МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ПРИМЕНЕНИЮ СЕЛЕКТИВНО-ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД С АНТИБИОТИКАМИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ШИГЕЛЛ

Москва — 1976

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

Утверждаю

Начальник Главного
санитарно-эпидемического управления
Министерства здравоохранения
СССР

В. Е. Ковшило

31 декабря 1974 г.
№ 1215-74

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ПРИМЕНЕНИЮ СЕЛЕКТИВНО-ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД С АНТИБИОТИКАМИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ШИГЕЛЛ

Москва — 1976

Разработаны: Украинским научно-методическим центром по антибиотикам (А. Б. Черномордиком, Т. В. Гринмаер, П. Г. Кожухарь)

Внесены: Киевским научно-исследовательским институтом инфекционных болезней Министерства здравоохранения УССР (директор Л. Ф. Фролов) и Лабораторным Советом при Санитарно-эпидемическом управлении Министерства здравоохранения УССР

Подготовлены и рекомендованы к утверждению:

Лабораторным Советом при Главном санитарно-эпидемическом управлении Министерства здравоохранения СССР

Применяемая в настоящее время методика бактериологической диагностики дизентерии не обеспечивает еще полного выявления возбудителей этой инфекции из испражнений больных и особенно бактерионосителей. Учитывая, что в последние годы среди шигелл доминируют варианты, устойчивые к левомицетину, тетрациклину и другим антибиотикам, в целях повышения высеваемости шигелл из испражнений рекомендуется добавлять соответствующие антибиотики, а также альбуцид натрия в среды Плоскирева и Левина, которые наиболее часто употребляются в лабораториях. Добавляемые антибиотики задерживают рост значительной части чувствительных к ним бактерий-сапрофитов, что облегчает выявление колоний шигелл, а также позволяет увеличивать посевную дозу испражнений и тем дополнительно повышает вероятность выявления шигелл.

Учитывая возможность циркуляции и чувствительных к антибиотикам шигелл, одновременно со средой с антибиотиками испражнения следует засевать и на чашку с обычной средой Плоскирева, что обеспечивает максимальную высеваемость возбудителей дизентерии, как антибиотикоустойчивых, так и антибиотикочувствительных.

Таблица 1

Концентрация антибиотиков и альбуцида в средах Плоскирева и Левина

№ среды	В 1 мл содержится (в мг/мл):			Среда применяется при наличии среди местных штаммов шигелл не менее 40–50% устойчивых:
	левомицетина	тетрациклина гидрохлорида	альбуцида натрия	
1	5	—	30	только к левомицетину **
2	25	—	-	только к левомицетину *
3	2	—	30	только к левомицетину **
4	- -	5	30	только к тетрациклину
5	5	5	- -	к левомицетину и тетрациклину одновременно

Примечание:

* — эти среды практически равноценны, и бактериолог выбирает любую из них;

** — применяются при широком распространении устойчивых шигелл; менее 40% левомицетиноустойчивых. Она особенно подходит для исследования больных острой дизентерией.

2. Приготовление питательных сред с антибиотиками

В таблице 1 приводятся концентрации антибиотиков для добавления их в соответствующие питательные среды. При выборе оптимальной среды следует учитывать, к какому препарату (левомицетину или тетрациклиновым антибиотикам) у выделяемых в данной местности шигелл чаще отмечается устойчивость. Исходя из этих данных, бактериолог выбирает одну из пяти указанных питательных сред, наиболее подходящую в данных условиях. Таким образом, их оптимальный состав не является постоянным, и его следует устанавливать индивидуально для различных мест, в различные годы и даже при отдельных вспышках дизентерии.

Питательные среды с антибиотиками приготовляются путем добавления соответствующих препаратов к среде Плоскирева. При недостатке этой среды как основу для сред с антибиотиками берут среду Левина, комбинируя ее со средой Плоскирева без антибиотиков. Только при полном отсутствии среды Плоскирева пользуются двумя чашками среды Левина: одной чашки — с антибиотиками и другой без них. Для торможения роста и строения протеев можно добавить еще 20 ед/мл пенициллина (как указывается далее). Применение среды Левина с антибиотиками дает почти такие же результаты, как и аналогичная среда, приготовленная на основе среды Плоскирева. А это позволяет заменять иногда дефицитную среду Плоскирева часто более доступной средой Левина, что особенно важно при эпидемических вспышках, когда может наблюдаться недостаток имеющихся сред.

