МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ИВАНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ
им. А. С. БУБНОВА

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по выделению и идентификации энтерококков

Иваново, 1982

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ИВАНОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ
им. А. С. БУБНОВА

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

по выделению и идентификации энтерококков

Иваново, 1982

Методические рекомендации разработаны Ивановским государственным медицинским институтом им. А. С. Бубнова (ректор профессор **В. В. Кулемин**).

Автор кандидат медицинских наук **В. И. Седов**.

Рекомендованы к утверждению Лабораторным Советом при Главном санитарно-эпидемиологическом управлении Министерства здравоохранения СССР.

«УТВЕРЖДАЮ»

Зам. начальника Главного санитарно-эпидемиологического управления Министерства здравоохранения СССР

Э. М. Саакьянц

4 декабря 1981 г.
№ 2500-81

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЫДЕЛЕНИЮ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ЭНТЕРОКОККОВ

Роль энтерококков в инфекционной патологии человека в последние годы значительно возросла. Они являются возбудителями нагноительных раневых инфекций, заболеваний среднего уха, полости рта, миндалин, дыхательных путей, легких, желчного пузыря, желчных путей и мочеполовых органов. Вызывают энтериты, колиты, гастроэнтероколиты и инфекционно-токсический энтерит у детей. У детей раннего возраста поддерживают кишечные расстройства, создают условия, приводящие к развитию диспепсии, участвуют в воспалительном процессе червеобразного отростка, брюшины и параректальной клетчатки. Вызывают септические состояния, септический шок, бактериальный эндокардит, внутриутробную инфекцию плода и менингит у новорожденных. Обнаруживаются в монокультуре в содержимом осумкованных гнойных очагов, имеют значение как возбудители пищевых токсикоинфекций. Устойчивые к антибиотикам, вирулентные штаммы, циркулируя в хирургических, урологических и гинекологических отделениях больниц, обусловливают госпитальную инфекцию. В развитии заболевания часто участвуют в ассоциации с кишечной палочкой, протеем, стафилококками, псевдомонадами, анаэробами и другими представителями нормальной микрофлоры человека.

Выделение и, тем более, количественный учет энтерококков, участвующих в смешанных инфекциях, вызывают определенные затруднения. На обычных питательных средах, широко используемых в практических лабораториях, энтерококки могут быть не выявлены из-за их сравнительно медленного

роста и резко выраженной антагонистической активности ассоциантов.

Возбудителями энтерококковой инфекции в основном являются представители вида Str. faecalis. Подвижные энтерококки имеют значение при заболевании кишечника у детей и бактериальном эндокардите, роль Str. faecium в инфекционной патологии человека незначительна. При лабораторном исследовании это обстоятельство вынуждает определять выделенный штамм энтерококка до вида, подвида и биоварианта.

В практических бактериологических лабораториях обязательные исследования по выделению и идентификации энтерококков не проводятся, и они, как возбудители заболеваний, не регистрируются. Методических рекомендаций, предназначенных для этой цели, нет.

В лабораторной практике в настоящее время назрела необходимость в обязательном исследовании на энтерококки всех гнойно-септических процессов и проведение бактериологического контроля за циркуляцией возбудителя больничной инфекции. Для этой цели рекомендованы простые селективные плотные питательные среды, доступные любой бактериологической лаборатории, представлена краткая схема видовой идентификации энтерококков, включающая минимальное количество питательных сред, для каждого конкретного случая указан способ забора материала на исследование и показана последовательность лабораторной диагностики заболеваний.

Данные методические рекомендации могут быть использованы в практической работе врачами-бактериологами централизованных бактериологических лабораторий, бактериологических лабораторий санэпидстанций, лечебно-профилактических учреждений и НИИ, занимающихся этой проблемой.

1. НЕОБХОДИМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ И РЕАКТИВЫ

1.1. **Аппаратура.**

Автоклав электрический, обеспечивающий различные режимы стерилизации, ТУ 5-375-4166-73.

Термостат электрический. ТУ 64-1-1-80-72 или любой другой модели.

Шкаф сушильный электрический (от 40 до 200°С). ТУ-64-1--1411-76.

Дистиллятор электрический. ТУ 64-1-721-72.
Центрифуга низкоскоростная ЦЛК-1 или любая другая модель отечественного производства.
Весы технические. ТУ 64-1-1065-73.
pH-метр с точностью определения не менее ±0,2 единицы pH.

1.2. **Лабораторная посуда, материалы.**

Флаконы или колбы конические емкостью 100, 250, 500 мл.
Бутыли емкостью 5000 мл.
Пробирки по ГОСТ 7774-55.
Чашки Петри.
Стаканы лабораторные. ТУ 25-11-944-79.
Пипетки градуированные. ГОСТ 20292-74.
Шпатели деревянные или металлические. ТУ 64-1-84-72.
Ватные тампоны на металлических или деревянных палочках, вставленных в пробирки. ГОСТ 10515-75.

