены характеризуются иммунохимической специфичностью, что позволяет дифференцировать роды и виды, а также выделять среди них серогруппы и серологические варианты (серовары). Антигенное строение энтеробактерий изучают в реакциях агглютинации, непрямой (пассивной) гемагглютинации, преципитации и других иммунологических реакциях с соответствующими диагностическими сыворотками.

*Микробиологическая диагностика кишечных инфекций*

Микробиологическая диагностика коли-энтеритов

 Коли-энтерит – острое инфекционное заболевание, поражающее преимущественно детей раннего грудного возраста и сопровождающееся повышением температуры, частым жидким стулом со слизью.

 Возбудителями коли-энтеритов являются патогенные кишечные палочки. В зависимости от наличия тех или иных факторов патогенности и механизмов, лежащих в основе возникновения и развития инфекционного процесса, клинические штаммы эшерихий были подразделены на две большие группы:

1. вызывающие патологический процесс внекишечной локализации и
2. обусловливающие развитие острых кишечных инфекций.

 E. coli, вызывающие парентеральный инфекционный процесс, подразделяются на три патогруппы: 1) менингеальные; 2) септицемические; 3) урологические.

Таблица 4

Дифференциально-диагностические признаки разных родов

семейства энтеробактерий

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Признак  | Escherichia | Shigella | Salmonella | Klebsiella | Proteus | Yersinia |
| Подвижность | + | – | + | – | + | в |
| Индолообразование | + | в | – | – | + | – |
| Наличие β галактозидазы | + | в | в | + | – | + |
| Реакция Фогес-Проскауэра (на ацетилметилкарбинол) | – | – | – | – | – | – |
| Утилизация цитратов | – | – | + | + | в | – |
| Образование H2S | – | – | + | – | в | – |
| Разложение мочевины (уреаза) | – | – |  | + | + | + |
| Декарбоксилирование лизина | в | – | + | + | – | – |
| Декарбоксилирование фенилаланина | – |  | – | – | + | – |
| Ферментация глюкозы с образованием газа | + | – | + | + | + | + |
| Ферментация лактозы | + | – | – | + | – | – |
| Ферментация сахарозы | в | – | – | + | в | – |
| Ферментация маннита | + | в | + | + | – | + |
| Обозначения: «+» – постоянное обнаружение признака «–» – постоянное отсутствие признака «в» – вариабельное проявление признака |

Эшерихии, вызывающие острые кишечные инфекции (ОКИ), подразделяются на 6 патотипов кишечных палочек: 1) энтеропатогенные (ЭПКП); 2) энтероинвазивные (ЭИКП); 3) энтеротоксигенные (ЭТКП); 4) энтерогеморрагические (ЭГКП); 5) энтероагрегативные (ЭАКП); 6) диффузноадгезирующие (ДАКП).

ЭПКП – возбудители коли-энтеритов, вызывающих сальмонеллоподобные инфекции, способны продуцировать термолабильный и/или термостабильный токсины.

ЭИКП – проникают и размножаются в клетках кишечного эпителия подобно шигеллам, вызывают дизентериеподобные инфекции.

ЭТКП – вызывают холероподобные инфекции.

ЭГКП – вызывают геморрагический колит, продуцируя шига-подобные энтеротоксины.

ЭАКП – обладают специфическим свойством агрегатадгезии к эпителиоидным клеткам.

ДАКП – диффузно прилипают к эпителиоидным клеткам.

ЭПКП отличаются от непатогенных своими антигенными свойствами. Антигенодиагностическая схема базируется на определении О-, Н- и К-антигенов (в прошлом эти антигены были разделены на три группы – L, A, B в зависимости от действия нагревания). В наши дни описано более 170 соматических антигенов, около 100 разновидностей К-антигена и более 50 – Н-антигенов.

 Уже описано 1730 серотипов кишечной палочки, дифференцируемых по О-антигену. В пределах этих групп различают отдельные серологические типы по В- (К-) и Н-антигенам. Коли-энтерит вызывают ЭКПК преимущественно сероваров 026:Н, 055:Н и 0111:Н.

 К настоящему времени накоплено достаточно сведений о конкретных серотипах, обладающих теми или другими факторами патогенности. Некоторые серотипы E. coli, относимые к основным группам диареегенных эшерихий, представлены в таблице 5.

 При кишечной коли-инфекции только на основании бактериологического исследования можно поставить окончательный диагноз заболевания. Идентификацию выделенной культуры проводят по морфологическим и биохимическим признакам и определению серовара возбудителя (рис. 2).

 Выделение чистой культуры сопряжено с определенными трудностями. Они связаны с наличием в исследуемом материале (фекалии) эшерихий, представителей нормальной микрофлоры кишечника. Эти бактерии вместе с энтеропатогенными штаммами образуют однотипные колонии на дифференциально-диагностических средах. Идентификация выделенных эшерихий может быть произведена только на основании определения их принадлежности к определенной серогруппе в реакциях агглютинации с диагностическими групповыми и типоспецифическими сыворотками.

Схема бактериологической диагностики коли-энтеритов

 Бактериологическому исследованию на содержание ЭПКП подвергают испражнения, рвотные массы больных, пищевые продукты.

Первый день: Материал, поступивший на исследование, засевают на среду Эндо.

 При посеве испражнений небольшое их количество эмульгируют в физиологическом растворе (в отношении 1:10). После оседания крупных частиц с поверхности жидкости берут 1-2 капли приготовленной взвеси, вносят ее в чашку Петри и на небольшом участке питательной среды растирают досуха стерильным стеклянным шпателем. Затем шпатель отрывают от поверхности среды и, не прожигая его, распределяют остаток материала по остальной поверхности чашки. Посевы помещают в термостат при 37° С на 18-24 час.