Учитывая непригодность желчно-цитратных сред, типа среды Плоскирева, для выделения возбудителей дизентерии Григорьева-Шига, единственной элективной средой для их выделения является среда Левина с антибиотиками (левомицетином или тетрациклином), поскольку современные возбудители и этой формы дизентерии обычно устойчивы к указанным антибиотикам.

Таблица 2

Количество растворов антибиотиков и альбуцида добавляемые к среде

Среды №№	Количество миллилитров рабочего раствора в 1 мг/мл на 1 л среды:		
	левомицетина	тетрациклина гидрохлорида	альбуцида натрия
1	5	—	30
2	25	—	—
3	2	—	30
4	—	5	30
5	5	5	—

В расплавленную и охлажденную до 45—50° среду Плоскирева (или среду Левина) добавляют указанные в таблице 2 количества растворов антибиотиков. Затем среда тщательно, но осторожно (чтобы не вызвать появления пены) перемешивается и разливается по чашкам Петри. Перед засевом чашки сред с антибиотиками подсушиваются (как и обычная среда Плоскирева).

Антибиотики, а также альбуцид натрия, применяются в форме рабочих растворов, содержащих в 1 мл 1 мг (т. е. 1000 мкг) соответствующего препарата. Левомицетин берется в форме спирто-водного раствора, приготовляемого из чистого порошковидного препарата этого антибиотика: 50 мг левомицетина растворяют в 10 мл спирта, а затем стерильной дистиллированной водой доводят объем раствора до 50 мл. Растворы левомицетина и альбуцида можно сохранять (желательно в холодильнике) не менее месяца, плотно закупорив резиновой пробкой.

При отсутствии чистого левомицетина можно пользоваться и препаратом в таблетках. Для этого таблетка, содержащая 0,5 г левомицетина, измельчается в порошок в стерильной ступке и добавляется к 50 мл, а таблетка в 0,25 г — к 25 мл спирта. Смесь для лучшего растворения левомицетина в течение 1—2 часов несколько раз взбалтывают, а затем оставляют до полного просветления. Прозрачный раствор сливают с осадка, состоящего из наполнителя, входящего в состав таблеток. К 1 мл этой жидкости добавляют 9 мл стерильной дистиллированной воды, что дает раствор в 1 мг в мл. Левомицетин можно заменить его неочищенным препаратом — синтомицином: применяется такая же методика приготовления раствора, но он добавляется в среду в двойном количестве по сравнению с раствором левомицетина.

Раствор тетрациклина приготовляют обязательно из водорастворимого солянокислого препарата — тетрациклина гидрохлорида, обычно выпускаемого во флаконах по 100 мг (100 тыс. ед.). Применяемый 0,1% раствор (содержащий 1 мг/мл) приготовляют непосредственно перед изготовлением среды, так как при хранении раствора этот антибиотик легко выпадает в осадок в виде мелких кристаллов, которые затем можно растворить только после нагревания, что нежелательно, поскольку может отразиться на стабильности раствора. При отсутствии тетрациклина гидрохлорида его можно заменить равным количеством окситетрациклина (террамицина) гидрохлорида.

Альбуцид натрия обычно получают из аптек в форме 20—30% водного раствора, из которого приготовляют 0,1% ра-

створ (1 мг/мл), разводя стерильной дистиллированной водой в 200—300 раз (исходя из его содержания в аптечном растворе).

3. Применение сред с антибиотиками для выделения шигелл

Посев на питательные среды с антибиотиками лучше проводить взвесью исследуемых испражнений на физиологическом растворе или применяемом для их пересылки консерванте (глицериновый консервант, но лучше боратно-буферный консервант Израилимского и Теплицкой), отстоявшейся при комнатной температуре или на холоду 30—60 минут, как и посев на обычную среду Плоскирева. Однако, ввиду большей элективности среды, материалы для посева следует брать в 2—3 раза больше, чем при посеве на среду Плоскирева без антибиотиков.