1.3. **Реактивы.**

Вода дистиллированная. ГОСТ 6709-72.
Агар питательный сухой. ТУ 42-14-33-75.
Автолизат дрожжевой для проготовления питательных сред. ТУ-6-09-3979-75.
Глюкоза безводная. ГОСТ 6038-51.
Натрий лимоннокислый. ГОСТ 22280-76.
Натрий хлористый. ГОСТ 4233-77.
Натрий углекислый (карбонат натрия Na_2CO_3). ГОСТ 4333-76.
Натрий двууглекислый. ГОСТ 2156-76.
Налидиксовая кислота (неграм, невиграмон-хиноин).
Калий теллуристокислый. ТУ 6-09-2050-77.
Кали едкое (гидроксид калия, КОН). ГОСТ 4203-65.
2, 3, 5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ). ТУ 6-09-3838-78.
Хлороформ. ТУ 6-09-4263-76.
Желчь крупного рогатого скота свежая, консервированная или сухая.
Кровь человека или животного (свежая, консервированная).
Молоко цельное, обезжиренное.
Кристаллический фиолетовый. МРТУ 6-09-5924-69.
Дрожжи хлебопекарские прессованные. ГОСТ 171-69.

2. КЛАССИФИКАЦИЯ И КРАТКАЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНТЕРОКОККОВ

По международной классификации энтерококки — представители семейства Streptococcaceae рода Streptococcus подразделены на два вида: Str. faecalis с подвидами Zymogenes и liquefaciens и Str. faecium.

Клетки энтерококков круглой, овальной или ланцетовидной формы, располагаются в виде диплококков, небольшими скоплениями, реже имеют одиночные кокки и цепочки, длина которых значительно варьирует. Количество цепочек увеличивается в средах с желчью, при выращивании на бульоне с детергентами или сурамином. Клетки подвижных энтерококков снабжены длинными волнистыми жгутиками. Грамположительны, спор не образуют. У отдельных, гемолитически активных, штаммов вида Str. faecalis, выделенных от больных, обнаруживается капсула. Полиморфны. Эта особенность проявляется резче при культивировании на средах с кристаллическим фиолетовым и теллуритом калия. Наряду с круглыми мелкими клетками встречаются раздутые, иногда неправильной формы и в виде коротких или толстых палочек. В организме больных диссоциируют в L-форму. Наиболее характерные и стабильные морфологические признаки имеют при культивировании на сахарном агаре или сахарном бульоне.

При росте в жидких средах вызывают диффузное помутнение и образование осадка. На плотных средах колонии энтерококков мелкие, круглые, с ровными краями, выпуклые, блестящие, при густом посеве сливаются в сплошной нежный налет. На средах с молоком, кровью или сывороткой образуют белый и лимонножелтый пигменты. Последний чаще наблюдается у подвижных энтерококков. Наличие белого и желтого каратеноидных, нерастворимых в воде пигментов затрудняет диагностику энтерококков, которых можно принять за стафилококка. На кровяном агаре, в зависимости от свойств и видовой принадлежности штамма, не изменяют эритроцитов, вызывают их гемолиз или образуют позеленение вокруг колоний вследствие превращения гемоглобина в метгемоглобин.

Хорошо переносят высокую и низкую температуру. Устойчивы к высушиванию, красителям, ко многим антибиотикам, налидиксовой кислоте и сульфаниламидным препаратам. Солнечный свет убивает энтерококков через несколько часов, дезинфицирующие растворы через 15—20 минут. В почве вы-

живают до шести недель. Длительно сохраняются на замороженных продуктах. В отличие от стрептококков других групп быстро размножаются в любых пищевых продуктах даже при комнатной температуре.

Энтерококки широко распространены во внешней среде, куда они попадают с испражнениями человека, животных, птиц и насекомых. У здоровых людей обнаруживаются в составе нормальной микрофлоры полости носа, полости рта, зева, носоглотки, кожи промежности и гениталий. Часто высеваются также из стерильно взятого грудного женского молока и с кожи рук. В содержимом кишечника присутствуют у всех людей без исключения, а в кишечнике детей нередко количественно преобладают над кишечной палочкой.

3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭНТЕРОКОККОВ

3.1. Взятие материала на исследование.

Для проведения бактериологического исследования материал должен быть взят по возможности до назначения антибактериальных препаратов, точно из больного органа, в достаточном количестве и доставлен в лабораторию в срок, не превышающий двух часов, зимой в утепленном контейнере, летом в контейнере со льдом.