Таблица 5

Серотипы ЭПКП, ЭТКП, ЭИКП, ЭГКП

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **ЭПКП** | **ЭТКП** | **ЭИКП** | **ЭГКП** |
| О26:Н- | О6:Н16 | О28:Н- | О1:Н | О18:Н7 | О50:Н7 |
| О26:Н11 | О8:Н- | О29:Н- | О1:Н20 | О18:Н11 | О55:Н7 |
| О55:Н- | О8:Н9 | О112aс:Н- | О2:Н- | О22:Н16 | О55:Н10 |
| О55:6 | О11:Н27 | О115:Н- | О2:Н5 | О25:Н- | О65:Н16 |
| О86:Н- | О15:Н11 | О124:Н- | О2:Н39 | О26:Н- | О69:Н11 |
| О86:Н2 | О20:Н- | О124:Н7 | О4:Н- | О26:Н11 | О74:Н? |
| О86:Н34 | О25:Н- | О124:Н30 | О4:Н10 | О38:Н21 | О76:Н19 |
| О111ab:Н- | О25:Н42 | О135:Н- | О5:Н- | О39:Н4 | О80:Н- |
| О111ab:Н2 | О27:Н7 | О136:Н- | О5:Н16 | О40:Н8 | О82:Н8 |
| О111ab:Н12 | О27:Н20 | О143:Н- | О6:Н1 | О43:Н2 | О84:Н2 |
| О111ab:Н21 | О63:Н12 | О144:Н- | О6:Н34 | О45:Н2 | О84:Н- |
| О114:Н2 | О78:Н11 | О152:Н- | О7:Н4 | О46:Н31 | О91:Н- |
| О119:Н6 | О78:Н12 | О164:Н- | О8:Н19 | О48:Н21 | О91:Н- |
| О127:Н- | О85:Н7 | О167:Н-и другие | О15:Н27 | О49:Н- | О98:Н25 |
| О127:Н6 | О114:Н21 | О101:Н19 | О118:Н16 | О156:Н- |
| О127:Н9 | О115:Н21 | О103:Н2 | О121:Н- | О157:Н- |
| О127:Н21 | О126:Н9 | О111:Н- | О121:Н7 | О157:Н7 |
| О125aс:Н21 | О128aс:Н7 | О111:Н2 | О125:Н- | О163:Н2 |
| О128ab:Н21 | О128aс:Н12 | О111:Н7 | О126:Н- | О163:Н19 |
| О142:Н6 | О128aс:Н21 | О111:Н8 | О126:Н8 | О165:Н- |
| О158:Н23 | О148:Н28 | О111:Н11 | О128:Н2 | О165:Н19 |
| О20:Н- | О149:Н4 | О111:Н30 | О128:Н12 | О171:Н2 |
| О20:R84:H34 | О159:Н4и другие | О112ab:Н2 | О132:Н- | О172:Н- |
| О159:Н20 | О113:Н2 | О136:Н12 | ОХ3:Н21 |
| О166:Н27 | О113:Н7 | О139:Н19 | О?:Н2 |
| О167:Н5и другие | О114:Н48 | О145:Н- | О?:Н4и другие |
| О115:Н8 | О145:Н8 |
| О115:Н10 | О146:Н8 |
| О116:Н21 | О146:Н21 |
| О117:Н4 | О153:Н21 |
| О118:Н12 | О156:Н7 |

Примечание: Н- – неподвижные, О? – антиген не определен



Рис. 2. Микробиологические исследования при коли-энтеритах и дизентериеподобных заболеваниях (эшерихиозах)

Второй день

Просматривают посевы, засеянные накануне.

 Колонии энтеропатогенных кишечных палочек на среде Эндо имеют круглую форму, ровный, четко очерченный край, блестящую, глянцевую поверхность, малиново-красный цвет, но без металлического блеска.

 Из 10 изолированных колоний, с характерными культурально-морфологическими признаками, берут часть материала для пробной агглютинации так, чтобы оставшаяся часть колонии в случае надобности, могла быть использована для дальнейших исследований. С материалом каждой колонии ставят реакцию агглютинации на стекле с поливалентной сывороткой ОВ (ОК) для выявления гомологичных В-антигенов (К-антигенов). Сыворотку готовят смешиванием типовых сывороток наиболее часто выделяемых серотипов кишечной палочки. При положительном результате реакции агглютинации исследуемая культура в первую же минуту наблюдения образует хорошо видимые простым глазом крупные хлопья агглютината. Каждую агглютинирующую колонию отмечают с противоположной стороны чашки.

 Материал из колоний, бактерии которых агглютинировались смесью сывороток на предметном стекле, отсевают в пробирки со скошенным МПА для дальнейшего изучения.

Третий день:

 Просматривают посевы на скошенном МПА. На поверхности агара кишечная палочка образует влажный, блестящий налет сероватого цвета, слегка опалисцирующий в проходящем свете. Для точного определения серотипа выделенных энтеропатогенных кишечных палочек:

а) ставят реакцию агглютинации на стекле отдельно с каждой типовой ОВ-сывороткой, входившей в состав той смеси, в которой имела место агглютинация исследуемой культуры. Реакция агглютинации живой культуры имеет только ориентировочное значение, указывая на наличие в ней соответствующего Н-антигена и не может служить основанием для отнесения выделенного штамма к той или иной О-группе.

б) для окончательной идентификации культур к О- и В-антигенам ставят развернутую реакцию агглютинации в пробирках с той ОВ-сывороткой, которая агглютинировала культуру на предметном стекле. При определении О-антигенов исследуемую культуру подвергают предварительному 1,5 часовому кипячению для инактивации поверхностно-оболочечных антигенов и устранения феномена инагглютинабильности.

 При определении В-антигенов реакцию агглютинации ставят с живой культурой выделенного микроба. Исследуемые в реакции агглютинации ОВ-типовые сыворотки разводят от 1:100 до титра, указанного на этикетке. Разведенную сыворотку разливают в пробирки по 0,8-1 мл и прибавляют в них по 1 капле антигена (3 млрд. взвеси исследуемых живых или убитых кипячением кишечных палочек). Последние две пробирки ряда – контрольные: контроль антигена (КА)-исследуемая культура в физиологическом растворе и контроль сыворотки (КС) в разведении 1:100.

