Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Фенотипическая идентификация бактерий рода *Corynebacterium*

Методические рекомендации
МР 4.2.0020—11

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.9
Ф42

Ф42 **Фенотипическая** идентификация бактерий рода *Corynebacterium*: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.—55 с.

1. Разработаны НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, г. Санкт-Петербург (Г. Я. Ценева – заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор, Л. А. Краева – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник); Харьковской медицинской академией последипломного обучения (Ж. Н. Манина – кандидат медицинских наук, доцент); Институтом экспериментальной и клинической ветеринарной медицины, г. Харьков (О. В. Шаповалова – кандидат биологических наук, С. В. Бирюкова – доктор медицинских наук, профессор); Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Ю. В. Демина – кандидат медицинских наук, заместитель начальника управления эпидемиологического надзора).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 11 мая 2011 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.9

© Роспотребнадзор, 2011
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011

Содержание

Введение 4
1. Показания и противопоказания к применению метода 6
2. Материально-техническое обеспечение метода 6
3. Описание метода 8
3.1. Микробиологическая характеристика коринеформных бактерий 8
3.2. Биологические особенности и роль отдельных видов коринебактерий в патологии человека и животных 15
3.3. Ход лабораторного исследования биологического материала при идентификации недифтерийных коринебактерий 30
3.4. Дифференциальная диагностика коринебактерий от других палочковидных грамположительных бактерий 31
4. Приложения 38
4.1. Питательные среды для культивирования и идентификации коринебактерий 38
4.2. Контроль качества питательных сред, референс-штаммы *Corynebacterium*, хранение музейных культур 55
Список литературы 56

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
11 мая 2011 г.
Дата введения: с момента утверждения

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Фенотипическая идентификация бактерий рода *Corynebacterium*

Методические рекомендации МР 4.2.0020—11

Введение

В методических рекомендациях представлены современные сведения о таксономии, биологических особенностях и роли коринебактерий в патологии человека и животных. Основное внимание уделяется методам фенотипической идентификации и дифференциальной диагностики представителей рода *Corynebacterium* от других грамположительных палочковидных бактерий, в т. ч. *C. diphtheriae*, имеющих клиническое значение. Приведенные адаптированные диагностические таблицы и методики приготовления необходимых питательных сред и реагентов рекомендуются для практического применения в лабораториях клинической и ветеринарной микробиологии.

Коринебактерии часто встречаются во внешней среде и обычно колонизируют кожу и слизистые оболочки человека и животных, являясь представителями микроценозов данных биотопов. Роль этих микроорганизмов в развитии заболеваний человека и животных установлена недавно. В зависимости от биологических особенностей разные виды коринебактерий способны поражать кожу и внутренние органы, особенно у пожилых людей, пациентов с иммуносупрессией или мультиорганной патологией. В случаях инфицирования венозных или брюшных катетеров, нейрохирургических шунтов наблюдается бактериемия. Многие представители коринебактерий становятся причиной эндокардитов,

пневмоний, септического артрита и остеомиелита, инфекций при протезировании, заболеваний мочеполовой системы. В связи с этим в клинической практике необходима точная идентификация бактерий данной группы, что позволит правильно и своевременно выбрать этиотропную терапию. Однако в настоящее время фенотипическая идентификация большинства видов коринебактерий затруднена из-за отсутствия информативных диагностических схем и таблиц, а также из-за дефицита оперативных сведений о роли их в патологии человека и животных.

Определяющий вклад в успешную идентификацию коринебактерий внесли автоматизированные и полуавтоматизированные системы, методы родовой и видовой идентификации на основе анализа 16S рРНК. К сожалению, использование сложных и дорогостоящих хемотаксономических исследований, проведение молекулярно-генетического анализа доступно малому числу лабораторий. В практической работе в основном применяются традиционные, общепринятые, «пробирочные» тесты. Кроме того, эти тесты незаменимы, когда идет проверка диагностической эффективности новых тест-систем. В этих случаях рутинные тесты, как «золотой стандарт», помогают решать многие спорные вопросы нетрадиционных методов идентификации возбудителей инфекционных заболеваний.

В настоящее время род *Corynebacterium* насчитывает 40 медицински значимых видов (и две таксонные группы). Традиционно основой их идентификации и дифференциации является метаболический профиль. Выявление фенотипических особенностей коринебактерий проводится на основе определения наличия или отсутствия сахаролитических энзимов и других ферментных систем. Однако вследствие морфологических и биохимических особенностей коринебактерий их идентификация нередко затруднена. Для получения достоверных сведений о характеристике вида становится необходимым использование наиболее информативных биохимических тестов и качественных питательных сред.

В рекомендациях представлены сведения о наиболее значимых видах коринеформных грамположительных палочек и их роли в патологии человека и животных. Помимо прописей питательных сред и необходимых комментариев по их использованию, приводятся оптимальные схемы их биохимической идентификации с минимальным и наиболее информативным набором тестов. Многие из этих методов характеризуются достаточно высокой воспроизводимостью, точностью, быстротой выполнения и приемлемой стоимостью.

В методических рекомендациях обобщены данные литературы, собственный опыт работы и опыт практических бактериологических лабораторий по морфологической и биохимической идентификации микроорганизмов рода *Corynebacterium*.

1. Показания и противопоказания к применению метода

Дифференцирование коринебактерий следует проводить в соответствии с приведенным ниже перечнем биохимических признаков во избежание гипо- и гипердиагностики заболеваний, которые они вызывают.

Противопоказаний нет.

2. Материально-техническое обеспечение метода

Оборудование

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности	ГОСТ 24104—80Е
Весы лабораторные 4-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 1 000 г	ГОСТ 24104
Иономер универсальный ЭВ-74 или потенциометр рН-340	ГОСТ 9245—79
ОБМ-150 или других марок	ТУ 16-535—84
Термостат, позволяющий поддерживать температуру 15—65 °С с отклонением от заданной 1 °С	ТУ 64-1-1382—72
Шкаф сушильный стерилизационный ШСС-80П или других марок, позволяющий поддерживать температуру (160 ± 5) °С	ТУ 64-1-9009—74
Холодильник электрический бытовой	ГОСТ 16317
Микроскоп световой биологический с увеличением 900—1 000	ГОСТ 8284
Автоклав вертикальный	ГОСТ 9586
Лупа с увеличением 5—10 ×	ГОСТ 8309
Термометр (ртутный) с диапазоном измерения от 0 до 100 °С	ГОСТ 28498—90

Материалы

Стекла предметные	ГОСТ 9284
Стекла предметные для микроскопов	ГОСТ 6672—75
Стекла покровные, 2 уп.	ГОСТ 6672
Пинцет медицинский	ГОСТ 212241
Скальпель медицинский	ГОСТ 21240
Ножницы медицинские	ГОСТ 21239
Часы песочные на 1, 2 и 5 мин	ГОСТ 10576
Чашки Петри	ГОСТ 25336
Спиртовки СЛ-1	ГОСТ 25336
Ступки фарфоровые с пестиком	ГОСТ 9147

Пробирки стеклянные бактериологические П2-10-90 ХС; П3-5ХС	ГОСТ 25336
Пробирки для микропроб однократного применения (пробирки Эппендорфа)	ТУ 64-2-300—80
Пипетки 7-1-1; 7-1-2; 7-1-5; 7-1-10; 8-2-0,1	ГОСТ 20292
Пипетки исполнения 5, 1-го, 2-го классов точности	ГОСТ 29227—91
Стаканы В-1-250 ТС; Н-2-100 ТХС	ГОСТ 25336
Колбы К-2-250-34 ТХС; П-2-250-34 ТХС	ГОСТ 25336
Воронки стеклянные	ГОСТ 25336—82
Бутылки стеклянные для химических реактивов	ГОСТ 15844—92
Кастрюли эмалированные	ГОСТ 24778—81
Цилиндры 2-100; 4-100; 4-25	ГОСТ 1770
Марля медицинская	ГОСТ 9412
Воронки В-36-80ХС; ВФ-1-75ХС	ГОСТ 25236
Вата медицинская гигроскопическая	ГОСТ 5556
Бумага фильтровальная лабораторная	ГОСТ 12026
Бумага парафинированная	ГОСТ 9569

Реактивы и питательные среды

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709—72
Спирт этиловый ректификованный	ГОСТ 18300—87
Агар микробиологический	ГОСТ 17206
Глюкоза, хч	ГОСТ 6038—79
Мясо-пептонный бульон	ГОСТ 20730
Масло иммерсионное	ГОСТ 13739
Мочевина, хч	ГОСТ 6691
Глицерин, хч	ГОСТ 6259
Мел химический осажденный	ГОСТ 8253
Глюкоза кристаллическая, хч	ГОСТ 975
Пептон сухой ферментативный	ГОСТ 13805
Масло вазелиновое медицинское	ГОСТ 3164
Натрий хлористый, хч	ГОСТ 4233
Натрий двууглекислый	ГОСТ 4201
Натрий фосфорно-кислый однозамещенный, чда	ГОСТ 245
Натрий фосфорно-кислый двузамещенный безводный, чда	ГОСТ 11773
Калий фосфорно-кислый однозамещенный, чда	ГОСТ 4198
Калий фосфорно-кислый двузамещенный, чда	ГОСТ 2493
Сахароза, хч	ГОСТ 5833
Йод	ГОСТ 4149
Натрий гидроокись	ГОСТ 4328
Соль Мора	ГОСТ 4208

3. Описание метода

3.1. Микробиологическая характеристика коринеформных бактерий

Коринеформные бактерии – плеоморфные палочковидные грамположительные микроорганизмы, относящиеся к классу *Actinobacteria,* объединенные по 16S рРНК. Проведенные хемотаксономические исследования позволили найти общие черты среди коринеформных бактерий в целом, а также дифференцировать между собой отдельных их представителей. Многие из них представляют интерес для медицины и ветеринарии. Термин «коринеформные» связан с плеоморфной палочковидной формой этих грамположительных бактерий. Термин «дифтероиды» в последнее время не употребляется, т. к. большинство видов не имеют сходства с *Corynebacterium diphtheriae* – основным патогенным микроорганизмом группы.