Слизь из полости носа берут стерильным ватным тампоном на металлической или деревянной палочке, предварительно обработав наружные носовые отверстия 60% спиртом. До взятия материала тампон должен находиться в пробирке в таком положении, чтобы конец его располагался выше уровня стерильного 0,85% раствора хлористого натрия, налитого в количестве 0,5 мл. Этим раствором смачивают тампон, забирают им материал из обеих половин носовой полости и снова помещают в пробирку.

Из полости рта материал берут стерильным ватным тампоном. Тампоном обтирают слизистые оболочки щек, десен, языка и поверхность зубов. Материал из зева берут также стерильным ватным тампоном. При взятии слизи с поверхности миндалин следят за тем, чтобы тампон не касался слизистой оболочки полости рта и языка. При отсутствии обострения хронического тонзиллита исследуют содержимое лакун.

Сбор материала из зева можно производить также путем смыва. В этом случае через 2—3 часа после приема пищи об-

следуемый полощет горло 5 мл стерильного физиологического раствора. Полученный смыв собирают в стерильную колбу со стеклянными бусами, которую затем встряхивают в течение 10—15 минут до получения однородной суспензии.

Мокроту собирают натощак после чистки зубов и полоскания полости рта кипяченой водой. Первые порции мокроты удаляют, а последующие собирают в стерильную банку. Перед посевом мокроту рекомендуется также гомогенизировать. Для этого мокроту собирают в стерильную банку с бусами, в лаборатории добавляют в нее двойной объем физиологического раствора и встряхивают.

Содержимое желудка, двенадцатиперстной кишки, тонкого кишечника и желчь для бактериологического исследования получают при помощи желудочного или дуоденального зондов. Взятый материал помещают в стерильную посуду без консерванта и доставляют в лабораторию.

Материал из уретры берут стерильной платиновой петлей до мочеиспускания по возможности утром. В случае необходимости проводят массаж уретры.

Отделяемое влагалища можно собирать не только стерильным ватным тампоном, но и пипеткой, материал из которой после взятия помещают в стерильную пробирку. Из цервикального канала содержимое берут увлажненным стерильным тонким ватным тампоном, бактериальной петлей или другим устройством, входящим в шеечный канал.

Обычным стерильным ватным тампоном после удаления верхнего слоя гноя забирают также отделяемое язв, нагноившихся ран и ожоговой поверхности, предварительно обработав края раны спиртом или другими дезинфицирующими средствами. После снятия повязки раневую поверхность очищают от мази и некротических тканей.

Из спинно-мозгового канала, плевральной и брюшной полостей, придаточных пазух носа, Дугласова и поддиафрагмального пространств, осумкованных гнойных очагов содержимое получают пункцией или непосредственно при операции. Пунктат из шприца переносят в стерильную пробирку и сразу же направляют в бактериологическую лабораторию.

Для лабораторной диагностики септического шока, сепсиса, бактериального эндокардита и менингита берут кровь в количестве 5—20 мл стерильным шприцем из локтевой или другой подкожной вены при первом же подъеме температуры у больного по возможности до назначения антибактериальных препаратов. У детей кровь берут в меньшем объеме (1—

1,5 мл) из мочки уха, пяточной кости или мякоти пальца после тщательной обработки кожи спиртом. Взятую кровь тотчас же засевают у постели больного или в специально оборудованной комнате в сахарный бульон или тиогликолевую среду в соотношении 1 : 10 (9 частей питательной среды и 1 часть крови). Чтобы отличить истинный высев бактерий от загрязнения, посев крови рекомендуется делать одновременно в 2—3 флакона или колбы. Посевы немедленно доставляют в лабораторию и инкубируют при 37°С. Присутствие энтерококка или иного возбудителя во всех колбах или флаконах полностью исключает загрязнение. При транспортировке посевов надо следить за тем, чтобы не допустить смачивания ватных пробок средой.

При энтерококковом эндокардите возбудитель в крови обнаруживается непостоянно. Это обстоятельство обязывает делать посев крови больного при отрицательных результатах несколько раз. Однократное выделение энтерококка также является недостаточно убедительным. Доказательством этиологической роли обнаруженного микроорганизма считается не менее, чем двукратное его выделение.

Для обнаружения энтерококков в крови исследуют не только венозную кровь, но и артериальную, костный мозг. При этом проводят параллельное исследование и на выявление других возбудителей. За посевами наблюдают в течение двух недель, поскольку гемокультура может быть получена в разные сроки после посева крови.