 Штатив с пробирками встряхивают для лучшего перемешивания сыворотки с антигеном и ставят в термостат на 18-24 час. При учете результатов развернутой реакции агглютинации нужно иметь в виду возможность следующих вариантов:

а) крупнохлопчатая агглютинация живой культуры, наступающая при разведении сыворотки 1:200-1:400, и мелкозернистая агглютинация прогретой культуры при разведении сыворотки не менее до ¾ ее титра по О-антигену указывает на принадлежность выделенной культуры к соответствующей ОВ-группе.

б) одинаковая мелкозернистая агглютинация с живой и прогретой культурами, наблюдаемая при разведении сыворотки до ¾ ее титра по О-антигену, свидетельствует о принадлежности культуры к соответствующей О-группе при отсутствии или низком содержании в ней В-антигена. Реакция агглютинации считается положительной.

в) отсутствие агглютинации в пробирках с гретой культурой указывает на принадлежность выделенной культуры к другой О-группе. Если прогретая культура агглютинируется только в начальных разведениях сыворотки, это свидетельствует о ее принадлежности к другой группе, имеющей антигенное родство с соответствующей О-группой. Реакция отрицательная.

 После установления ОК (ОВ)-группы у подвижных штаммов определяют Н-антиген в реакции агглютинации на стекле с использованием культур, выращенных на глицериновом агаре, усиливающем подвижность. Н-антиген обозначают по наименованию той Н-сыворотки, добавление которой в полужидкий агар вызвало иммобилизацию (рост только по уколу) штамма.

 По совокупности установленных О-, В- (К-), Н-антигенов определяют серотип выделенного штамма.

 Бактериологическими критериями этиологической значимости эшерихий при острых кишечных инфекциях можно считать серологическую метку на уровне серотипа. Для идентификации E. coli по ферментативным свойствам, микробную культуру, выращенную на скошенном МПА, пересевают на среды Гисса с глюкозой, лактозой, маннитом, мальтозой, сахарозой, в МПБ для выявления индола и сероводорода или могут быть использованы отечественные тест-системы ПБДЭ (пластины биохимические для дифференциации энтеробактерий).

*Микробиологический диагноз бактериальной дизентерии (шигеллеза)*

 Возбудителями бактериальной дизентерии (шигеллеза) является группа бактерий семейства Enterobacteriaceae. Этиологическая роль этих микробов при дизентерии впервые была установлена русским ученым А.В. Григорьевым и японским исследователем Шига. Впоследствии были выделены и описаны другие виды бактерий, вызывающие дизентерию. Они получили названия в честь авторов, их описавших. В настоящее время они отнесены к роду Shigella, который подразделяется на четыре вида (подгруппы), которые отличаются между собой по биохимическим свойствам и антигенной структуре: А – S. disenteriae; В – S. flexneri; С – S. boydii; D – S.sonnei.

Принятая в настоящее время классификация шигелл представлена в таблице 6. Естественным хозяином шигелл является человек. Шигеллы обитают в кишечнике, с фекалиями попадают во внешнюю среду. Часто встречаются в воде, почве, пищевых продуктах, на поверхности различных предметов.

Морфологические, тинкториальные и прочие биологические свойства

 Шигеллы – мелкие грамотрицательные палочки с закругленными концами. Всегда неподвижны. Размеры бактериальной клетки 0,5х1-3 мкм. Располагаются одиночно. Спор и капсул не образуют. У некоторых представителей шигелл подгруппы В имеются фимбрии типа I, чувствительные к D-маннозе. Хорощо окрашиваются анилиновыми красителями. Относятся к хемоорганотрофам. Метаболизм – бродильного или/и окислительного типа. Конечными продуктами ферментативной реакции являются молочная, муравьиная кислоты.

Как все энтеробактерии, шигеллы – факультативные анаэробы. Хорошо растут на обычных питательных средах. Оптимальная температура роста 37°С, рН – нейтральный (7,0-7,2). При росте в жидких питательных средах наблюдается равномерное помутнение, возможно образование осадка при посеве шероховатых форм. Оптимум роста 37°С; S. sonnei могут размножаться при температуре от 10 до 45°С. На плотных питательных средах образуют небольшие круглые выпуклые полупрозрачные колонии.

 Для шигелл характерна малая биохимическая активность. Все шигеллы не обладают уреазой, лизиндекарбоксилазой, дезаминазами аминокислот, желатиназой, не утилизируют малонат и цитрат, не образуют ацетилметилкарбинола (отрицательная реакция Фогес – Проскауэра), не растут на средах с добавлением KCN, не ферментируют адонит и инозит (табл. 7).

Различить по биохимическим признакам первые три вида практически невозможно.

В практических лабораториях нередки ошибки при идентификации шигелл из-за общности некоторых биохимических свойств с эшерихиями, гафниями, провиденциями. Основные дифференциально-диагностические признаки шигелл и сходных с ними энтеробактерий приведены в таблице 8.

Некоторые серотипы шигелл можно подразделять на биотипы (биовары) по биохимическим свойствам. Так, S. flexneri 6 с учетом способности ферментировать глюкозу, маннит и дульцит подразделяется на 7 биоваров. Серологически однородные S. sonnei также дифференцируются на 5 биоваров по способности ферментировать рамнозу, ксилозу и мальтозу.

Таблица 6

Классификация бактерий рода Shigella

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Вид (подгруппа) | Наименование | Серотип | Подтип | Сокращенная антигенная формула |
| А | S. dysenteriae | С 1 по 16  | – | – |
| B | S. flexneri | 1 | 1а | I: (3) 4 |
| 1в | I: (3) 4, 6 |
| 2 | 2а | II: (3) 4 |
| 2в | II: 7 (8) |
| 3 | 3а | III: 6, 7, 8 |
| 3в | III: |
| 3с | III: 6 |
| 4 | 4а | IV: 3, 4 |
| 4в | IV: (3, 4) 6 |
| 5 | 5а | V: 3, 4 |
| 5в | V: 7, 8 |
| 6 | – | VI: – |
| х | – | * : 7, 8
 |
| у | – | – : 3, 4 |
| С | S. boydii | 1-18 | – | – |
| D | S.sonnei | – | – | – |