По типу дыхания одни из них – облигатные аэробы, другие – факультативные анаэробы либо строгие анаэробы со своими морфологическими особенностями и различной каталазной активностью, в отдельных случаях обладающие подвижностью. Всех их отличает отсутствие эндоспор.

Обычно наличие плеоморфных неспорообразующих грамположительных палочек с характерным расположением в виде V-форм и палисада обусловливает отнесение к группе. Следует также отметить, что некоторые виды в жизненном цикле имеют фазы палочки-кокки с преобладанием палочек в молодых культурах. Некоторые виды очень плохо растут на средах без липидов, а на средах с 0,5—1,0 % Твин-80 растут хорошо, в 1—2 дневных культурах формируют колонии диаметром 1 мм. Такие штаммы называют «липофильными».

Представители группы – преимущественно облигатные представители слизистых оболочек и кожных покровов млекопитающих, но иногда обнаруживаются и в других источниках. В настоящее время коринеформные бактерии включают 19 родов на основе хемотаксономических признаков. По мере накопления знаний таксономическое положение многих видов пересматривается.

Среди представителей коринеформных бактерий имеются клинически значимые роды или виды отдельных родов (*Corynebacterium*, *Turicella*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Dermabacter*, *Rothia*, *Exiguobacterium*, *Oerskovia*, *Cellulomonas*, *Cellulosimicrobium*, *Microbacterium*, *Curtobacterium*, *Leifsonia*, *Arcanobacterium*, *Gardnerella*) (табл. 1).

Таблица 1

Идентификация медицински значимых коринеформных бактерий

Таксон	Ката-лаза	Фер-мен-тация/ окис-ление	Нит рат-ре-дук-таза	Уре-аза	Гид-ро-лиз эску-лина	Образование кислоты из					Другие свойства
						глю-ко-зы	маль-то-зы	саха-харо ро-зы	ма-ни-тола	кси-ло-зы	
Turicella otitidis	+	О	–	–	–	–	–	–	–	–	CAMP-тест +, длинные палочки
Arthrobacter spp.	+	О	V	V	V	V	V	V	–	–	
Brevibacterium spp.	+	О	V	–	–	V	V	V	–	–	Запах сыра
Dermabacter hominis	+	Ф	–	–	+	+	+	+	–	V	Маленькие палочки
Rothia dentocariosa	V	Ф	+	–	+	+	+	+	–	–	Могут давать серо-черный пигмент
Exiguobacterium acetylicum	+	Ф	V	–	+	+	+	+	+	–	Золотисто-желтый пигмент
Oerskovia turbata	+	Ф	+	–	+	+	+	+	–	+	Не гидролизуют ксантин
Cellulomonas spp.	+	Ф	+	–	+	+	+	+	V	+	
Cellulosimicrobium spp.	+	Ф	V	V	+	+	+	+	–	+	Гидролизуют ксантин
Microbacterium spp.	V	Ф/О	V	V	V	+	+	V	V	V	
Curtobacteirum spp.	+	О	–	–	+	+	V	V	V	+	
Leifsonia aquatic	+	О	V	–	V	+	V	V	+	+	
Arcanobacterium haemolyticum	–	Ф	–	–	–	+	+	V	–	–	Ингибирование CAMP-теста
Arcanobacterium pyogenes	–	Ф	–	–	V	+	V	V	V	+	
Arcanobacterium bernardiae	–	Ф	–	–	–	+	+	–	–	–	Крахмал-позитивные
Gardnerella vaginalis	–	Ф	–	–	–	+	+	V–	–	–	Потеря цвета при окраске по Граму

+ – позитивная реакция; – – негативная реакция; V – вариабельная реакция; О – окисление; Ф – ферментация.

Роль представителей других родов и видов не всегда ассоциируется с заболеваниями человека и животных. Они являются представителями нормофлоры кожи и слизистых оболочек, а также обнаруживаются в пищевых продуктах и окружающей среде.

В настоящее время коринеформные бактерии делят на роды на основе особенностей строения клеточной стенки и содержания G + C пар в ДНК. Ниже приведена краткая характеристика клинически значимых родов коринеформных бактерий.

Corynebacterium

Род был описан в 1896 г. Lehmann и Neumann, к нему относятся возбудитель дифтерии и другие морфологически подобные родственные микроорганизмы в количестве 67 видов (и двух таксонных групп), из которых 40 видов (и две таксонные группы) имеют медицинское значение. Это в основном палочки от прямых до слегка изогнутых с неравномерно окрашивающимися частями цитоплазмы, часто имеющие метахроматические гранулы. В мазках, как правило, одиночные или в парах, часто V-образной конфигурации, либо в стопках из нескольких параллельно лежащих клеток. К такому угловому и палисадному расположению клеток приводит «щелкающее» (snapping) деление. Обычно неподвижные, грамположительные, некислоустойчивые, каталазоположительные.

Клеточная стенка содержит мезо-диамино-пимелиновую кислоту и короткоцепочечные миколовые кислоты с 22 и 36 атомами углерода, арабинозу и галактозу. Пальмитиновая, олеиновая и стеариновая кислоты являются основными клеточными жирными кислотами у всех коринебактерий. Содержание G + C пар в ДНК колеблется от 46 до 74 mol%.

Углеводный метаболизм смешанный – бродильный и дыхательный. Не образуют растворимых гемолизинов, но на твердых питательных средах, содержащих кровь морской свинки или барана, возможен краевой гемолиз. Некоторые виды образуют экзотоксин.

Turicella

Эти коринеформные бактерии чаще всего выделяются от больных со средним отитом. Фенотипически они напоминают коринебактерии, но более длинные. Содержание G + C пар в ДНК составляет 65—72 mol%. Все штаммы проявляют резко положительную реакцию в CAMP-тесте. Колонии выпуклые, кремового цвета, с ровным краем, диаметром 1—1,5 мм через 48 ч инкубации.

Arthrobacter

Штаммы *Artrobacter* широко распространены в окружающей среде и выделяются из клинического материала от людей при бактериемии, различных инфекционных процессах, особенно мочевого тракта человека. Содержание G + C пар в ДНК составляет 59—70 mol%. Колонии белова-

то-серые, 2 мм и более в диаметре, немного блестят. При окраске по Граму через 24 ч инкубации выглядят как коринебактерии, через 72 ч – как коккобациллы. Артробактерии можно легко спутать с бревибактериями, т. к. они имеют сходную морфологию колоний и окислительный метаболизм. Однако штаммы *Artrobacter* могут быть подвижными, в то время как штаммы *Brevibacterium* всегда неподвижны. Многие штаммы *Brevibacterium* дают запах сыра, чего не наблюдается в случае штаммов *Artrobacter*.

Brevibacterium

Этот род был описан в 1980 г. (Collins et al.) с *B. linens* в качестве типового штамма. Некоторые виды *Brevibacterium* являются представителями нормальной флоры кожи человека и животных. Из 17 видов клинически значимы 7 видов, выделяющиеся при бактериемии, инфекционных процессах различной локализации. Более 90 % клинических изолятов *Brevibacterium* принадлежат к виду *B. casei*. Содержание G + C пар в ДНК составляет 59—70 mol%.

Эти микроорганизмы имеют кокко-бациллярную морфологию с преобладанием в молодых культурах палочковидных форм. Все они грамположительные, некислотоустойчивые и неподвижные. Строгие аэробы. Не требуют наличия липидов для роста. Некоторые *Brevibacterium,* в частности *B. Linens,* после 24 ч культивирования при 30 °С на питательном агаре образует колонии, имеющие слабый желто-оранжевый пигмент, диаметром около 1 мм. Если на эти колонии воздействовать концентрированной щелочью, появляется красное окрашивание, тогда как при добавлении концентрированной кислоты появляется зелено-голубой пигмент. Этот признак не характерен для окрашенных колоний микроорганизмов родов *Micrococcus, Mycobacterium* или *Staphylococcus.* В 24-часовых культурах при 37 °С *B. casei* и *B. epidermidis* образуют колонии диаметром около 1 мм, бело-серые, выпуклые и блестящие, но не проявляют реакций, как *B. linens.* Оптимальная температура для роста 30—37 °С, но рост возможен и при 40 °С. Представители рода толерантны к 15 % NaCl, каталозоположительные, отрицательные по оксидазе и уреазе, не образуют кислоту из глюкозы. Виды можно отличить по строению менахинона и содержанию G + C пар в ДНК.

Dermabacter

В основном это представитель нормальной микрофлоры кожи человека. Однако единственный вид этого рода *D. hominis* выделялся также при раневой инфекции и бактериемии. Содержание G + C пар в ДНК составляет 60—62 mol%. По многим свойствам вид аналогичен *Brevibacterium*, но в отличие от последнего является факультативным

анаэробом. Колонии мелкие: от 1 до 1,5 мм через 48 ч инкубации, при микроскопии выглядят как кокковидные палочки.

Rothia

Из пяти известных видов только два имеют клиническое значение. До сих пор представители этих видов выделялись при бактериемии, эндокардитах, из материала верхних дыхательных путей при респираторных инфекциях. Содержание G + C пар в ДНК составляет 47—56 mol%.

Грамположительные палочки, некислотоустойчивые. Неподвижные. Образуют V-формы, в молодых культурах филаментированы. Каталозоположительные. Факультативные анаэробы. Колонии от шероховатых до гладких, часто их описывают как мягкие, сухие, крошащиеся, слизистые. Морфологически напоминает *Actinomyces*, но являются аэробами и отличаются по строению клеточной стенки, которая богата лизином и галактозой. *Rothia* относится к аэробным микроорганизмам, подобным группе *Nocardia-Actinomyces*, вегетирующим в ротовой полости человека.