С целью выявления бактериурии на анализ берут среднюю порцию утренней мочи, которую собирают в стерильную посуду в количестве 5—10 мл после проведения тщательного гигиенического туалета наружных половых органов и доставляют в лабораторию в течение часа. Посев мочи следует делать сразу же или не позднее четырех часов после взятия образцов, сохраняемых при комнатной температуре. В исключительных случаях пробы мочи разрешается хранить в холодильнике (4—6°С) не более суток.

На кишечный дисбактериоз исследуют испражнения, собранные непосредственно после дефекации. Из суден, горшков, специальных лотков и пеленок испражнения берут стерильным деревянным, металлическим шпателем или стеклянной палочкой, помещают в стерильные стеклянные стаканчики, закрывают стерильной бумажной крышкой и доставляют в бактериологическую лабораторию. Посев испражнений проводят в первые 2—4 часа после взятия проб.

При лабораторной диагностике пищевых токсикоинфекций исследуют остатки пищи, послужившей причиной заболевания, исходные продукты и полуфабрикаты, использованные для ее приготовления, рвотные массы, промывные воды желудка и испражнения пострадавших. Пробы берут в стерильные широкогорлые 200—300-миллилитровые банки с притертыми пробками, которые дополнительно закрывают стерильной бумагой и фиксируют ее бечевкой. Листы бумаги складывают в виде конвертов, собирают по несколько штук, завертывают в общий пакет и стерилизуют вместе с посудой. При отсутствии стерильной посуды допускается проводить отбор проб в любую посуду, предварительно подвергнутую кипячению в течение 15 минут.

Молочные продукты, супы, кремы и другие жидкие или полужидкие продукты перемешивают и берут в количестве 200 граммов. Остатки пищи берут непосредственно из той посуды, в которой они были обнаружены. Вторые блюда берут в количестве 1—2 порций и направляют в той же посуде, в которой они хранились, или помещают, с соблюдением правил асептики, в стеклянные банки. Продукты плотной консистенции (мясо, колбаса и др.) берут в количестве 500 г, птицу — целой тушкой, рыбу — 2—3 штуки, от крупной отрезают 2—3 куска из различных участков: вблизи жаберных дужек, спинку и в области анального отверстия.

Рвотные массы берут в количестве 50—100 мл, а промывные воды желудка — в количестве 100—200 мл. Рекомендуется по возможности исследовать первые порции промывных вод. Испражнения в количестве 5—10 г собирают из судна, горшка, специального лотка или пеленки стерильным деревянным шпателем или стерильной стеклянной палочкой непосредственно после дефекации из последней, более жидкой порции. Имеющиеся в испражнениях кровь, слизь или гной также включают в отбираемую пробу, и материал без консерванта доставляют в лабораторию.

С целью обнаружения энтерококков на различных предметах, материале и оборудовании в хирургических, урологических, гинекологических, а также инфекционных стационарах, особенно в отделениях с кишечными инфекциями невыясненной этиологии, бактериологическому исследованию подвергают смывы, полученные с поверхности контролируемых объектов. Смывы берут стерильными ватными тампонами или марлевыми салфетками. Для увлажнения тампонов в пробирки с ними наливают по 2 мл стерильного физиологическо-

го раствора. Смоченным тампоном, постоянно повертывая его, тщательно протирают контролируемую поверхность и помещают снова в пробирку. Встряхиванием пробирки тампон ополаскивают в жидкости и неоднократно отжимают о внутренние стенки пробирки. Марлевые салфетки размером 5×5 см стерилизуют в бумажных пакетах или в чашках Петри. Непосредственно перед омывом салфетку захватывают стерильным пинцетом, смачивают стерильным физиологическим раствором из пробирки, содержащей 2 мл его, протирают исследуемый объект, помещают в эту же пробирку и встряхивают. Смывы с небольших предметов получают со всей поверхности. С предметов, имеющих большую поверхность, смывы делают в разных местах общей площадью 100—200 см².

3.2. **Выделение энтерококков при заболевании дыхательных путей.**

В первый день исследования доставленный в лабораторию материал засевают на среду ЖЩА (см. приложение, п. 3) непосредственно тампоном, многократно поворачивая его, или наносят 0,1 мл гомогената и тщательно растирают шпателем по поверхности среды.

Мокроту выливают в стерильную чашку Петри, отбирают 2—3 комочка, промывают в стерильном физиологическом растворе и засевают на среду шпателем. Засеянные чашки ставят в термостат при 37°С.

На второй день посевы просматривают. При отсутствии роста чашку оставляют еще на сутки. Если обнаруживается рост энтерококков, то 2—3 колонии отвивают в пробирки с сахарным бульоном и инкубируют при 37°С в течение 6 часов. Выросшие на сахарном бульоне культуры идентифицируют по схеме (см. табл.), исключив из нее ЖЩА, поскольку эта среда была использована для первичного посева. После суточной инкубации при 37°С на дифференциально-диагностических средах регистрируют результат и дают окончательный ответ. На все исследование требуется 54—78 часов. Обнаружение в исследуемом материале гемолитически активных энтерококков рассматривают как положительный результат.