Таблица 7

Ферментативные свойства шигелл

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Тест или субстрат | S.dysenteriae | S. flexneri | S. boydii | S. sonnei |
| Подвижность | – | – | – | – |
| Индол\* | –/+ | –/+ | –/+ | – |
| –Цитрат Симмонса | –  | – | – | – |
| Мочевина | – | – | – | – |
| Глюкоза | к | к, кг | к | к |
| Лактоза | – | – | – | (+) |
| Сероводород\* | – | – | – | – |
| Маннит | – | + | + | + |
| Сахароза | – | –/+ | – | –/+ |
| Адонит | – | – | – | – |
| Дульцит | – | – | –/+ | – |
| Сорбит | –/+ | –/+ | –/+ | – |
| Арабиноза | +/– | –/+ | +/– | + |
| Ацетат | – | – | – | – |
| Ксилоза | –/+ | – | –/+ | –/+ |
| Рамноза | –/+ | – | –/+ | –/+ |
| Салицин | – | – | – | – |
| Инозит | – | – | – | – |
| Лизин | – | – | – | – |
| Желатин | – | – | – | – |
| Глицерин | (+)/– | – | (+) | –/+ |
| Метиловый красный\* | + | + | + | + |
| Реакция Фогес-Проскауэра\* | – | – | – | – |

Примечание: \*– тест; к – кислота кг – кислота – газ

Таблица 8

Дифференциация шигелл и сходных энтеробактерий

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Тест или субстрат | Shigella | E. coli | Hafnia | Providencia |
| Лактоза | –/(+) | +/– | –/+ | – |
| Лизин | – | +/– | + | – |
| Цитрат Симмонса | – | – | +/– | + |
| Цитрат Кристенсена | – | –/+ | + | + |
| Ацетат | – | + | –/(+) | –/(+) |
| Реакция Фогес – Проскауэра\* | – | – | +/– | – |
| Подвижность\* | – | +/– | +/– | +/– |
| Проба с шигеллезным фагом\* | + | – | – | – |

\*– тест

По спектру чувствительности к шигеллезным бактериофагам и продукции колицинов возможно подразделение шигелл на фаго- и колициногеновары.

Шигеллы мало устойчивы к воздействию различных физических и химических факторов. Прямые солнечные лучи убивают бактерии через 30 мин. Во внешней среде возбудители дизентерии могут сохраняться от 5 до 14 сут. При нагревании до 60°С бактерии погибают через 10-20 мин. Наиболее устойчивыми к воздействию различных факторов являются S. sonnei, которые могут сохраняться в воде до 2 мес., в почве – еще дольше (до 3 мес.). Чувствительны к тетрациклинам, аминоглигозидам, нитрофуранам, ампициллину, хлорсодержащим дезинфектантам.

Лабораторная диагностика

Бактериологическому исследованию при подозрении на дизентерию подлежат испражнения больного. Время от момента получения кала до посева его на питательные среды не должно превышать 2-х часов. Продолжительное хранение кала ведет к гибели содержащихся в нем бактерий дизентерии. При отсутствии возможности своевременного посева испражнений пользуются консервантами. Посев на дифференциально-диагностические среды (среда Плоскирева, Левина и др.) лучше производить у постели больного (рис. 3). Для посева отбирают частицы кала, содержащие слизь и гной. Испражнения засевают в пробирку с жидкой селенитовой средой обогащения, которая способствует накоплению дизентерийных микробов и угнетает рост кишечной палочки и других сапрофитов.

*Первый день*. Фекалии засевают на дифференциально-диагностические среды на чашках Петри. Посевы инкубируют в термостате при 37°С в течение 18-20 час.

*Второй день*. Просматривают чашки, засеянные накануне. Отбирают подозрительные колонии для дальнейшего исследования. На среде Плоскирева бактерии дизентерии образуют небольшие (до 1,5 мм в диаметре) прозрачные колонии круглой формы, слегка приподнятые над поверхностью. Из колоний, характерных для бактерий дизентерии, делают мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. По внешнему виду – это тонкие палочки с закругленными концами, по Граму окрашиваются отрицательно.

Отобранные колонии петлей засевают в пробирки:

- с полужидким агаром для определения подвижности (под пробку помещают индикаторную бумажку для определения индола), в пробирку

- со средой Клиглера (посев делают вначале по скошенной части в виде прямой линии, затем уколом в толщу агарового столбика),

-в среду с мочевиной,

- среду Кларка,

- в пробирку с цитратным агаром Симмонса.

*Третий день*. Просматривают чашки с посевами, отбирают подозрительные колонии.

 Неподвижные, ферментирующие глюкозу с образованием кислоты, не ферментирующие лактозу, не образующие сероводорода, не гидролизующие мочевину, не утилизирующие цитрат в качестве единственного источника углерода, дающие положительную реакцию с метиловым красным и отрицательную – Фогес–Проскауэра – подозрительны на шигеллы. Для окончательной идентификации исследуемые культуры засевают в среду с лизином, ацетатным агаром, среды Гисса, а также в пробирку со скошенным агаром для последующего серологического типирования.

*Четвертый день*. Учитывают результаты посевов, сделанных накануне, и окончательно идентифицируют выделение культуры по биохимическим свойствам. Культуры, биохимические свойства которых соответствуют характеристике шигелл, типируют в реакции агглютинации на стекле сначала со смесью поливалентных сывороток к шигеллам Флекснера и Зонне, а при отрицательной реакции с набором поливалентных сывороток к другим видам шигелл. В случае выявления положительной реакции с одной из поливалентных сывороток типирование продолжают с адсорбированными моновалентными сыворотками, при выявлении шигелл Флекснера – с типовыми и групповыми сыворотками.



Рис. 3. Схема микробиологических исследований при дизентериях

 По результатам изучения биохимических свойств и серологического типирования выдают ответ о выделении определенного вида шигелл.

 Биохимические свойства шигелл можно определить при помощи тест-систем.

 Основным методом лабораторной диагностики дизентерии является бактериологический. В некоторых случаях для серодиагностики можно использовать реакцию пассивной гемагглютинации с эритроцитарными диагностикумами из S. flexneri и S. sonnei. Антитела к возбудителю в сыворотке крови больных появляются на 5-8 день болезни, достигая максимума на 2-3 неделе.