Exiguobacterium

Род *Exiguobacterium* впервые был описан (Collins at al.) в 1983 г. Его представители являются частью индигенной микробной флоры человека. Из семи видов рода лишь один пока проявил клиническое значение – *E. acetylicum*. Эти микроорганизмы были выделены из различных клинических источников (кожа, раны, ликвор). Содержание G + C пар в ДНК составляет около 47 mol%. *Exiguobacterium* подвижны за счет жгутиков. Факультативные анаэробы с ферментацией в углеводном метаболизме. Колонии имеют желто-золотистый пигмент, большинство штаммов имеют положительную оксидазную реакцию.

Oerskovia

Среди инфекций, вызываемых *Oerskovia,* известны менингит, эндофтальмит, инфекция искусственного сустава, бактериемия, гангренозный холецистит, перитонит, пионефроз, инфекции мягких тканей. Содержание G + C пар в ДНК составляет 70—75 mol%.

Микроорганизмы рода *Oerskovia* принадлежат к нокардиоформным бактериям. Термин определяется не близкими филогенетическими взаимоотношениями между определенными родами, а определенными общими чертами, такими как грамположительность и образование временной мицеллы, которая затем разрывается с образованием палочковидных или кокковидных бактерий. Мицелла *Oerskovia* представляет собой субстрат со значительным ветвлением, который разрывается с образованием палочковидных подвижных или неподвижных элементов.

Штаммы являются некислотоустойчивыми, каталазопозитивными, ферментирующими, большинство из них пигментированы в желтый цвет. Колонии имеют диаметр 1—2 мм через 24 ч инкубации.

Cellulomonas

Эти микроорганизмы встречаются в окружающей среде и лишь 2 вида из 13 были выделены от людей при раневой инфекции и бактериемии: *C. hominis* и *C. denverensis*. Содержание G + C пар в ДНК составляет 71—76 mol%.

Колонии кремовой окраски диаметром 0,5—1,5 мм после 24 ч инкубации. Указанные медицински значимые виды различаются между собой по ферментации сорбитола.

Cellulosimicrobium

Из трех видов рода два вида имеют в настоящее время клиническое значение: *C. funkei* и *C. cellulans* (в прошлом *Cellulomonas cellulans* и *Oerskovia xanthineolytica)*. Оба выделялись от больных с инфекционными процессами различной локализации и при бактериемии. Содержание G + C пар в ДНК составляет 74 mol%.

Колонии микроорганизмов похожи на колонии *Oerskovia*, так же как сходны они и по биохимическим характеристикам. Отличительным признаком может служить отношение ко ксантину.

Microbacterium

Этот род известен с 1990-х годов и в настоящее время насчитывает 35 видов, широко распространенных в природе, в т. ч. в почве. Но только некоторые из них в настоящее время имеют клиническое значение: *M. oxydans, M. paraoxydans, M. aurum, M. lacticum.* Чаще всего они выделялись от больных с раневыми инфекциями, бактериемией, инфекционными процессами различной локализации. Содержание G + C пар в ДНК составляет около 75 mol%.

Для колоний *Microbacterium* харктерно наличие пигмента от светло-желтого до оранжевого. Под микроскопом выглядят как короткие палочки без ветвлений. Характерной особенностью микроорганизмов является вариабельная чувствительность их к антибактериальным препаратам. Поэтому при выделении микроорганизма из клинического материала необходима постановка теста на чувствительность к антибиотикам каждого выделенного штамма.

Curtobacterium

Эти микроорганизмы выделялись из клинического материала при инфекционных процессах различной локализации. Содержание G + C пар в ДНК составляет 68—75 mol%.

Колонии микроорганизмов имеют ярко выраженный желтый или желто-оранжевый пигмент. Под микроскопом выглядят как маленькие короткие палочки без ветвлений. Продукция кислот из сахаров очень замедленная (до 7 дней). Дифференциация этих микроорганизмов затруднена, поэтому возможна в полной мере лишь в условиях референс-лабораторий.

Leifsonia

Единственный клинически значимый в настоящее время вид рода *L. aquatica* в прошлом относился к роду *Corynebacterium*. Выделяется из клинического материала при различных инфекционных процессах. Содержание G + C пар в ДНК составляет около 70 mol%.

Колонии микроорганизмов через 3—4 дня инкубации приобретают желтый пигмент. Под микроскопом имеют вид тонких палочек. Для некоторых штаммов характерно повышение МИК антибиотиков пенициллинового ряда, однако механизм развития такой устойчивости пока не выяснен.

Arcanobacterium

Из шести известных до настоящего времени видов три являются клинически значимыми: *A. haemolyticum, A. bernardiae, A. pyogenes*. Их выделяли при хронических кожных поражениях, септицемиях, абсцессах головного мозга, остеомиелитах, раневых инфекциях, хронических тонзиллитах. Резервуар возбудителя – больной человек. Основной путь передачи – воздушно-капельный. У части пациентов с тонзиллитом наблюдают беловатые бляшки на миндалинах, у большинства – двустороннее увеличение шейных и подчелюстных лимфоузлов. Респираторные заболевания, вызванные *Arcanobacterium haemolyticum*, обычно сопровождаются сыпью. Содержание G + C пар в ДНК составляет 48—52 mol%.

Колонии микроорганизмов 0,5—1,5 мм в диаметре. Факультативные анаэробы. Рост обычно скудный, но усиливается на кровяных средах и в присутствии CO_2. На агаре с кровью лошади в 48 ч культурах наблюдается узкая зона β-гемолиза. На агаре с кровью барана через 24—48 ч образуют мелкие 0,1—0,5 мм в диаметре колонии, окруженные зоной β-гемолиза. На агаре с кровью кролика колонии дают несколько большие колонии и зоны гемолиза. Каталозоотрицательные. При микроскопии выглядят как неравномерно тонкие палочки, иногда V-формы, в старых культурах приобретают кокковидную форму. Грамположительные, не кислотоустойчивые, неподвижные.

Gardnerella

Единственный вид этого рода *G. vaginalis* встречается в половых путях человека. Вызывает неспецифические уретриты, вагиниты, ваги-

нозы, эндометриты, послеродовый сепсис. Основной диагностический признак заболевания – обнаружение в мазках отделяемого мочеполовых органов «ключевых» клеток, обильной кокко-бациллярной флоры при уменьшении или полном отсутствии лактобактерий. Описаны также случаи менингитов, вызванных *G. vaginalis*, у новорожденных. Содержание G + C пар в ДНК составляет 42—44 mol%.

G. vaginalis образуют мелкие колонии 0,5—1,0 мм в диаметре. При микроскопии выглядят как грамвариабельные полиморфные палочки или коккобациллы, встречаются полисады и клетки, лежащие под острым углом (подобно *Corynebacterium*). Неподвижны, аспорогенные. При окраске по Нейссеру нередко обнаруживаются внутриклеточные метахроматические гранулы. Факультативные анаэробы. Хемоорганотрофы. Исключительно требовательны к составу питательных сред, но при этом не нуждаются в факторах роста (X и Y). Каталазо- и оксидазоотрицательные. Оптимальная температура для роста 35—37 °С. Способны гемолизировать эритроциты человека (от α- до β-гемолиза), но не обладают гемолитической активностью в отношении эритроцитов лошади и барана. Нуждаются в аденине и витаминах группы В (тиамине, рибофлавине, фолиевой и никотиновой кислоте, биотине). Рост на шоколадном агаре улучшается в присутствии CO_2. Жизнеспособность культур *G. vaginalis* низкая. На твердых средах они погибают через 24 ч, в полужидких средах живут 7 и более дней. Ферментируют глюкозу, мальтозу, крахмал, гликоген, декстрин. Не сбраживают лактозу, манит, раффинозу. Нитраты не восстанавливают. Протеолитическая активность слабо выражена.

3.2. Биологические особенности и роль отдельных видов коринебактерий в патологии человека и животных

Правильная постановка диагноза и начало эффективной терапии любого инфекционного заболевания в значительной степени зависят от тесного взаимодействия клинициста и лабораторной службы. Но на пути этого взаимодействия немало трудностей и наиболее частой является неправильная интерпретация результатов, полученных из микробиологической лаборатории. Главный вопрос, который встает перед врачами-клиницистами при получении ответа из лаборатории, – является ли данный микроорганизм инфекционным агентом или имеет место банальная микробная колонизация.

Большинство коринебактерий колонизируют различные отделы организма человека и животных без выраженных клинических реакций и иммунного ответа, т. е. являются комменсалами (табл. 2). Они находятся в благоприятном для них взаимодействии с организмом хозяина и не

наносят ему никакого вреда. Кроме того, известно, что некоторые коринебактерии способны оказывать благоприятное влияние на организм в результате своей жизнедеятельности. Так, колонизируя умерший пласт клеток поверхностного эпителия кожи, коринебактерии перерабатывают вредные вещества, питаясь продуктами биохимического распада.

Таблица 2

Выделение недифтерийных коринебактерий с различных анатомических участков тела человека (В. П. Строганов, 1999)

Участок тела	Встречаемость коринебактерий, %
Кожа	55
Нос и носоглотка	5—80
Гортань	50—90
Толстый кишечник	–
Тонкий кишечник	0,5—1,0
Влагалище и шейка матки	45—75

В настоящее время наблюдается большой приток информации в виде научных публикаций в микробиологических журналах об этиологической значимости ранее считавшихся непатогенными видов коринебактерий или коринеформных родов и их некоторых видов. Для повышения достоверности выдаваемых микробиологом результатов необходимо следовать в работе следующим рекомендациям: соблюдать все правила отбора, доставки и посева исследуемого клинического материала, идентифицировать до вида выделенный микроорганизм, считать этиологически значимым для нестерильных полостей организма количество микроорганизмов 1×10^4, если они выделяются в монокультуре, и 1×10^5, если микроорганизмов несколько видов и другие микроорганизмы обладают более низкой патогенностью, чем выделенные коринеформы или коринебактерии, если отмечается лейкоцитарная реакция организма. Клинические проявления заболеваний, этиологическим агентом которых являются недифтерийные коринебактерии, отличаются большим разнообразием (табл. 3). Ниже приводятся сведения о роли отдельных видов рода *Corynebacterium* в патологии человека и животных.