Следует учитывать, что колонии шигелл на средах с антибиотиками по внешнему виду почти не отличаются от аналогичных колоний на средах без антибиотиков. Иногда они несколько меньшего размера и вырастают медленнее, чем на обычных средах. Поэтому просмотр засеянных чашек следует проводить 2 раза: после одного- и двухсуточного выращивания в термостате. При первом просмотре чашек колонии шигелл иногда бывают незначительных величин и не всегда достаточно характерны.

Рост различных бактерий-сапрофитов на средах с антибиотиками, как правило, значительно менее обилен, так как большинство этих микроорганизмов чувствительны к действию содержащихся в средах антибиотиков, имеющих широкий спектр антибактериальной активности. Поэтому при засеве испражнений на такие среды колонии сапрофитов нередко вообще не наблюдаются, а при отсутствии устойчивых шигелл чашки довольно часто остаются «стерильными». Это не должно смущать исследователя, указывая только на отсутствие в засеваемом материале антибиотикоустойчивых бактерий. Рост воздушной микрофлоры на средах с антибиотиками практически отсутствует. Среды с антибиотиками необходимо применять вместе с чашкой обычной среды Плоскирева. Это обеспечивает максимальную высеваемость шигелл.

Увеличение трудоемкости исследования, а также количества затрачиваемых питательных сред иногда используется как предлог, чтобы не применять среды с антибиотиками, однако этот не принципиальный недостаток полностью компенсируется значительным увеличением высеваемости шигелл (что является основной целью бактериологического исследования), а также некоторым уменьшением последующей работы по идентификации подозрительных колоний, количество

которых на средах с антибиотиками резко уменьшается. При выделении шигелл на средах с антибиотиками отпадает необходимость последующего определения их чувствительности к входящему в состав среды препарату. Ведь рост в присутствии применяемой концентрации антибиотика возможен только при устойчивости к нему бактерий.

В результате бактериостатического действия применяемых антибиотиков и альбуцида могут наблюдаться случаи запоса сапрофитов, сохранивших жизнеспособность на оставшейся «стерильной» поверхности среды вокруг колонии шигелл, вместе со снимаемыми с чашки колониями в среду с углеводами (среды Ресселя, Олькеницкого и др.). В результате в этих средах может наблюдаться сбраживание лактозы, что приводит к выдаче ошибочного отрицательного ответа. Аналогичное явление иногда вызывает и присутствие в толще колоний шигелл микроколоний кишечных палочек.

Поэтому весьма желательно проводить упрощенное серологическое исследование (агглютинация на стекле в поливалентной шигеллезной сыворотке) разлагающих лактозу культур, особенно вырастающих из типичных для шигелл колоний. В случае положительной агглютинации такую культуру следует рассеять на чашке среды Левина или Плоскирева и изучить вырастающие при этом колонии. При снятии подозрительных колоний со среды с антибиотиками категорически запрещается касаться петлей, с целью быстрого ее охлаждения, «стерильных» участков среды.

4. Устранение роста и роения протеев на средах с антибиотиками

Выделение шигелл в ряде случаев затрудняется присутствием в испражнениях больных протеев, поскольку исходная среда Плоскирева не препятствует их росту (хотя устраняет роение), а на среде Левина ясно выражено их роение. Это может осложнить выделение шигелл, если единичные, мелкие их колонии находятся среди значительного количества более крупных колоний протеев, имеющих сходство с колониями шигелл, поскольку оба микроорганизма не разлагают лактозу.

Особенно часто протеи обнаруживаются у лиц, длительно получавших левомицетин, препараты тетрациклиновой группы (тетрациклин, окситетрациклин, биомицин, рондомицин и др.), стрептомицин, сульфаниламиды, что нередко наблюдается у больных подострой и хронической дизентерией и другими длительно протекающими кишечными расстройствами. Развитие протеев в кишечнике этих больных объясняется их

устойчивостью к большинству применяемых при лечении кишечных инфекций антибактериальных препаратов, являясь одним из проявлений кишечного дисбактериоза.