 В настоящее время используют ПЦР и разные иммунологические методы, позволяющие подтвердить диагноз в первые дни заболевания.

Среды для выделения, культивирования, дифференциации и идентификации энтеробактерий

Селенитовая среда

Селенитовая среда предназначена для накопления в исследуемом материале сальмонелл. Для этого взвесь фекалий в количестве 10-15 мл вносят в среду и тщательно размешивают.

Состав:

Натрия гидроселенит

(без примеси теллура)

(NaHSeO3) – 4,0 г

Пептон – 5,0 г

Натрия гидрофосфат

 (Na2HPO4) – 7,0 г

Натрия дигидрофосфат

(NaH2PO4) – 3,0 г

Лактоза – 4,0 г

Вода дистил. – 1000 мл

Среду готовят из двух растворов.

Раствор 1.

К 950 мл раствора фосфатов добавляют пентон и лактозу. Сразу разливают во флаконы и стерилизуют при 112°С в течение 20 мин. При приготовлении среду подтитровывают, чтобы при добавлении пептона и селенита натрия готовая среда имела рН5,0-7,1. Раствор хранят при 4-10°С 1-2 месяца.

Раствор 2.

10%-ный раствор натрия гидроселенита готовят непосредственно перед приготовлением среды на стерильной дистиллированной воде.

В каждый флакон с 50 мл первого раствора добавляют по 2 мл второго раствора и перемешивают. Стерилизация готовой среды не допускается, т.к. при этом происходит восстановление кислого селенисто-кислого натрия, выпадает осадок красного цвета и среда становится непригодной.

 Среда выпускается в сухом виде. Её готовят по прописи на этикетке.

 Среда Клиглера.

 Среда Клиглера предназначена для дифференциации энтеробактерий по их способности ферментировать глюкозу, лактозу и образовывать сероводород.

Состав:

Мясная вода 1000 мл

Пептон 20,0 г

Лактоза 10,0 г

Глюкоза 1,0 г

Натрия хлорид (NaCl) 5,0 г

Натрия сульфит (Na2SO3·7 H2O) 0,4 г

Натрия тиосульфат (Na2S2O3 5 H2O) 0,08 г

Железа II сульфат (FeSO4 7 H2O) 0,5 г

Агар 20,0 г

Феноловый красный

(1 %-ный раствор в

50%-ном этиловом спирте) 12,0 мл

рН 7,4±0,2

 В мясную воду добавляют пептон, соли натрия, агар. Кипятят до полного растворения, устанавливают рН 7,8, снова кипятят. Фильтруют через ватно-марлевый фильтр, затем добавляют остальные ингредиенты. Сульфат железа предварительно растворяют в небольшом количестве воды. Готовую среду разливают в пробирки по 6-7 мл. Стерилизуют при 112°С 30 мин. Скашивают, оставляя столбик высотой 2-2,5 см. Готовая среда перед употреблением имеет красноватый или оранжево-красный цвет.

 Посев материала на среду Клиглера производят вначале по скошенной части в виде прямой линии, затем уколом в толщу агарового столбика. Петля не должна достигать дна, чтобы не нарушать анаэробных условий культивирования. Посевы инкубируют при 37°С. Результаты роста анализируют не позже чем через 18-24 часа после посева.

Среда Кларка

 Среда Кларка для теста с метиловым красным и реакции Фогес-Проскауэра.

Состав:

Пентон – 0,5 г

Калий фосфорно-кислый

двузамещенный (К2НРО4 х 3 Н2О) – 0,5 г

Глюкоза – 0,5 г

Вода дистил. – 100 мл

рН 6,0±0,1

 Перечисленные ингредиенты размешивают в 100 мл дистил. воды, кипятят в течение 2-3 мин. Фильтруют через бумажный фильтр, устанавливают рН гидроксидом натрия. Разливают по 3-5 мл в пробирки и стерилизуют при 112°С в течение 20 мин.

 Бульон используется для постановки теста с метиловым красным и реакции Фогес–Проскауэра.

Тест с метиловым красным позволяет по конечной рН (˂ 5,0 или ˃5,8) определить по какому пути пойдет разложение пировиноградной кислоты, образующейся при ферментации глюкозы у бактерий: по пути образования смеси органических кислот или по бутиленгликолевому пути с образованием нейтральных продуктов ацетоина и бутанодиола.

Реактив к реакции с метиловым красным

Состав:

Метиловый красный 0,1 г

Спирт этиловый 300,0 мл

Вода дистил. 200,0 мл

 Краску растворяют в спирте, а затем добавляют воду. Для постановки теста реагент добавляют в количестве 5-6 капель.

 При накоплении кислот (рН˂5,0) индикатор метиленовый красный окрашивает среду Кларка в красный цвет, при образовании ацетоина и бутанодиола (рН˃6,0) – в желтый.

 Реакцию Фогес-Проскауэра ставят для выявления ацетона (ацетил-метил-карбинола) одного из продуктов метаболизма пировиноградной кислоты, образующейся при ферментации глюкозы.

 К 2,5 мл 48-часовой испытуемой культуры на среде Кларка добавляют 0,3 мл раствора альфа-нафтола и 0,1 мл раствора гидроокиси калия (КОН), осторожно встряхивают пробирку и оставляют ее при комнатной температуре на 10 – 15 мин. (не дольше!), после чего учитывают результат. Покраснение среды расценивается как положительная реакция.

 Реактивы к реакции Фогес-Проскауэра.

Реактив 1. Навеску α-нафтола (5,0 г) растворяют в 100,0 мл 96° этилового спирта.

Реактив 2. Навеску КОН (40,0 г) растворяют в 100,0 мл дистиллированной воды.

Цитратный агар Симмонса.

Среда предназначена для дифференциации энтеробактерий на основании способности утилизировать цитрат.