C. diphtheriae

Типовой вид рода. *C. diphtheriae* чаще всего вызывают классическую дифтерию верхних дыхательных путей, заболевание, сопровождающееся тяжелой интоксикацией. В 1884 г. Леффлер не только установил этиологическую роль этого возбудителя, но и доказал возможность бактерионосительства без клинических симптомов. Микроорганизм может вызывать также дифтерию редкой локализации: раны, кожи, глаза, уха,

влагалища. Подробное описание вида и лабораторной диагностики при дифтерийной инфекции приведены в соответствующих руководствах: методических указаниях МУ 4.2.698—98 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции» (1998 г.), руководстве по лабораторной диагностике ВОЗ «Дифтерия» (1994 г., 2009 г.), учебном пособии для врачей «Дифтерия. Лабораторная диагностика» (2009 г.) и др.

В дальнейшем в описании представлены другие виды коринебактерий, которые в настоящее время имеют медицинское значение. Идентификация приведенная ниже микроорганизмов возможна с помощью табл. 4.

Таблица 3

Пейзаж недифтерийных коринебактерий, выделенных при различных заболеваниях (Краева Л. А., 2000)

№ п/п	Диагноз	Исследуемый материал	Коринебактерии	Кол-во
1	Дифтерия зева	Слизь из зева	*C. xerosis* *C. paurumetabolicum*	7 2
2	Дифтерия наружных половых органов	Соскоб из влагалища	*C. urealyticum*	1
3	Назофарингит	Слизь из зева и носа	*C. pseudodiphtheriticum* *C. auris* *C. Xerosis* *C. paurumetabolicum* *C. ulcerans*	21 2 17 7 1
4	Ринит	Слизь из носа	*C. pseudodiphtheriticum* *C. auris* *C. Haemolyticum* *C. ulcerans*	8 1 1 1
5	Тонзиллит	Слизь из зева	*C. pseudodiphtheriticum* *C. Xerosis* *C. paurumetabolicum* *C. ulcerans* *C. pseudotuberculosis*	27 27 6 1 6
6	Бронхит	Мокрота	*C. striatum* *C. Auris* *C. xerosis*	3 1 4
7	Пневмония	Мокрота	*C. pseudotuberculosis* *C. xerosis*	3 2
8	Аллергический дерматит	Смыв с поверхности кожи	*C. pseudodiphtheriticum* *C. minutissimum*	4 1
9	Дерматоз	Смыв с поверхности кожи	*C. minutissimum* *C. haemolyticum*	1 1
10	Офтальмит	Мазок из глаза	*C. macginleyi*	1
11	Аднексит	Мазок из влагалища	*C. xerosis*	2
12	Вульвовагинит	Мазок из влагалища	*C. glucuronolyticum* *C. urealyticum*	2 1
13	Уретрит	Моча	*C. glucuronolyticum*	1

			C. urealyticum	1
14	Пиелонефрит	Моча	*C. urealyticum*	1
15	Незаживающая рана	Отделяемое раны	*C. pilosum*	1
16	Отит	Отделяемое из уха	*C. minutissimum* *C. auris*	1 1
Всего: 16			14 видов *Corynebacterium*	168 культур

Таблица 4

Идентификация медицински значимых коринебактерий

Виды *Corynebacterium*	Ферментация/ окисление	Липофильность	Нитратредуктаза	Уреаза	Гидролиз эскулина	Пиразинамидаза	Алкалинфосфатаза	Продукция кислоты из					САМР-тест	Другие характеристики
								глюкозы	мальтозы	сахарозы	маннитола	ксилозы		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
C. accolens	Ф	+	+	–	–	V	–	+	–	V	V	–	–	
C. afermentans subsp. afermentans	О	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	V	
C. afermentans subsp. lipophilum	О	+	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	V	
C. amycolatum	Ф	–	V	V	–	+	+	+	V	V	–	–	–	
C. appendicis	Ф	+	–	+	–	+	+	+	+	–	–	–	НД	
C. argentoratense	Ф	–	–	–	–	+	V	+	–	–	–	–	–	
C. atypicum	Ф	–	–	–	–	–	–	+	+	+	–	–	НД	Точечные колонии, β-глюкуронидаза +
C. aurimucosum	Ф	–	–	–	V	+	+	+	+	+	–	–	НД	Многие штаммы продуцируют серо-черный пигмент
C. auris	О	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	+	
C. bovis	Ф	+	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	Фруктоза +
C. confusum	Ф	–	+	–	–	+	+	(+)	–	–	–	–	–	Тирозин–

C. coyleae	Ф	–	–	–	–	+	+	(+)	–	–	–	–	+	
CDC group F-1	Ф	+	V	+	–	+	–	+	+	+	–	–	–	
CDC group G	Ф	+	V	–	–	+	+	+	V	V	–	–	–	Фруктоза +, анаэробный рост +

Продолжение табл. 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
C. diphtheriae biotipe gravis	Ф	–	+	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	Крахмал +
C. diphtheriae biotipe intermedius	Ф	+	+	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	Крахмал –
C. diphtheriae biotipe mitis and belfanti	Ф	–	+/–	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	Крахмал –
C. durum	Ф	–	+	(V)	(V)	+	–	+	+	+	V	–	–	Прилипание к агару
C. falsenii	Ф	–	–	(+)	–	(+)	+	(+)	V	–	–	–	–	Желтый пигмент
C. freneyi	Ф	–	V	–	–	+	+	+	+	+	–	–	НД	α-глюкозидаза +, рост от 20 до 42 °С
C. glucuronolyticum	Ф	–	V	V	V	+	V	+	V	+	–	V	+	β-глюкуронидаза+
C. imitans	Ф	–	–	–	–	(+)	+	+	+	(+)	–	–	+	Тирозин–
C. jeikeium	О	+	–	–	–	+	+	+	V	–	–	–	–	Фруктоза –, анаэробный рост –
C. kroppenstedtii	Ф	+	–	–	+	+	–	+	V	+	–	–	–	
C. lipophiloflavum	О	+	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–	
C. macginleyi	Ф	+	+	–	–	–	+	+	–	+	V	–	–	Желтый пигмент
C. matruchotii	Ф	–	+	–	V	+	–	+	+	+	–	–	–	Кнутовидные при микроскопии

Продолжение табл. 4

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
C. minutissimum	Ф	–	–	–	–	+	+	+	+	V	V	–	–	Тирозин+
C. mucifaciens	О	–	–	–	–	+	+	+	–	V	–	–	–	Мукоидные желтые колонии
C. propinquum	О	–	+	–	–	V	V	–	–	–	–	–	–	Тирозин+
C. pseudodiphtheriticum	О	–	+	+	–	+	V	–	–	–	–	–	–	
C. pseudotuberculosis	Ф	–	V	+	–	–	V	+	+	V	–	–	REV	
C. resistens	Ф	+	–	–	–	–	+	+	–	–	–	–	–	Медленный рост в анаэробных условиях
C. riegelii	Ф	–	–	+	–	V	V	–	(+)	–	–	–	–	
C. singulare	Ф	–	–	+	–	+	+	+	+	+	–	–	–	Тирозин+
C. simulans	Ф	–	+	–	–	V	+	+	–	+	–	–	–	Редукция нитритов
C. striatum	Ф	–	+	–	–	+	+	+	–	V	–	–	V	Тирозин+
C. sundsvallense	Ф	–	–	+	–	V	V	+	+	+	–	–	–	Липкие колонии
C. thomssenii	Ф	–	–	+	–	+	+	+	+	+	–	–	–	N-ацетил β-глюкуронидаза+, липкие колонии
C. tuberculostearicum	Ф	+	V	–	–	+	V	+	V	V	–	–	НД	
C. tuscaniae	О	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–	Гиппурат +, тирозин–
C. ulcerans	Ф	–	–	+	–	–	+	+	+	–	–	–	REV	Крахмал +
C. urealyticum	О	+	–	+	–	+	V	–	–	–	–	–	–	
C. xerosis	Ф	–	V	–	–	+	+	+	+	+	–	–	–	

Сокращения и символы:
Ф – ферментация;

О – окисление;
+ – позитивная реакция;
− – негативная реакция;
V – вариабельная реакция;
( ) – замедленная реакция;
НД – нет данных;
REV – задержка CAMP-теста.

C. accolens

Эти коринебактерии выделялись из глаз, ушей, верхних дыхательных путей у пациентов с соответствующими заболеваниями. Описаны случаи, при которых *C. accolens* вызывали эндокардиты аортального и митрального клапанов. Маленькие палочки, образующие при росте на агаре с кровью гладкие выпуклые колонии диаметром менее 0,5 мм. Чувствительны к большинству используемых антибиотических препаратов.

C. afermentans subsp. afermentans

Наряду с тем, что эти микроорганизмы составляют часть нормальной микрофлоры человека, они выделялись в ряде случаев из отделяемого ушей и из крови больных. При росте на среде с кровью образуют беловатые негемолитические колонии 1—2 мм в диаметре. Чувствительны к β-лактамным антибиотикам.

C. afermentans subsp. lipophilum

Впервые эти микроорганизмы были выделены из крови больных с инфекцией центрального венозного катетера, эндокардитом искусственного клапана с периклапанным абсцессом. Позднее выделялись от людей с раневой инфекцией. Колонии выпуклые гладкие диаметром менее 0,5 мм на среде с кровью. Чувствительны к β-лактамным антибиотикам.