3.3. **Выделение энтерококков из гноя, раневого отделяемого, экссудата при разлитом перитоните и других источников.**

Бактериологическое исследование гноя желательно проводить при каждом гнойном процессе. Для обнаружения энтерококков гной, отделяемое язв, ожоговой поверхности и ран

первично засевают на чашки с ЕФ-агаром (см. приложение, п. 4) непосредственно тампонами, которыми отбирали материал для исследования. Из пунктатов густой консистенции предварительно готовят взвесь в стерильном физиологическом растворе в соотношении 1 : 2. Полученную взвесь и другой жидкий субстрат наносят в количестве 0,2 мл на среду и засевают шпателем. Засеянные чашки помещают в термостат на сутки. На второй день чашки просматривают и дают предварительный ответ — отрицательный при отсутствии роста на среде или указывают, что выделен Str. faecalis. На среде ЕФ растут только штаммы вида Str. faecalis, которые образуют черные колонии с бесцветным ободком. Теллурит калия, содержащийся в среде в высокой концентрации (0,07%), подавляет рост псевдомонад, резистентных к налидиксовой кислоте, и другую сопутствующую микрофлору. Штаммы вида Str. faecalis устойчивы к высокой концентрации теллурита калия, хорошо растут на этой среде, восстанавливают теллурит калия, образуя черные колонии с тонким бесцветным ободком, а сопутствующая флора не растет. В ряде случаев можно ограничиться этим исследованием. Для идентификации подвида с чашки снимают три колонии и засевают в пробирки с сахарным бульоном. Посевы инкубируют 6 часов. Бульонные культуры затем сеют секторами на чашку со средой ЭДДС (см. приложение, п. 5). Учет гемолитической активности проводят через 15—18 часов инкубации при 37°С. Ответ дают через 48—54 часа. Выделенные из содержимого гнойных очагов в чистой культуре или в ассоциации с другими бактериями штаммы Str. faecalis, особенно подвида Zymogenes, следует считать возбудителями данного процесса. По этой схеме исследуют содержимое желудка, предварительно нейтрализованное 10% раствором соды, 12-перстной кишки и тонкого кишечника.

3.4. **Выделение энтерококков из крови.**

Флаконы или колбы с посевами крови ежедневно встряхивают и через каждые 48 часов бактериальной петлей делают из них высевы на чашки с кровяным агаром. Посевы на чашках инкубируют при 37°С в течение суток. При наличии роста культуру внимательно изучают, готовят препарат-мазок, окрашивают одноэтапным методом окраски по Граму в модификации Г. П. Калины и микроскопируют. Если в препарате имеются овальные диплококки и короткие цепочки, состоящие из 4—8 кокков, исследуемый штамм с кровяного ага-

ра засевают уколом на 0,2% полужидкий агар для определения подвижности и секторами на среду ПС (см. приложение, п. 2) с таким расчетом, чтобы получить изолированные колонии.

На 0,2% полужидком агаре подвижные энтерококки через сутки вырастают диффузно по всему столбику агара или только в верхней половине его, а неподвижные виды — строго по уколу. На подтверждающей среде ПС через 24—48 часов из большого семейства стрептококков вырастают только энтерококки, видовую принадлежность которых легко определить по окраске колоний. Колонии Str. faecalis окрашиваются в вишнево-красный цвет, колонии Str. faecium остаются чаще бесцветными или окрашиваются в слаборозовый цвет, а колонии подвижных энтерококков в зависимости от индивидуальных особенностей штамма вырастают окрашенными или бесцветными. По этой схеме можно делать посевы всех, стерильно взятых, биологических жидкостей.

В тех случаях, когда возникает необходимость определить выделенный штамм энтерококка до подвида, культуру с кровяного агара идентифицируют по схеме (см. таблицу).

В случае обнаружения в крови двух или более видов бактерий, выделяют чистую культуру каждого микроорганизма и, соответственно, их идентифицируют.

У выделенного из крови штамма энтерококка параллельно определяют чувствительность к антибиотикам и дают заключение. При отрицательных результатах посева последний высев делают на 14 день. Если через сутки на чашке с кровяным агаром рост бактерий отсутствует, дают ответ, что посев крови стерилен.