Состав:

Натрия хлорид (NaCl) 5,0 г

Магний сернокислый (MgSO4 ˣ 7H2O) 0,2 г

Фосфорно-кислый аммоний

однозамещенный (NH4H2PO4) 1,0 г

Натрия цитрат кристаллический 2,77 г

Агар 20,0 г

1,5% спиртовой раствор

бромтимолового синего 10,0 мл

Вода 1000,0 мл

рН 7,2 ±0,1

Навеску ингредиентов растворяют в 1000, мл воды, нагревают до расплавления агара. Устанавливают рН 7,2. Добавляют 10 мл спиртового раствора бромтимолового синего. Фильтруют через вату, разливают в пробирки по 4,0 – 5,0 мл, автоклавируют при 121°С 15 мин. и скашивают. Цвет среды – оливковый.

При положительном результате цвет среды меняется на синий за счет появления щелочного карбоната Na2CO3 из цитрата как единственного источника углерода.

При отрицательном результате рост многих видов отсутствует.

**Тифо-паратифозная группа бактерий**

 Группа тифо-паратифозных бактерий включает монопатогенные и полипатогенные типы. Первые – вызывают заболевания только одного вида животных, другие – многих видов. К монопатогенным бактериям относятся возбудители брюшного тифа человека (палочки брюшного тифа, паратифов А и В), к полипатогенным – возбудители заболеваний как человека, так и ряда животных (паратифозные палочки различных типов).

 В честь Салмона, выделившего в 1885 г. в Америке при чуме свиней наиболее типичного представителя этой группы, вся группа получила название сальмонелл.

С тех пор, как сальмонеллы были объединены в самостоятельный род в семействе Enterobacteriaceae, классификация и номенклатура этих бактерий неоднократно пересматривалась.

 До 1970 г. видовая дифференциация бактерий рода Salmonella основывалась на данных эпидемиологии, эпизоотологии и антигенной структуре возбудителей. Штаммы, отличающиеся по одному или нескольким свойствам, получали разные названия, число которых очень быстро увеличивалось.

 В 1966 г. Кауффман подразделил род Salmonella на 4 подрода (I, II, III, IV) на основании ферментативных характеристик входящих в каждый подрод бактерий.

 Сальмонеллы широко распространены в природе. Все позвоночные способны стать их носителями (в кишечнике); кроме того, они могут быть выделены от пресмыкающихся, мух, тараканов. Многие серотипы сальмонелл имеют широкий спектр хозяев и могут быть выделены от животных разных видов. Небольшое число серотипов адаптировано к одному хозяину. Так, S. typhi, S. paratyphi A, S. paratyphi B и S. paratyphi С вызывают заболевание у человека. Другие сальмонеллы адаптированы к определенным видам животных: носители S. choleraesuis – свиньи, S. dublin – рогатый скот, S. gallinarum-pullorum – птицы, S. abortus-equi – лошади, S. abortus-ovis – овцы. Серотипы S. typhimurium и S. enteritidis являются убиквитарными и могут быть выделены от людей, животных и птиц. Практически все перечисленные серотипы способны вызывать заболевания у людей.

 Сальмонеллы – мелкие грамотрицательные палочки, подвижны за счет перитрихиально расположенных жгутиков, спор не образуют, хорошо растут на основных питательных средах, температурный оптимум роста 37°С, но они могут расти при температуре от 15°С до 41°С, рН 7,0 – 7,2, обладают выраженной биохимической активностью.

 Рекомендованы следующие тесты, позволяющие дифференцировать сальмонелл и других представителей семейства Enterobacteriaceae и идентифицировать S. typhi и S. paratyphi A (табл. 9).

 Сальмонеллы, также как и эшерихии, имеют сложную антигенную структуру. Они содержат термостабильные, расположенные в клеточной стенке, липополисахаридные О-антигены, жгутиковые Н-антигены белковой природы и капсульные Vi (virulence)-антигены, выявление которых имеет важное таксономическое и эпидемиологическое значение.

У большинства сальмонелл жгутиковые антигены могут существовать в двух альтернативных формах, что определяется двумя различными наборами хромосомных генов: фаза 1 – специфическая, фаза 2 – неспецифическая (или групповая). Анализ антигенного строения является обязательным элементом микробиологической диагностики сальмонеллезов.

 Детальное изучение О- и Н-антигенов позволило Кауффману и Уайту предложить серологическую классификацию сальмонелл. Схема Кауффмана-Уайта является каталогом диагностически-значимых антигенов сальмонелл. В настоящее время она включает более70 различных О-серогрупп и более 2400 серотипов. Схема постепенно расширяется за счет включения вновь описанных серотипов.

Возбудители брюшного тифа и паратифов А и В

 Брюшным тифом болеет только человек. Заражение происходит перорально (через рот). Попадая в тонкий кишечник, микробы проникают в его лимфатический аппарат (пейеровы бляшки и солитарные фоликулы), в которых усиленно размножаются. По времени это соответствует инкубационному периоду (10 – 14 дней).

Из лимфоузлов сальмонеллы попадают в общий ток лимфы, а затем в кровь, вызывая бактериемию. С кровью они проникают в костный мозг и селезенку, колонизируя отдельные участки этих органов, и заносятся в желчный пузырь.

Таблица 9

Биохимические тесты для дифференциации сальмонелл

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Тест или субстрат | Salmonella | S. typhi | S. paratyphi A |
| TSI (трехсахарный агар) | –/кг | –/к | –/кг |
| H2S (на TSI) | + | + (слабо) | –/+ (слабо) |
| Индол\* | – | – | – |
| Цитрат Симмонса | + | – | – |
| Мочевина | – | – | – |
| Лизин | + | + | – |
| Аргинин | + | d | (+) |
| Орнитин | + | – | + |
| Подвижность\* | + | + | + |
| Мукат | + | – | – |
| Малонат | – | – | – |
| d-Тартрат | + | + | – |
| Рост в присутствии KCN\* | – | – | – |
| Глюкоза | кг | к | кг |
| Лактоза | – | – | – |
| Салицин | – | – | – |
| Дульцит | кг | – | кг на 2-й день |
| Сорбит | кг | к | кг |
| ONPG\* | – | – | – |

Примечание: к – образование кислоты; кг – образование кислоты и газа;

 \* – тест.