C. amycolatum

Вид описан (Karen L. Knox) в 1988 г. В основном это представители нормальной флоры кожи человека. Выделялись из отделяемого верхних дыхательных путей здоровых людей. В настоящее время известны случаи эндокардитов как госпитальных, связанных с внутрисосудистыми катетерами, так и у пациентов с заболеваниями сердца и у больных с иммунной депрессией, вызванных штаммами *C. amycolatum*, устойчивыми ко многим антибиотикам (ципрофлоксацину, эритромицину, гентамицину, пенициллину). Эффективность лечения в таких случаях обеспечивалась применением ванкомицина и рифампицина. Не содержит миколовую кислоту в составе клеточной стенки. Обладает фосфатазной активностью, не ферментирует крахмал. При росте на среде с кровью образуют серые плотные колонии с неровным краем диаметром 1—2 мм.

C. appendicis

Этот микроорганизм был выделен от пациента с апендицитом, осложненным абсцессом. Этот вид отличается от представителей *CDC coryneform groups F-1* позитивной алкалин-фосфатазной активностью и негативними реакциями нитрат-редуктазы и ферментации сахарозы.

C. argentoratense

Есть сообщения о выделении этих микроорганизмов из глотки и носа у пациентов с заболеваниями верхних дыхательных путей, а также из крови. Колонии микроорганизмов обачно кремового цвета, без гемолиза, шершавые, диаметром 2 мм через 48 ч роста.

C. atypicum

Хотя этот вид и принадлежит к роду *Corynebacterium,* он не содержит коринемиколовых кислот. На среде с кровью образуем очень мелкие колонии через 48 ч инкубации. Не экпрессируют пиразиамидазу, но обладают β-глюкуронидазной активностью.

C. aurimucosum

Эти микроорганизмы до сих пор в основном выделялись из урогенитального тракта женщин при соответствующих воспалительных процессах. На среде с кровью образуют желтые липкие колонии. Иногда могут давать темно-серый пигмент.

C. auris

В большинстве случав *C. auris* вызывали заболевания верхних дыхательных путей, ушей. Образуют негемолитические, сухие и слегка прилипшие, но не пенетрирующие в агар колонии, которые со временем желтеют. Представители этого вида обладают устойчивостью к некоторым β-лактамным антибиотикам, однако механизм этого явления пока неизвестен.

C. bovis

Обычно обнаруживаются в коровьем молоке, комменсалы вымени коров. Могут инфицировать соски. Нередко приводят к уменьшению или прекращению лактации. Распространяются человеком при доении. Иногда являются причиной клинически выраженного мастита, но в основном заболевание протекает субклинически. В литературе имеются сообщения об изоляции *C. bovis* из патологического материала от человека.

Морфологически *C. bovis* – неправильной формы палочки и коккобациллы. Липофильные. Единственные в группе коринебактерий положительные по оксидазе. Могут расти на средах, содержащих 9 % NaCl. Ферментируют глюкозу, фруктозу, мальтозу и глицерин. Нитраты не восстанавливают. Колонии кремоватые, серые или белые, непрозрачные,

сухие, крошащиеся, мелкие, около 1 мм в диаметре. Через 24 ч инкубации рост отсутствует или скудный, в 48-часовых культурах хорошо заметен. Если посев проб молока осуществляется петлей, колонии располагаются в начале штриха, где сконцентрирован жир молока. При посеве тампоном колонии равномерно распределяются по агару. Гемолитической активностью не обладают.

C. confusum

Впервые эти микроорганизмы были выделены от пациента с инфекционным процессом на ступне, затем их выделяли из крови, различных абсцессов. Колонии микроорганизмов светлые ровные блестящие диаметром до 1,5 мм через 48 ч инкубации. Обладают замедленной ферментативной активностью, поэтому биохимические тесты лучше учитывать через 48 ч инкубации.

C. coyleae

Штаммы этих микроорганизмов выделялись из культуры крови и других стерильных жидкостей организма человека, а также из урогенитального тракта. Колонии гладкие, блестящие, с небольшой адгезией к поверхности кровяного агара. Диаметр колоний около 1 мм.

CDC Group F-1 and G Bacteria

Это относительно недавно выделенная (в 1981 г.) группа слабоферментирующих коринебактерий. Представители этой группы выделялись из клинического материала от больных с тяжелыми эндокардитами, септическими артритами, красной системной волчанкой, из урогенитального тракта и глаз.

Микроорганизмы CDC Group F-1 обычно чувствительны к пенициллину, но часто устойчивы к макролидам. Некоторые представители CDC Group G обладают мультирезистентностью ко многим антибиотикам, но в основном – к макролидам и линкозамидам.

C. durum

Впервые этот микроорганизм был выделен из респираторного тракта человека. В настоящее время *C. durum* выделяют из ротовой полости, крови, содержимого абсцессов. Но в то же время их выделяют и от здоровых лиц. Пока патогенетический потенциал *C. durum* до конца не выяснен. Они относятся к группе медленнорастущих коринебактерий с образованием мелких колоний (0,5—1 мм в диаметре) через 48—72 ч инкубации.

C. falsenii

Эти микроорганизмы до сих пор выделялись только из стерильных жидкостей организма человека. Колонии гладкие, блестящие, слегка

адгезированные к поверхности агара с кровью. Диаметр колоний 1—2 мм. Через 72 ч инкубации появляется желтый пигмент, который становится наиболее выраженным через 120 ч.

C. freneyi

Впервые эти микроорганизмы были выделены с поверхности кожи некоторых пациентов. Позднее их стали выделять также из урогенитального тракта. Колонии светлые, сухие и шершавые, диаметр составляет 0,5—1 мм после 48 ч инкубации. *C. freneyi* похожи на *C. xerosis*, но в отличие от них ферментируют глюкозу при 42 °С и растут при температуре 20 °С.

C. glucuronolyticum

Они были выделены от людей с заболеваниями мочеполовой системы. Могут вызывать простатиты и уретриты. В то же время выделяются от здоровых людей (в основном мужчин). Колонии беловато-желтоватые, негемолитические, выпуклые, размером 1—1,5 мм в диаметре после 24 ч инкубации на агаре с кровью. Большинство изученных штаммов обладают устойчивостью к тетрациклину, некоторые – к макролидам и линкозамидам.

C. imitans

Эти микроорганизмы впервые были выделены из назофарингеального секрета ребенка с локализованной формой дифтерии. У контактировавших с этим ребенком взрослых также были выделены *C. imitans,* что позволило говорить о передаче от человека к человеку даже недифтерийных микроорганизмов. Внутрибольничное заражение в этом случае было исключено. Колонии микроорганизмов гладкие, бело-серые, диаметром 1—2 мм на среде с кровью, на кровяно-теллуритовом агаре – темно-серые.

C. jeikeium

Johnson и Kaye впервые описали их как возбудителей инфекций у человека. Плеоморфные, грамположительные палочки с характерным расположением, некислотоустойчивые, имеют метахроматические гранулы. Хорошо растут при 30—42 °С. Липофильные и липолитические. Образуют кислоту из глюкозы и галактозы, иногда из мальтозы. Отрицательны по уреазе и нитратредуктазе. На среде с Твин-80 колонии круглые, гладкие, от белого до кремового оттенка, на других средах – серые, негемолитические.

Входят в состав нормальной микрофлоры кожных покровов человека. Чаще выделяются у мужчин, что, вероятно, обусловлено наличием на коже большого количества свободных жирных кислот, необходимых

для роста микроорганизма. Нередко заселяют кожу паховой, ректальной и аксиллярной областей. Имеются сообщения о выделении их у 1—2 % здоровых лиц, у 10—15 % неонкологических и у 35—50 % онкологических больных. Могут обнаруживаться в крови и в других биотопах, особенно у пациентов, получающих иммунодепрессанты при пересадке костного мозга. Их изолируют с кожи (около 40 % пациентов были госпитализированы по этому поводу). Практически каждый случай сопровождается бактериемией, представляющей особую опасность для больных с патологией кроветворения и сосудистыми шунтами. Сепсис обычно развивается на фоне основного заболевания при наличии катетеров, шунтов и трубок из биоматериалов. Вызывают кожные поражения, пневмонии, эндокардиты, перитониты, инфицируют ожоговые раны, часто являются причиной септического тромбофлебита. Большинство случаев заражения носят госпитальный характер, особенно у лиц с нарушениями иммунитета и у получавших антибиотики широкого спектра действия.

Обычно устойчивы ко многим антибиотикам. Антибиотик выбора в настоящее время – «Ванкомицин». Препарат резерва – «Ципрофлоксацин». При длительной госпитализации, нейтропении или длительном курсе антибиотикотерапии возникает риск колонизации высокорезистентными штаммами данной группы.

C. kroppenstedtii

Эти микроорганизмы были выделены от больных с легочными заболеваниями. В настоящее время их выделяют из легких, бронхолегочных смывов, из различных абсцессов. Колонии серого цвета, сухие, блестящие, очень маленькие – менее 1 мм в диаметре.

C. lipophiloflavum

Единственный пока штамм этого вида был выделен из вагинального содержимого у больной с бактериальным вагинозом. Эти микроорганизмы похожи на *C. urealyticum*, но в отличие от них не обладают мультирезистентностью к антибиотикам.

C. macginleyi

Эти микроорганизмы были причиной инфекционных заболеваний глаз, таких как гематогенный эндофтальмит. В то же время их выделяли из коньюнктивы здоровых людей. На среде с Твином-80 колонии *C. macginleyi* дают розовый пигмент. Это одни из немногих коринебактерий, не обладающих пиразиамидазной активностью. Чувствительны ко многим антибактериальным препаратам.

C. matruchotii

Обнаруживаются в ротовой полости и зубном налете у человека и приматов. Морфологические особенности – палочки кнутовидной формы. В настоящее время выделяются также из урогенитального тракта человека. Колонии микроорганизмов мелкие, около 0,5 мм в диаметре, блестящие, выпуклые.