3.5. **Выделение энтерококков из мочи.**

Количественную оценку бактериурии проводят по общепринятому методу посева мочи в виде мазка-штриха на 3—5% кровяной или простой агар и на среду Эндо для выявления возбудителей кишечной группы. Мочу перед посевом тщательно перемешивают, набирают полную стандартную (калиброванную) трехмиллиметровую бактериологическую петлю и засевают на сектора чашки Петри. На второй день учитывают результаты и определяют степень бактериурии. Доказательством бактериурии считают двукратное выявление в моче бактерий одного вида в количестве 10^5 клеток в 1 мл и более или многократное обнаружение определенного микроорганизма в количестве 10^4 бактерий в 1 мл.

Для выявления и количественного учета энтерококков 1 мл мочи центрифугируют при 3000 об/мин. в течение 30 минут. Весь осадок наносят на чашку со средой ЕФ (см. приложение, п. 4) и растирают по поверхности среды шпателем. Результаты учитывают после 18—24-часовой инкубации при 37°С. Подсчитывают количество выросших колоний на чашке и определяют содержание клеток энтерококков в 1 мл мочи. Дальнейшую идентификацию выделенной культуры можно не проводить, так как на этой среде растут только представители вида Str. faecalis.

При энтерококковой инфекции почек и мочевых путей число энтерококков в моче не всегда достигает таких высоких цифр, которые наблюдаются при инфекции грамотрицательной флорой. Обнаружение энтерококков в 10^3 —10^4 имеет диагностическое значение. В тех случаях, когда энтерококки участвуют в микст-инфекции, количество их может быть незначительным, но при повторном обнаружении они должны рассматриваться как возбудители заболевания.

3.6. **Бактериологическое исследование на кишечный дисбактериоз.**

Для количественного определения энтерококков в содержимом кишечника 1 г испражнений, доставленных без консерванта, тщательно размешивают стеклянной палочкой в 9 мл физиологического раствора (разведение 1 : 10) и дают отстояться 15—20 минут. Из приготовленной взвеси делают ряд десятикратных разведений до титра 1:100 000. При этом после каждого разведения пипетки меняют. Из двух последних разведений (1 : 10 000 и 1 : 100 000) 0,1 мл наносят на чашку со средой ЭДДС (см. приложение, п. 5) и материал равномерно распределяют по всей поверхности шпателем. Параллельно делают посев на 3—5% кровяной агар, среду Эндо, желточно-солевой агар и другие селективные среды для количественной регистрации всей микрофлоры кишечника.

Количество энтерококков в грамме фекалий определяют по числу выросших колоний, умноженному на 10 и на степень разведения. На этой среде можно определить общее количество энтерококков по числу выросших колоний, количество каждого вида энтерококка в отдельности по окраске колоний и число гемолитических и протеолитических подвидов и рассчитать на 1 г испражнений.

У здоровых людей количество энтерококков в 1 г испражнений колеблется в пределах 10^4 —10^9, число гемолитическо-

го подвида от 3,6 до 19,7%, а содержание протеолитического подвида составляет в среднем 17,6%.

Выделение энтерококков в чистой культуре или обнаружение повышенного содержания их, а также увеличение числа гемолитических представителей до 30% и выше в исследуемом материале надо оценивать как дисбактериоз кишечника.

3.7. Бактериологическое исследование при пищевых токсикоинфекциях.

Жидкие пищевые продукты, доставленные в лабораторию, засевают без предварительной обработки. Пищевые продукты, имеющие кислую реакцию, рвотные массы и промывные воды желудка перед посевом нейтрализуют 10% раствором двууглекислого натрия по универсальной индикаторной бумажке до pH 7,2—7,4.

Навески продуктов плотной консистенции берут в количестве 20—25 граммов из разных мест с поверхности и из глубины. Из тушек птиц берут участки, прилегающие к кишечнику, у рыбы вблизи жаберных дужек и анального отверстия. Навеску продукта нарезают мелкими кусочками, помещают в стерильную банку, добавляют небольшое количество 0,1% пептонной воды и встряхивают 10—15 минут. Крем, сливочное масло, мороженое и др. помещают в термостат или на водяную баню при 43°С для расплавления. Испражнения суспендируют в физиологическом растворе 1 : 10. Из продуктов и испражнений затем готовят десятикратные разведения 0,1% пептонной водой. Продукты до 10^{-7}, испражнения до 10^{-9}. Из каждого разведения 0,1 мл наносят на среду ЭДДС (см. приложение, п. 5). Посевы инкубируют при 37°С. Через 18—24 часа посевы просматривают. При этом обращают внимание на количественную обсемененность и видовую принадлежность выделенных энтерококков. Общее количество энтерококков определяют по числу выросших колоний, умноженному на 10 и на степень разведения. Для выявления протеолитических свойств посев оставляют еще на 24 часа.