Рост большинства (около 80%) штаммов протеев прекращается при содержании в среде небольшого количества пенициллина (20 ед/мл), к действию которого протеи значительно более чувствительны, чем большинство остальных кишечных бактерий, включая возбудителей дизентерии и колиэнтеритов. Поэтому в некоторых случаях, особенно при исследовании материала от длительно болеющих или долго получавших антибиотики лиц, рекомендуется добавлять к применяемой среде с антибиотиками еще 20 ед/мл пенициллина.

Для приготовления таких комбинированных сред на 1 л среды с левомицетином или тетрациклином добавляется еще 10 мл водного раствора пенициллина в 2 000 ед/мл (или 20 мл раствора в 1000 ед/мл).

В остальном приготовление среды проводится, как указано выше. Ввиду малой устойчивости растворов пенициллина, готовые среды, содержащие этот антибиотик, следует сохранять не более 2—3 дней.

5. Применение сред с антибиотиками методом градиентных чашек

В целях упрощения методики применения питательных сред с антибиотиками можно использовать метод градиентных чашек. При этом питательная среда заливается в чашку Петри в форме двух скошенных слоев, причем антибиотик содержится только в нижнем слое, из которого он в постепенно уменьшающейся концентрации проникает в соседние участки, а часть среды остается без антибиотика. Поэтому в градиентной чашке создаются условия, обеспечивающие рост различных по степени чувствительности к антибиотикам бактерий.

5. 1. Приготовление градиентных чашек питательной среды с антибиотиками

Берут чашку Петри диаметром не менее 10 см (стандартный сейчас размер). Если возможно, лучше применять чашки диаметром в 12—15 см, соответственно увеличивая объем наливаемой в чашку среды.

Под чашку подкладывают линейку (или другой плоский предмет) толщиной в 2—2,5 мм. Линейка должна находиться почти под серединой чашки так, чтобы последняя приняла несколько наклонное положение. Затем в десятисантиметро-

вую чашку наливают 5—6 мл среды Плоскирева или Левина с левомицетином (или тетрациклином) и альбуцидом натрия. Образовавшийся скошенный слой среды должен покрывать около трети поверхности дна чашки с одной ее стороны (рис. 1). После застывания этого слоя линейку убирают, чашку помещают горизонтально и наливают 10—12 мл среды Плоскирева (но не среды Левина!) без антибиотиков. Этот второй слой должен покрывать оставшуюся свободной поверхность дна чашки и около половины поверхности слоя среды с антибиотиком, чтобы общая поверхность среды в чашке была, по возможности, ровной. Таким образом, около трети поверхности дна чашки (с одной ее стороны) будет покрыта средой с антибиотиками, аналогичный участок с противоположной стороны чашки — средой без антибиотиков, а промежуточный между ними участок среды содержит антибиотик в постепенно уменьшающейся концентрации, что объясняется частичной диффузией препарата в верхний слой среды без антибиотиков. Количество проникающего в верхний слой антибиотика неодинаково, постепенно уменьшаясь с удалением от того края чашки, у которого содержится среда с антибиотиками. Неодинаковая толщина слоя среды с антибиотиком также способствует постепенному уменьшению содержания антибиотика в среде в центральном участке чашки.

В результате этого в одной градиентной чашке создаются условия для роста бактерий, которые соответствуют наблюдаемым, по крайней мере, в трех чашках: одной без антибиотика и двух чашках с разными его концентрациями. Это обеспечивает возможность развития на отдельных участках среды в одной градиентной чашке и высокоустойчивых, и слабо чувствительных, и высокочувствительных к действию взятого антибиотика бактерий.

Градиентные чашки следует приготавливать непосредственно в день их засева, чтобы избежать избыточной диффузии антибиотика в питательную среду, что может наблюдаться при длительном их хранении.

Выбор оптимальных антибиотиков для среды в градиентных чашках также зависит от распространения в данной местности и в данное время (и иногда и при отдельных вспышках дизентерии) шигелл, устойчивых к левомицетину и тетрациклиновым антибиотикам.