C. minutissimum

Возбудитель эритразмы – инфекционного поражения кожных покровов в виде красновато-коричневой сыпи, локализующейся преимущественно в паховой и подмышечной областях. С одной стороны, они являются частью нормофлоры кожи человека, с другой, – способны вызывать абсцессы легких, эндокардиты и фатальные септикопиемии. Высеваются у больных простатитом, обсуждается их роль в патогенезе мужского бесплодия.

На плотных питательных средах через 24 ч роста формирует гладкие блестящие колонии размером 1 мм. Если колонии выросли на сывороточном агаре, то под лампой Вуда ($\lambda = 365$ нм) светятся розовым светом. В мазках – палочки (0,3—0,6 × 1—2 мкм) с перешейком на одном из сужающихся концов с метахроматическими гранулами.

C. mucifaciens

Эти микроорганизмы в основном высевались из крови и других стерильных жидкостей организма человека, однако их также выделяли из абсцессов, пораженных участков кожи. Колонии маленькие, 1—1,5 мм в диаметре, мукоидные. Биохимическая активность микроорганизмов низкая. Чувствительность к β-лактамным антибиотикам и аминогликозидам довольно высокая.

C. propinquum

Эти коринебактерии выделялись из отделяемого верхних дыхательных путей от больных с респираторными заболеваниями, а также от больного с врожденным клапанным эндокардитом. Их биологической нишей являются верхние дыхательные пути человека. Колонии светлые, блестящие, иногда сухие, диаметром 1—2 мм через 24 ч инкубации.

C. pseudodiphtheriticum (C. Hoffmani)

Представители *C. pseudodiphtheriticum* являются частью нормальной флоры верхних дыхательных путей. Однако могут вызывать заболевания в местах своего обитания, описаны случаи бронхопневмоний на фоне иммунодепрессивной терапии, проводимой по поводу хронических системных заболеваний. У ослабленных людей могут вызвать эндокардит, лимфадениты, кожные поражения, инфекцию мочевыводящих путей.

Короткие прямые палочки, метахроматические зерна отсутствуют или их мало, в мазках часто располагаются параллельно. Факультативные анаэробы. Хорошо растут на простых питательных средах при 37 °С. На кровяном агаре образуют белые с кремовым оттенком S-колонии, на теллуритовых средах колонии сухие, мелкие, серые, с коричневым центром, на среде Бучина – голубоватые. Чувствительны к β-лактамным антибиотикам, но устойчивы к макролидам и линкозамидам.

C. pseudotuberculosis (C. ovis)

Вызывают грануломатозный язвенный лимфаденит у овец и лошадей, иногда у крупного рогатого скота. Инфекция также известна у верблюдов и оленей. В литературе описаны также случаи казеозных лимфаденитов, обусловленных данным микроорганизмом. Возбудитель может поражать людей, контактирующих с больными животными, составляющих группу риска. Являются причиной септических проявлений у человека, грануломатозного лимфаденита.

При микроскопии палочки, окрашиваются неравномерно, наблюдаются булавовидные формы, напоминающие *C. diphtheriae*, хотя в меньшей степени плеоморфные. Колонии мелкие, желтые, с неровным краем. На кровяном агаре образуют узкую зону гемолиза. В бульоне дают зернистый осадок. На средах с теллуритом калия колонии более однородно черные, чем колонии дифтерийной палочки. Образуют токсин, имеющий активность фосфолипазы D, сфингомиелиназы и проникающего фактора. Имеют аналогичное *C. diphtheriae* строение липидов клеточной стенки, их ДНК подобны на 40 %.

C. resistens

Выделение этих микроорганизмов наблюдалось при ряде бактериемий. Колонии светло-серые, отмечается фенотипическая схожесть *C. resistens* и *C. jeikeium* даже в том, что оба микроорганизма медленно растут в анаэробных условиях. Устойчивы к таким антибиотикам, как пенициллин, цефалоспорины, аминогликозиды, клиндамицин, ципрофлоксацин.

C. reigelii

Первоначально эти микроорганизмы были выделены от женщин с инфекционными процессами урогенитального тракта, позднее их выделяли из крови, в т. ч. из полости сердца. Колонии светло-серые, гладкие, блестящие, диаметром 1,5 мм после инкубации в течение 24 ч. Отличительной особенностью этих микроорганизмов является их высокая уреазная активность, проявляющаяся в том, что тест на уреазу срабатывает уже через 5 мин после инокуляции в среду культуры даже при комнатной температуре. Кроме того, среди всех коринебактерий очень замед-

ленная ферментация мальтозы, но не глюкозы присуща только *C. reigelii.*

C. simulans

Микроорганизмы этого вида выделялись из абсцессов, лимфатических узлов, фурункулов, крови. Отделенные в свое время от *C. striatum*, они имеют большое сходство с ними, отличаясь лишь некоторыми биохимическими свойствами и неспособностью расти при 20 °С.

C. singulare

Микроорганизмы, выделенные в отдельный вид, остаются фенотипически очень похожими на *C. minutissimum* и *C. striatum*. Колонии микроорганизмов гладкие, блестящие, кремообразные. Биохимическая дифференциация их возможна с помощью биохимических тестов «bioMerieux».

C. striatum

Представители этого вида выделяются из носоглотки человека, часто являются нормальными обитателями кожи. Обнаруживаются при маститах коров. Они колонизируют вставные протезы, катетерные наконечники, дыхательные трубки, питательные зонды. Были выделены из урогенитального материала от женщин с преждевременным разрывом околоплодного пузыря, от больных с эндокардитами и бактериемией.

На кровяном агаре через 48 ч формирует мелкие блестящие круглые колонии со слабой зоной гемолиза в глубине. Некоторые штаммы продуцируют зеленовато-желтый пигмент, диффундирующий в среду. В микроскопических препаратах – палочки кокковидной формы (0,25—0,5 × 2—3 мкм) с небольшим количеством волютина. Устойчивы к макролидам, линкозамидам, тетрациклинам.

C. sundsvallense

Впервые эти микроорганизмы были выделены из крови больного, затем их выделяли из влагалища, из промывных вод при дренаже синуса. Колонии светло-желтые, адгезированные к поверхности питательной среды, липкой консистенции. При микроскопии палочки имеют на концах выступы и закругления, отличающие их от всех других коринебактерий.

C. thomssenii

Эти микроорганизмы были выделены из плеврального выпота у больного с экссудативным плевритом. В то же время *C. thomssenii* выделялись из окружающей среды. Колонии появляются на чашках через 48 ч и составляют менее 0,5 мм в диаметре. Через 96 ч колонии становятся липкими и адгезируются к поверхности питательной среды.

C. tuberculostearicum

Эти микроорганизмы перенесены в данный вид из *C. pseudogenitalium*. Имеют некоторые биохимические особенности, хотя в целом трудно дифференцируемы от других коринебактерий в рутинной практике.

C. tuscaniae

Представители этого вида впервые были выделены из крови больного с эндокардитом. *C. tuscaniae* не могут расти в анаэробных условиях, что отличает их от фенотипически очень похожего вида *C. Minutissimum*. Колонии круглые, ровные, диаметром 1—2 мм через 24 ч инкубации на агаре с кровью.

C. ulcerans

Эти микроорганизмы, как и *C. pseudotuberculosis*, имеют тесные филогенетические связи с *C. diphtheriae*. Они также могут иметь дифтерийный tox-ген. *C. ulcerans* – патоген крупного рогатого скота. Выделены при остром мастите коров и обезьян, из дыхательных путей лошадей, обезьян, как здоровых, так и больных респираторными заболеваниями. У людей обычно вызывают респираторные поражения. Известны случаи, когда вид вызывал у человека фарингиты, при которых поражения глотки напоминали дифтеритическое воспаление. Связаны с ангинами, тонзиллитами, кожными поражениями. Контаминируют молочные продукты и тару для их перевозки. Имеются данные о заражении при употреблении сырого молока, а также от больного животного к человеку.

На кровяно-теллуритовых средах через сутки вырастают в виде колоний, похожих на *C. diphtheriae* вариант *gravis*. В микроскопических препаратах – мелкие овоиды и коккоподобные палочки. Чувствительны ко многим антибиотикам.

C. urealyticum

Эти микроорганизмы в основном вызывают заболевания мочеполовой системы, в т. ч. пиелонефриты и пиелоуретриты. Вместе с этим они часто бывают причастны к развитию бактериемий, эндокардитов, остеомиелитов, раневых и кожних инфекций. Колонии выпуклые, гладкие, блестящие, светло-серого цвета, диаметром 1—2 мм, растут только в аэробных условиях. Многие представители обладают мультирезистентностью к антибиотикам, хотя всречаются штаммы, чувствительные к пенициллину.

C. xerosis

Нормальный обитатель кожи и слизистых оболочек человека. Микроорганизм этого вида впервые был изолирован из материала, взятого из слезного канала. У человека в редких случаях является причиной вяло-

текущего конъюнктивита, эндокардита и пневмонии, раневой инфекции. Последние регистрируются у больных с сопутствующими заболеваниями или получавшими кортикостероиды.

Микроорганизмы морфологически сходны с *C. diphtheriae*, но несколько короче и толще, бочкообразной формы. Слабополихромны, при окрашивании наблюдается поперечная исчерченность. Метахроматические гранулы немногочисленны и выявляются не всегда отчетливо. Факультативные анаэробы. Хорошо растут при 22 и 37 °С, образуя через 24 ч на агаре с кровью мелкие, круглые, гладкие или шероховатые колонии, на теллуритовых средах колонии выпуклые, влажные, серого или коричневого цвета, на среде Бучина – бесцветные. На коже человека обитают липофильные штаммы, которые для своего роста нуждаются в липидах (обычно в Твине-80).