Там они интенсивно размножаются, поскольку желчь является для них элективной питательной средой. С желчью сальмонеллы проникают в двенадцатиперстную кишку, а затем вторично в тонкую кишку и пейеровы бляшки, где присутствуют Т-эффекторы ГЗТ, выделяющие цитокины. В конечном итоге, это приводит к иммунному воспалению, в результате которого может произойти разрыв стенки кишки и возникнуть перитонит. При разрушении сальмонелл освобождается эндотоксин, после чего начинается интоксикация организма.

 Источником брюшного тифа является человек – больной или бактерионоситель. Брюшной тиф и другие сальмонеллезы являются инфекциями с фекально-оральным механизмом передачи. Основной путь передачи – через инфицированную воду рек и других водоемов, реже – через пищу; возможно заражение контактно-бытовым путем при непосредственном общении с инфицированным лицом.

Лабораторная диагностика

 Лабораторная диагностика строится в соответствии с патогенезом заболевания.

 Схема микробиологического исследования:

 Выбор материала для лабораторного исследования при подозрении на брюшной тиф и паратифы производится с учетом срока заболевания, обуславливающего определенную локализацию возбудителя в различные периоды заболевания.

 Наиболее ранним и достоверным методом диагностики брюшного тифа и паратифов следует считать выделение гемокультуры, так как бактериемия у больных возникает с конца инкубационного периода и продолжается в течение всего лихорадочного периода болезни. Частота выделения возбудителя из крови больного в 1-ую неделю заболевания достигает 100%. Со 2-рой недели процент положительных результатов уменьшается. Кровь для посева берут из вены локтевого сгиба: на первой неделе в количестве 10 мл, на 2-ой и 3-ей неделе – 15-20 мл.

 На второй неделе заболевания исследуют фекалии и/или мочу (посев на обогатительные и дифференциально-диагностические среды).

 В это же время проводят серодиагностику; ставят реакцию Видаля с О- и Н-диагностикумом.

 При подозрении на бактерионосительство материалом для исследования служат кал и моча (рис. 4).

 Схема выделения бактерий брюшного тифа, паратифа А и В сводится к следующему:

I день: Кровь больного в количестве от 10 до 20 мл засевают немедленно после взятия во флакон с 10 – 20% желчным бульоном (или на среду Раппопорт). Объем питательной среды для подавления бактерицидных свойств сыворотки должен в 10 раз превышать количество засеваемой крови.

 Испражнения засевают на среду Плоскирева, висмут-сульфит агар и среды обогащения. Посевы помещают в термостат при 37°С.

II день: Просматривают флаконы и чашки с посевами. Размножение бактерий в желчном бульоне в первые 2 – 3 дня после произведенного посева не всегда сопровождается помутнением среды.

 Из среды с первичным посевом крови, независимо от того имеются в ней внешне выраженные признаки микробного роста или нет, делают высев на чашки со средой Эндо.

 Отобранные с чашек подозрительные колонии засевают на агар Клиглера (посев сначала делают на скошенную поверхность, а затем уколом в столбик), среду с мочевиной, полужидкий агар (под пробку этой пробирки помещают индикаторную бумажку на индол). Производят высев со сред обогащения на среду Плоскирева и висмут-сульфит агар.

III день: 1. Просматривают посевы на среде Эндо с лупой 5 ˣ 10ˣ, чтобы не пропустить мелкие колонии.

 Бактерии брюшного тифа на среде Эндо образуют прозрачные, бесцветные колонии, иногда со слабым голубоватым оттенком.

 Три – пять колоний с признаками, характерными для тифо – паратифозных бактерий, отсевают на среду Олькеницкого. Посев делают сначала на скошенную поверхность, а затем уколом в глубину столбика.

2. Гемокультуры с желчного бульона или среды Раппопорт высевают на среду Плоскирева и висмут – сульфит агар.

3. Учитывают ферментативные свойства посеянных накануне культур. Культуры, не ферментирующие лактозу (скошенная поверхность агара Клиглера розово-малинового цвета), подвижные, образующие сероводород, не гидролизующие мочевину, не образующие индола, ферментирующие глюкозу с образованием кислоты, подозрительны на S. typhi.

4. Производят посев этих подозрительных культур на среду с лизином, цитратный агар Симмонса, среду Кларка, среды с углеводами для определения биоваров. Эти дополнительные характеристики необходимы для подтверждения родовой принадлежности выделенных штаммов.

5. Делают посев культур на скошенный агар для определения антигенной структуры сальмонелл.

IV день: 1. Просматривают чашки с посевом гемокультуры, отбирают подозрительные колонии

2. Учитывают ферментативные свойства по дополнительным тестам.

3. При обнаружении сальмонелл проводят определение О-, Н-, Vi-антигенов при помощи диагностических агглютинирующих сывороток в реакции агглютинации на стекле.

 Для определения чистоты выделенной культуры со среды Олькеницкого делают мазки, окрашивают их по Граму, микроскопируют.



Рис. 4. Схема микробиологического исследования при брюшном тифе и паратифе

Учитывают ферментативные свойства культуры, выросшей на среде Олькеницкого.

Тифо-паратифозные бактерии, не расщепляющие лактозы, не изменяют окраски скошенной поверхности, но окрашивают столбик среды вследствие ферментации глюкозы с образованием кислоты (столбик розовый). Паратифозные бактерии, расщепляющие глюкозу с кислото- и газообразованием, не только изменяют окраску столбика среды, но и вызывают в нем появление пузырьков газа.

 В этот же день приступают к изучению антигенной структуры этих бактерий, испытывая их в реакции агглютинации на стекле с набором агглютинирующих поливалентных и монорецепторных О- и Н-сальмонеллезных сывороток.

 Принцип идентификации культур монорецепторными сыворотками заключается в том, что в первую очередь определяется групповая принадлежность (по О-соматическим сывороткам), затем в пределах установленной группы определяют типовую принадлежность по жгутиковым Н-сывороткам к специфическим и неспецифическим фазам.

 На предметное стекло наносят одну или несколько раздельных капель сыворотки. В каждую каплю добавляют по небольшому количеству исследуемой культуры. Круговыми движениями петли культуру тщательно растирают в каплях сыворотки. При переносе из одной сыворотки в другую петлю прожигают. Результат реакции учитывают в течение 1 – 2 минут.