В этих случаях можно пользоваться и средой ЕФ (см. приложение, п. 4), так как пищевые токсикоинфекции чаще вызывает протеолитический подвид Str. faecalis.

3.8. Выделение энтерококков с различных предметов, материала и оборудования больниц.

Полученные смывы в количестве 0,2 мл засевают шпателем непосредственно на чашки со средой ЖЩА (см. приложение,

п. 3). Кроме того, 0,2—0,3 мл засевают в среду накопления (сахарный бульон, содержащий 6,5% хлористого натрия) и инкубируют в течение суток при 37°С. При наличии роста, с солевого бульона делают высев на среду ЖЩА. Идентификацию выделенных штаммов со среды ЖЩА проводят по схеме (см. табл.), исключив из нее среду ЖЩА.

Для дифференциальной диагностики энтерококков по таблице чистые культуры засевают секторами на желчно-щелочной агар, на среду с теллуритом калия, на энтерококковую дифференциально-диагностическую среду, на среду с манни-

СХЕМА ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ ЭНТЕРОКОККОВ

ВИД И ПОДВИД	Рост на желчно-щелочном агаре	Резистентность к теллуриту калия	Энтерококковая дифференциально-диагностическая среда			Ферментация маннита	Полужидкий 0,2% агар (подвижность)
			редукция ТТХ	гемолиз	протеолиз		
Str. faecalis	+	+	+	—	—	+	—
Str. faecalis subsp. Zymogenes	+	+	+	+	±	+	—
Str. faecalis subsp. liquefaciens	+	+	+	—	+	+	—
Str. faecium	+	—	—	±	—	±	—
Подвижные энтерококки	+	+	+	±	—	+	+

Примечание: + положительный результат, — отрицательный, ± данный признак может быть у одних штаммов положительным, у других отрицательным.

том и полужидкий агар. Рост культуры на ЖЩА (см. приложение, п. 3) подтверждает принадлежность ее к энтерококкам. На этой среде они растут в виде слегка выпуклых круглых с ровными краями, серых, блестящих, непрозрачных гомогенных колоний средних размеров.

Резистентность к теллуриту калия, который используют для определения вида энтерококка, испытывают на сахарно-дрожжевом агаре (см. приложение, п. 1), содержащем 0,05% этой соли, или на среде ЕФ (см. приложение, п. 4). Штаммы вида Str. faecium на этих средах не растут, вида Str. faecalis

растут хорошо, образуя круглые, выпуклые, черные колонии, а подвижные энтерококки растут хуже, чем вида Str. faecalis.

На энтерококковой дифференциально-диагностической среде (см. приложение, п. 5) все энтерококки растут хорошо. Многие штаммы при росте вызывают побурение среды за счет выделения кислых продуктов метаболизма. В связи с этим, предварительный учет гемолитической активности следует проводить через 16—18 часов инкубации. У гемолитически активных штаммов появляются белые зоны (цвет молочного агара) или зоны позеленения среды. К концу суток колонии вида Str. faecalis приобретают вишнево-красный цвет, колонии вида Str. faecium остаются чаще бесцветными или белыми. У подвижных энтерококков, особенно при первичном посеве материала, колонии карликовые, плохо восстанавливают ТТХ и окрашиваются формазаном слабо. У окрашенных колоний, при изучении их под микроскопом, зона светлого кольца примерно в два раза шире, чем у колонии Str. faecalis.

Вокруг колоний энтерококков, вызывающих протеолиз молока, образуются четкие темно-красные или бурые зоны, а при наличии протеолитического фермента и фермента, лизирующего эритроциты, среда вокруг колоний просветляется (цвет обычного питательного агара). Культуры, не продуцирующие этих энзимов, среду не изменяют.

Ферментацию маннита испытывают в полужидкой среде Гисса с дрожжевым автолизатом и бромкрезоловым пурпурным. Подвижность проверяют на полужидком 0,2% агаре.

Таким образом, с помощью небольшого набора питательных сред в любой бактериологической лаборатории можно проводить выделение, количественный учет и идентификацию энтерококков в материале, полученном от больных, с различных предметов и оборудования больниц. В каждом конкретном случае врач-бактериолог должен использовать соответствующую питательную среду и оценивать результат индивидуально.

4. ПРИЛОЖЕНИЕ

4.1. Питательные среды.

1. ОСНОВНАЯ СРЕДА (сахарно-дрожжевой питательный агар). Сухого питательного агара Дагестанского НИИ питательных сред 35 г, дрожжевого автолизата 20 мл, глюкозы 10 г, дистиллированной воды 1000 мл. Расплавляют при на-

гревании, фильтруют и стерилизуют при 112°С 15 мин. Среда должна иметь pH 7,2—7,4.