3.3. Ход лабораторного исследования биологического материала при идентификации недифтерийных коринебактерий

Материалом для микробиологического исследования могут служить: соскобы и слизь с пораженных участков кожи и слизистых оболочек, отделяемое раневой поверхности, кровь, молоко, сперма.

1 день. Посев материала на любую из сред для первичного посева (5 %-й кровяной агар, сывороточный агар, простой питательный агар, среду Тинсдаля, среду Бучина, кровяно-теллуритовый агар) методом истощающего посева для оценки микробиологической обсемененности (метод Голда) или методом серийных разведений. Инкубировать посевы при 37 °С в течение 120 ч, просматривая посевы каждые 24 ч. Посев крови и другого клинического материала осуществляют согласно приказу МЗ № 535.

2 день. Изучение морфологии колоний: S – колонии 1—4 мм в диаметре, непрозрачные, иногда серые, гладкие, с ровными краями и белым выпуклым центром, блестящие, вязкие, влажные; R – колонии матовые, сухие, ломкие. Изучение гемолитической активности культур. Подсчет их количества.

Микроскопия колоний и мазков. Обнаружение полиморфности культуры – грамположительные булавовидные, бочкообразные клетки, расположение в виде частокола, римских пятерок, с зернами (гранулами) волютина. Отсев изолированных колоний под стереоскопическим микроскопом на сывороточный или кровяной агар для накопления чистой культуры. Посев на МПА.

3 день. Микроскопия чистой культуры с сывороточного или кровяного агара.

Оценка способности культуры расти на простом агаре. Постановка тестов на каталазу и оксидазу. Посев в среду для определения подвиж-

ности в 2 пробирки со столбиком 0,3 % полужидкого агара. Инкубировать при 37 и при 22 °С. Посев на ряд для изучения биохимической активности (гидролиз сахаров, крахмала, наличие нитратредуктазы, фосфатазы, цистиназы, пиразинамидазы, уреазы, тирозиназы, тест с метиловым красным (MR). Посев в сахарный бульон.

4 день. Учет посевов на подвижность. Учет характера роста в сахарном бульоне: при образовании поверхностной пленки – аэроб, при диффузном росте по всему объему среды – микроаэрофил. Оценка результатов биохимических тестов.

Родовая дифференциация культур: к роду *Corynebacterium* можно отнести неподвижные, каталазоположительные, цитохромоксидазоотрицательные, негемолитические (редко α-гемолиз) грамположительные палочки (кокко-бациллы) с характерным расположением в мазке.

Видовую дифференциацию культур проводят на основании оценки результатов биохимических тестов с использованием прилагаемых таблиц и схемы.

Результаты микробиологического исследования выдают с указанием вида микроорганизма и его количества в биологическом материале.

3.4. Дифференциальная диагностика коринебактерий от других палочковидных грамположительных бактерий

Род *Corynebacterium* объединяет несколько видов, способных вызывать заболевание у людей, однако только *C. diphtheriae* вызывает дифтерийную инфекцию. Диагностика дифтерии должна быть ранней и основываться на клинико-эпидемиологических данных. Диагноз «дифтерия» ставится точно или как подозрение уже при первой встрече с больным. Обычно при типичном течении заболевания (фибринозные налеты, плотно спаянные с поверхностью ткани, симптомы интоксикации и местного воспаления, увеличение лимфатических узлов и др.) лабораторные методы являются вспомогательными и редко используются для ранней диагностики заболевания. Сложности возникают при атипичных формах дифтерии, при ее редких локализациях, которые чаще всего протекают с катаральными, катарально-язвенными поражениями. Так, при дифтерии кожи наблюдается импетигинозная сыпь и длительно незаживающие трещины и опрелости с кровянистыми корочками. Течение таких форм обычно длительное, без температурной реакции и явлений интоксикации. В этих случаях диагностика дифтерийной инфекции основывается чаще всего на данных лабораторного обследования. В связи с этим возникает необходимость в знаниях не только биологической характеристики возбудителя дифтерии, но и комплекса дифференциально-диагностических признаков, которые помогают отличить все биова-

рианты *C. diphtheriae* от других коринебактерий, как патогенных (*C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*), так и часто встечающихся видов (*C. xerosis*, *C. pseudodiphtheriticum*), способных в определенных условиях стать патогенными для человека (табл. 5). Как следует из данных таблицы, цистиназазоположительны все виды, кроме *C. xerosis* и *C. Pseudodiphtheriticum*. Пиразинамидаза отсутствет у трех патогенных видов (*C. diphtheriae, C. ulcerans,C. pseudotuberculosis*), нитраты не восстанавливают вариант *C. diphtheriae belfanti, C. ulcerans, C. Pseudotuberculosis*. Мочевину не расщепляют все варианты *C. diphtheriae* и *C. xerosis*.

Таблица 5

Биохимические свойства возбудителя дифтерии, других патогенных и часто встречающихся коринебактерий

Тесты	*Corynebacterium diphtheriae*				*Corynebacterium*			
	gravis	*mitis*	*intermedius*	*belfanti*	*ulcerans*	*pseudo tuberculosis*	*xerosis*	*pseudodiphtheriticum*
Ферментация:								
глюкозы	+	+	+	+	+	+	+	–
мальтозы	+	+	+	+	+	+	+	–
сахарозы	–	–	–	–	–	–	+	—
крахмала	+	–	–	–	+(–5 %)	–	–	
Активность ферментов:								
уреазы	–	–	–	–	+	+	–	+
цистиназы	+	+	+	+	+	+	–	–
нитратредуктазы	+	+	+	–	–	–(+1 %)	+	+
пиразинамидазы	–	–	–	–		–	+	+

Возможность обсеменения исследуемого материала, сходство морфологических, тинкториальных и биохимических свойств коринебактерий с возбудителями листериоза (род *Listeria*), рожи свиней (род *Erysipelothrix*), представителями родов *Actinomyces* и *Arcanobacterium* диктуют необходимость проводить дифференциальную диагностику между ними. Идентификация изолированных микроорганизмов, количественная оценка обсемененности ими биологического материала определяют их роль в этиологии заболевания.

Ниже приведена краткая характеристика родов *Listeria* и *Erysipelothrix*, представляющих интерес для медицинских и ветеринарных микробиологов, а также приведены табл. 6, 7, 8 и схема, призванные облегчить дифференциацию грамположительных палочковидных бактерий.

Род Listeria

Род *Listeria* относится к группе грамположительных аспорогенных палочек правильной формы. Это короткие палочки с закругленными концами, иногда напоминающие кокки, в редких случаях имеющие тенденцию формировать либо короткие цепочки, либо длинные нити (R-форма колоний) грамположительны, но клетки старых и молодых культур могут быть грамотрицательны. В мазках располагаются в виде палисада, V- и Y-образно. Спор и капсул не образуют. Факультативные анаэробы. Температурный оптимум 37 °С. Каталазоположительны, оксидазоотрицательны. Подвижны при выращивании при 20—25 °С. Для некоторых видов характерен β-гемолиз (особенно в условиях относительного анаэробиоза). Не требовательны к питательным средам. На МПА образуют слегка выпуклые, полупрозрачные колонии с ровным краем, голубовато-серого цвета. Типовой вид – *L. monocytogenes*. Виды листерий *L. Monocytogenes, L. ivanovi, L. seeligeri* способны вызывать заболевания у людей и животных.

Основной природный резервуар возбудителя (90 видов животных) – грызуны, травоядные, дикие птицы и большинство видов сельскохозяйственных и домашних животных. У животных заболевание может протекать латентно, но возбудитель в большом количестве выделяется с мочой, испражнениями, молоком, околоплодной жидкостью, носовым отделяемым. Человек заражается при употреблении мяса, особенно свинины, молока, загрязненной воды, возможно, при контакте с больными животными. Доказан также половой путь передачи инфекции. Заболевание регистрируется во всех возрастных группах, чаще у новорожденных, пациентов пожилого и старческого возраста, имеющих сопутствующую патологию. У лиц с иммунодефицитом вызывает менингиты, септицемию, эндокардиты. Известны случаи бессимптомного носительства возбудителя.

Листериоз – полиморфное заболевание с многообразием клинических проявлений. Наибольшую опасность представляет листериоз для беременных, поскольку приводит к невынашиванию плода, мертворождению, ранней смертности новорожденного.

Диагностика листериоза представляет значительные трудности из-за полиморфной клинической картины. Поэтому при постановке диагноза помимо клинических симптомов и данных анамнеза, необходимо обнаружение возбудителя. Однако в клинических образцах (слизь из зева, соскобы со слизистой влагалища, уретры, шейки матки, кровь, ликвор, моча, молоко, секционный материал) возбудитель листериоза морфологически может быть сходен с коринебактериями, энтерококками и стрептококками.

Тесты, позволяющие дифференцировать листерии от коринебактерий, приведены в табл. 6.

Таблица 6

Тесты дифференциации *Listera spp.* и *Corynebacterium spp.*

Тесты	*Listeria spp.*	*Corynebacterium spp.*
Подвижность при 20—25 °С	+	–
Рост при 10 °С	+	–
Рост на простых питательных средах	+	±
Гемолитическая активность	+	–
Продукция H_2S	+	–
Агглютинация поливалентной листериозной сывороткой	+	–
Лизис листериозным бактериофагом	+	–

Род Erysipelothrix

Как и род *Listera*, род *Erysipelothrix* относится к группе грамположительных аспорогенных палочек правильной формы. Представители *Erysipelothrix* – неподвижные, каталазо- и оксидазоотрицательные, тонкие, нежные полиморфные палочки. При хроническом течении болезни в мазках из пораженных органов выявляются длинные нити, которые иногда переплетаются, но не ветвятся, могут утолщаться и содержат характерные гранулы. Спор и капсул не образуют. Легко культивируются на обычных слабощелочных средах, образуя мелкие росинчатые прозрачные колонии в S-форме. Добавление к среде глюкозы и сыворотки усиливает рост культур. На кровяных средах наблюдается α-гемолиз. Рост микроорганизмов тормозится в присутствии теллурита калия, что отличает их от коринебактерий и листерий. Ферментируют до кислоты без газа глюкозу и лактозу. Не способны к ферментации мальтозы, маннита, рамнозы, глицерина, эскулина, салицина. Образуют сероводород. Не изменяют индикаторных сред (индикаторная проба), что является ключевым дифференцирующим тестом между листериями и эризипелотриксами.