Если в обычных условиях для среды с тетрациклином оптимальным является содержание 5 мкг/мл этого антибиотика, то в градиентных чашках берется несколько большее его количество: 10—12 мкг/мл. Это объясняется особенностью

диффузии тетрациклиновых антибиотиков в агар, несколько отличающейся от диффузии левомицетина. Такая концентрация гидрохлорида тетрациклина (или террамицина) обеспечивает лучшее выделение шигелл на градиентных чашках, чем при 5 мкг/мл. Для приготовления сред с антибиотиками в градиентных чашках пользуются таблицей № 3.

Таблица 3

Среда	Количество миллилитров рабочего раствора в 1 мг/мл на 1 л среды для нижнего слоя градиентных чашек			Среда применяется при наличии не менее 40—50% шигелл, устойчивых;
	левомицетина	тетрациклина гидрохлорида	альбуцида натрия	
А	5	—	30	только к левомицетину
Б	—	10—12	30	только к тетрациклину
В	5	10	—	к левомицетину и тетрациклину одновременно

Примечание: альбуцид можно добавлять и в среду верхнего слоя (без антибиотиков).

5. 2. Засев градиентных чашек

Засев градиентных чашек лучше проводить взвесью исследуемых испражнений на физиологическом растворе или на консерванте, применяемом для сохранения исследуемых на шигеллы испражнений. Обычно употребляют 10% (приблизительно) взвесь.

На поверхность участка среды, содержащей максимальное количество антибиотика, наносится 2—3 капли взвеси испражнений (при исследовании материала, взятого у детей — 3—4 капли), а с другой стороны чашки (участок без антибиотиков) еще 1 капля взвеси. Затем взвесь тщательно растирают стеклянным или металлическим шпателем по поверхности среды: сначала от края чашки по участку, не содержащему антибиотика, к ее середине, а затем по участку среды с антибиотиком (от ее края к середине).

При исследовании испражнений детей на участок среды с антибиотиком засевают больше испражнений, чем при исследовании материала от взрослых, поскольку в кишечнике детей обычно содержится несколько меньше антибиотикоустойчивых сапрофитов, чем у взрослых людей. При взятии материала у взрослых желательно применять среды с немного увеличенным (на 15—20%) содержанием антибиотиков

(особенно тетрациклина), чем при исследовании испражнений детей.

Градиентные чашки (как и обычным образом приготовленные чашки с антибиотиками) следует просматривать 2 раза: после 1 и 2 суток нахождения в термостате. Колонии шигелл на участке среды с антибиотиком практически не отличаются от их колоний на среде без антибиотика. Дальнейшее биохимическое и серологическое изучение подозрительных колоний, снятых с градиентных чашек среды с антибиотиками, проводится по обычной методике.

Следует иметь ввиду, что высеваемость шигелл на градиентных чашках несколько меньше (на 10—12%), чем при засеве испражнений на две чашки: с антибиотиком и без него. Но высеваемость выше, чем на среде Плоскирева без антибиотиков и, тем более, чем на среде Левина. Этот метод рекомендуется при массовом обследовании, например, при эпидемических вспышках. Градиентные чашки, как и обычно приготовленные чашки сред с антибиотиками, особенно эффективны при исследовании испражнений, взятых у хроников и у лиц, переболевших дизентерией.

ОТРЫВНОЙ ЛИСТОК УЧЕТА

эффективности использования питательных сред с антибиотиками при бактериологической диагностике дизентерии

(Направлять в информационный вычислительный центр — г. Москва, Москворецкая набережная № 2а)

1. «Методические рекомендации по применению селективно-дифференциальных питательных сред с антибиотиками для выделения шигелл».

2. Утверждены 31.XII.1974 г. Начальником Главного санитарно-эпидемического управления Министерства здравоохранения СССР, № 1215-74.

3. Результаты применения метода:

положительные _____
(количество наблюдений)

неопределенные _____
(количество наблюдений)

отрицательные _____
(количество наблюдений)

Общее количество наблюдений _____

Наблюдения проводились с _____ 197 г. по

_____ 197 г.

4. Замечания и пожелания

Подпись

(должность, ФИО лица, заполнившего отрывной лист)

Л 44002 от 4/XI-1975 г. Зак. 1727 Тир. 500

Типография Министерства здравоохранения СССР

gost.e-ecolog.ru