2. ПОДТВЕРЖДАЮЩАЯ СРЕДА (ПС). Основной среды 1000 мл, лимоннокислого натрия 20 г, хлористого натрия 55 г. Стерилизуют автоклавированием при 112°С 15 минут. В охлажденный до 40—50°С агар вносят лошадиную сыворотку 50 мл, налидиксовую кислоту 0,1 г, затем перемешивают и разливают в стерильные чашки.

3. ЖЕЛЧНО-ЩЕЛОЧНОЙ АГАР (для выделения и количественного учета энтерококков). Компоненты основной среды, рассчитанные на 1000 мл, растворяют в 600 мл дистиллированной воды, вносят свежую бычью желчь 400 мл, карбонат натрия 5 г. Стерилизуют автоклавированием при 112°С 15 минут. При отсутствии свежей бычьей желчи можно использовать желчь медицинскую, желчь сухую обезвоженную или вносить эквивалентное количество желчных солей. Перед разливкой в чашки добавляют 50 мл свежей (консервированной) крови человека или животного, 12,5 мл 0,01%-ного раствора кристаллического фиолетового и 20 мл 10%-ного раствора гидроксида калия (КОН). Для выделения и идентификации энтерококков эту среду можно использовать и в жидком виде.

4. ЕФ-АГАР (для выделения и количественного учета Str. faecalis). Основной питательной среды 1000 мл, лимоннокислого натрия 5 г. Стерилизуют при 112°С 15 минут. Перед разливкой среды в стерильные чашки добавляют 50 мл лошадиной сыворотки, 0,1 г налидиксовой кислоты и 0,7 г (35 мл 2%-ного водного раствора) теллурита калия.

5. ЭНТЕРОКОККОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ СРЕДА (среда ЭДДС). Компоненты основной среды, рассчитанные на 1000 мл, растворяют в 800 мл дистиллированной воды. Стерилизуют автоклавированием при 112°С 15 минут. Перед разливкой в чашки добавляют ТТХ 0,1 г, 12,5 мл 0,01%-ного водного раствора кристаллического фиолетового, 0,1 г налидиксовой кислоты, стерильного обезжиренного молока, подогретого до 40—50°С 200 мл, свежей дефибринированной или консервированной человеческой крови 50 мл. Перемешивают и разливают по 7 мл в стерильные чашки.

4.2. **Способ приготовления дрожжевого автолизата.**

На простых питательных средах энтерококки растут плохо. Для стимуляции роста этих бактерий в состав сред обяза-

тельно включают углеводы и дрожжевой автолизат. Дрожжевой автолизат можно приготовить в любой бактериологической лаборатории. Измельчают 1 кг прессованных хлебопекарских дрожжей, помещают в пятилитровую бутыль и ставят в сушильный электрический шкаф при 60°С на 72 часа. По мере разжижения дрожжей содержимое бутыли перемешивают несколько раз в сутки. Конец автолиза характеризуется полным разжижением дрожжей, а автолизат приобретает коричневый оттенок и приятный запах. По окончании автолиза в бутыль наливают 3 литра теплой воды, содержимое перемешивают, разливают в небольшие колбы или флаконы и автоклавируют при 112°С 20 минут. После стерилизации пробки флаконов или колб для герметичности закрывают парафинированной бумагой и хранят в холодильнике. Для постоянного применения отстоявшийся в течение недели просветленный автолизат сливают в стерильную колбу или флакон и консервируют хлороформом. На 100 мл автолизата берут 5—10 мл хлороформа.

Автолизат дрожжевой для приготовления питательных сред (ТУ 6-09-3979-75) в настоящее время выпускается научно-производственным объединением «Биохимреактив». Представляет собой аморфный порошок желтовато-коричневого цвета; содержание аминного азота — 2,5%, воды — 10%, потери при высушивании — 9%. Цена — 110 руб. за килограмм.

Вместо автолизата дрожжевого можно использовать Экстракт дрожжевой для приготовления питательных сред (ТУ 6-09-3462-73), выпускаемый этим же объединением. Содержание аминного азота — не менее 1,5%; содержание воды — не более 9%. Цена — 125 руб. за 1 кг.

Заказы направлять по адресу: 229014 гор. Олайне Латвийской ССР, НПО «Биохимреактив». Расчетный счет № 324402 в Ленинском отделении Госбанка гор. Риги.

Подписано к печати 15.01.82. Формат издания 60×84 1/16. Печ. л. 1,5.
Усл. п. л. 1,3. Зак. 242. КЕ-03075. Тир. 5000
Типография УУЗ Минэнерго СССР, г. Иваново, ул. Ермака, 41
gost.e-ecolog.ru