 Видовые неадсорбированные сыворотки (брюшнотифозные, паратифозные А, В-паратифозные) используют для постановки ориентировочной реакции агглютинации в разведении 1:25 – 1:50.

 Видовые адсорбированные сыворотки уже разведены и применяются в работе без дополнительного разведения.

 Для реакции агглютинации с О-сыворотками культуру берут с верхней части скошенного агара, для агглютинации с Н-сыворотками – из конденсационной воды (с нижней части скошенного агара).

 Идентификация выделенных культур проводится по следующей схеме:

 а) для установления принадлежности выделенной культуры к роду сальмонелл прежде всего ставят реакцию агглютинации на стекле с адсорбированной поливалентной сывороткой (групп А, В, С, Д, Е).

 При положительном результате реакции агглютинации, подтверждающем принадлежность исследуемого микроба к сальмонеллам, возникает необходимость в определении его серологической группы по Кауффману. Для решения этой задачи ставят реакцию агглютинации с каждой О-сывороткой, входившей в состав смеси.

 б) после установления серологической группы микроба определяют его серологический тип с адсорбированными монорецепторными Н-сыворотками против Н-антигенов специфической фазы сальмонелл, входящих в эту группу.

 в) заключительным этапом в изучении антигенной структуры сальмонелл

является постановка реакции агглютинации исследуемой культуры с монорецепторными Н-сыворотками, содержащими антитела против неспецифической фазы Н-антигена.

*Молекулярно-генетические методы типирования изолированных штаммов сальмонелл*

 В последние годы для лабораторной диагностики сальмонеллезной инфекции применяют различные молекулярно-генетические методы, позволяющие выявлять специфические фрагменты ДНК возбудителя в клиническом материале (экспресс-диагностика), а также типировать изолированные штаммы с целью выявления очага инфекции:

1. Оценка полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) плазмидной и хромосомной ДНК – успешно применяется для субтипирования изолятов сальмонелл.
2. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – широко используется для изучения вспышек сальмонеллезов, ограниченных во времени.
3. Метод пульс-гель-электрофореза – метод выбора для эпидемиологического типирования сальмонелл в эпидемиологических целях.

**Контрольные вопросы**

*Кокковые инфекции*

1. Какие компоненты образуют клеточную стенку грамотрицательных бактерий?
2. Какие компоненты образуют клеточную стенку грамположительных бактерий?
3. Какие морфологические структуры бактерий несут признаки антигенной чужеродности?
4. Какие кокковидные бактерии способны синтезировать каталазу?
5. Стафилококки. Классификация. Основные свойства, имеющие значение в патогенезе заболеваний. Какие свойства стафилококков дают основание считать их вирулентными?
6. Каково отношение стафилококков к глюкозе в аэробных и анаэробных условиях по тесту окисление/ферментация?
7. Какие тесты применяют для дифференцировки Staphylococcus aureus от прочих стафилококков? Почему для правильного выбора материала для лабораторного исследования необходимо знание патогенеза инфекции?
8. С какой целью проводится типирование (серотипирование, фаготипирование и т.д.) выделенного возбудителя инфекции в каждом отдельном случае?
9. Каковы объективные причины длительности бактериологической диагностики инфекций? За счет чего удается сократить сроки исследования при экспресс-диагностике

*Кишечные инфекции*

1. Эшерихии. Классификация. Факторы патогенности.
2. Шигеллы. Классификация. Основные свойства, имеющие значение в патогенезе заболевания?
3. Сальмонеллы. Классификация по антигенной структуре, основные свойства?
4. Какие признаки характерны для всех патогенных энтеробактерий?
5. На каких средах определяют ферментацию лактозы энтеробактериями?
6. Какая аминокислота должна присутствовать в среде для определения способности бактерий к образованию индола?
7. В каких случаях при лабораторной диагностики инфекции предпочтение отдается: а) микроскопическим методам; б) бактериологическим методам; в) серологическим методам?
8. Какие молекулярно-генетические методы применяют для лабораторной диагностики сальмонеллезной инфекции?
9. Какой серотип эшерихий имеет наибольшее эпидемиологическое значение?
10. Какой метод лабораторной диагностики дизентерии является основным?

**Список литературы**

1. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. – М.: МИА, 2002. – 734с.
2. Борисов Л.Б., Козьмин-Соколов Б.Н., Фрейдлин И.С. Руководство к лабораторным занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. – М.: Медицина, 1993. – 240с.
3. Джавец Э., Мельник Дж.Л., Эйдельберг Э.А. Руководство по медицинской микробиологии. – М.: Медицина, 1982. – Т. 2.- 383с.
4. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского, О.К. Поздеева. – М.: ГЭОТАР-Медицина, 1999. – 1200с.
5. Медицинская микробиология / Под ред. А.М. Королюка, В.Б. Сбойчакова. – СПб., 1999. – 272с.
6. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. А.А. Воробьева. – М.: МИА, 2004. – 691с.
7. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, А.С. Ещиной. – М.: Медицина, 2004. – 576 с.
8. Руководство по медицинской микробиологии. Частная медицинская микробиология и этиологическая диагностика инфекций / Под ред. А.С. Лабинской, Н.Н. Костюковой, С.М. Ивановой. – М.: Бином, 2010. – Кн. II. – 1152с.
9. Сбойчаков В.Б. Микробиология с основами эпидемиологии и методами микробиологических исследований. – СПб: СпецЛит, 2011. – 608 c.
10. Синюшина М.Н., Самсонова М.Н. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии. – М.: Медицина, 1974. – 165с.

Галина Егоровна **Копылова**

Галина Анатольевна **Кравченко**

ЧАСТНАЯ (МЕДИЦИНСКАЯ) МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Нижегородский государственный

университет им. Н.И. Лобачевского».

603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.

Подписано в печать . Формат 60×84 1/16.

Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура Тайме.

Усл. печ. л. . Тираж 100 экз. Заказ № .

Отпечатано в типографии Нижегородского госуниверситета

им. Н.И. Лобачевского

603600, г. Нижний Новгород, ул. Большая Покровская, 37

Лицензия ПД № 18-0099 от 14.05.01