Типовой вид *E. rhusiopathiae*. Различают два варианта возбудителя – *suis* (свиной), патогенный также для голубей, и *murisepticum* (мышиный), не патогенный для голубей. Второй вид – *E. tousillarum* – маловирулентен для свиней.

Эризипелоид (рожа свиней) – зооноз, которому свойственна природная очаговость. Источником инфекции являются различные дикие и домашние животные. Чаще всего поражаются свиньи, особенно молодняк, болеют овцы, крупный рогатый скот, лошади, собаки, куры, утки, обнаруживается у рыб. У свиней заболевание может протекать в острой или хронической форме, проявляется в виде септицемий, кожных пора-

жений, эндокардита. Возбудитель выделяется из организма больного животного с кровью и испражнениями, сохраняется в почве, кормах, воде, обсеменяет мясо и кожу от вынужденно убитых животных. В организм человека проникает через поврежденную кожу, слизистую ротоглотки и ЖКТ. Вызывает септицемию, артриты, эндокардиты и кожные поражения. В табл. 7 приведены основные тесты дифференциации *Corynebacterium spp.* и *E. rhusiopathiae*.

Таблица 7

Тесты дифференциации *Corynebacterium spp.* и *E. rhusiopathiae*

Тесты	*Corynebacterium spp.*	*E. rhusiopathiae*
Подвижность при 22—25 °С	–	–
Каталаза	+	–
Рост на средах с теллуритом калия	+	–
Образование H_2S	–	+

Два вида из родов *Arcanobacterium* и *Actinomyces* – *A. haemolyticum* и *A. pyogenes* являются причиной гнойных инфекций, хронических поражений кожи, абсцессов головного мозга, гепатитов, тонзиллитов, пневмоний у человека и животных. Морфологическая схожесть с коринебактериями, общие культуральные свойства, похожие клинические проявления диктуют необходимость их дифференциации с видами коринебактерий.

Таблица 8

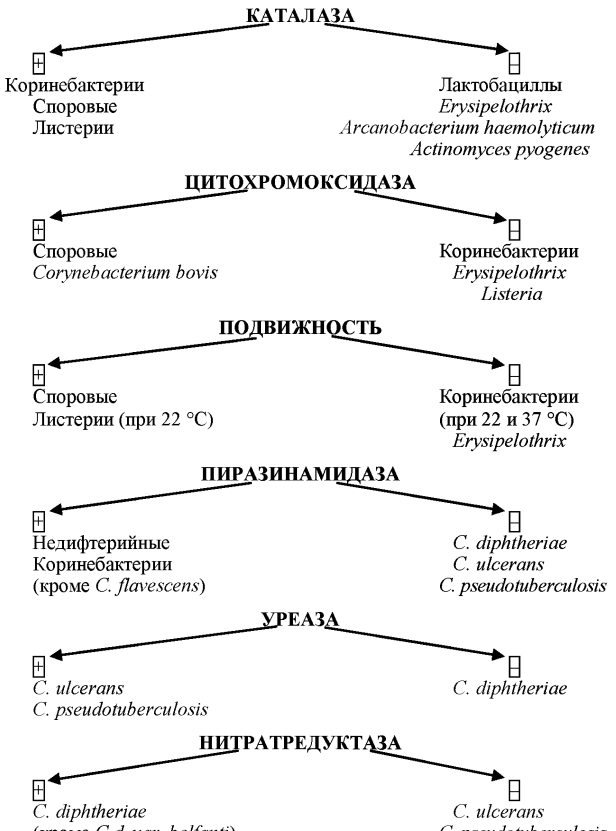
Дифференциация *Corynebacterium spp.* от *A. haemolyticum и A. pyogenes*

Тесты	*Arcanobacterium haemolyticum*	*Actinomyces pyogenes*	*Corynebacterium spp.*
Ферментация:			
ксилозы	–	+	d
крахмала	–	+	d
Активность ферментов:			
каталазы	–	+	+
уреазы	–	–	d
гемолизина	++	++	–

В табл. 8 представлены тесты дифференциации между указанными видами. Как следует из данных таблицы, главными дифференцирующими тестами для этих видов являются ферментация ксилозы, гемолитическая и каталазная активности.

Известно, что при выделении и идентификации коринебактерий большое значение уделяется биохимической характеристике, которая помогает и в дифференциальной диагностике их от других грамположительных палочек. В предлагаемой схеме идентификации представлены шесть тестов (каталазная, цитохромоксидазная, уреазная, нитратредуктазная и пиразинамидазная активности) и тест на подвижность, которые помогают дифференцировать коринебактерии внутри рода и между родами групп 19 и 20 (Определитель бактерий Берджи, 1997).

Схема идентификации клинически значимых грамположительных палочек



4. Приложения

4.1. Питательные среды для культивирования и идентификации коринебактерий

Качество питательной среды – определяющий фактор для любого бактериологического исследования. Для сохранения биологических свойств коринебактерий необходимо создать оптимальные условия для их роста и размножения, что достигается путем добавления в питательную среду ингибиторов сопутствующей микрофлоры (обычно используется 2 %-й раствор теллурита калия) и факторов роста (кровь, сыворотка лошадиная или КРС). Содержание аминного азота 150—190 мг %, pH 7,6.

Среды для первичного посева исследуемого материала

В настоящее время в качестве основы для питательных сред используют сухие коммерческие агары: сухой питательный агар, эритрит-агар, АГВ, агар КД. Питательные среды готовят по прописи. *Ex tempore* добавляют факторы роста и теллурит калия.

В качестве универсальных основ, к которым добавляют 10—15 % дефибринированной крови, берут перевар Хоттингера; сухой питательный агар (СПА), АГВ – агар (обе среды выпускает НПО «Питательные среды»), ГРМ – агар; аминопептид для микробиологических целей. Хорошие результаты получают, когда при приготовлении сред для первичного выделения питательные агаровые основы готовят не на воде, а на питательных бульонах: сухом питательном бульоне, ГРМ – бульоне или 1% пептонной воде. Используют также производственный вариант питательной среды.

1. Агар для культивирования микроорганизмов сухой
(для широкого спектра микроорганизмов)

Состав.

Панкреатический гидролизат кильки	– 17,9 г
Агар	– (11,2 ± 1,2) г
Натрия хлорид	– (7,7 ± 0,3) г
pH 7,1—7,5	

Способ приготовления 2 % питательного агара. Навеску сухого агара, панкреатического гидролизата кильки и натрия хлорида размешать в 1 л дистиллированной воды, прокипятить 1—2 мин до полного расплавления агара. Профильтровать через ватно-марлевый фильтр, разлить в стерильные флаконы и простерилизовать в автоклаве при темпе-

ратуре 121 °С в течение 15 мин. Среду охладить до температуры 45—50 °С и разлить в стерильные чашки Петри. После застывания среду, соблюдая правила асептики, подсушить при (37 ± 1) °С в течение 40—60 мин.

2. Кровяной теллуритовый агар (КТА)

Состав.

2 % питательный агар	– 100 мл
Теллурит калия	– 2 мл 2 %-го раствора
Гемолизированная кровь без консерванта	– 10—15 мл

Способ приготовления. К 100 мл 2 % питательного агара, расплавленного и охлажденного до 50 °С, добавить 2 мл 2 %-го раствора теллурита калия и 10—15 мл гемолизированной крови, которую готовят следующим образом: на каждые 10 мл дефибринированной крови добавить 2 мл стерильной дистиллированной воды. Возможно использовать вместо гемолизированной крови эритроцитарную массу с добавлением дистиллированной воды (на каждые 5 мл эритроцитарной массы прибавить 7 мл дистиллированной воды).

3. Сывороточный агар

Готовится на любой питательной основе, применяемой для культивирования коринебактерий.

Способ приготовления. К 100 мл расплавленного и охлажденного до 50 °С 2 % питательного агара, pH 7,6, стерильно добавить 10 мл инактивированной при 56 °С сыворотки крови лошади или КРС. После тщательного перемешивания среду разливают в стерильные чашки Петри либо в пробирки по 3—4 мл, которые укладывают в наклонном положении для образования скоса. Каждая партия сывороточного агара проверяется на стерильность: несколько пробирок и чашек с готовой средой помещают на сутки в термостат при 37 °С. Среда может применяться только в течение 48 ч при хранении в холодильнике при 4—8 °С. Перед посевом среду подогревают до 37 °С.

4. Кровяной агар

Состав.

2 % питательный агар	– 100 мл
Дефибринированная кровь (человека или лабораторных животных)	– 5 мл

Способ приготовления. К 100 мл расплавленного и охлажденного до 50 °С 2 % питательного агара, pH 7,4—7,6, стерильно добавить 5 % дефибринированной крови или 2,5 % эритроцитарной массы. Смесь тщательно перемешивают, избегая образования пены, и разливают в стерильные чашки Петри, предварительно прогретые в термостате, слоем по 3—4 мм. Хранить не более двух недель при 4—8 °С, предохраняя от высыхания.

5. Среда Тинсдаля

На этой среде возможно выявлять виды коринебактерий, обладающие цистиназной активностью. Эти бактерии после суточной инкубации образуют темные колонии с коричневым ореолом.

Состав.

Основа Tinsdale	– 200 мл
Добавка Difco Tinsdale	– 15 мл
Дистиллированная вода стерильная	– 1 мл

Способ приготовления. Расплавить основу Tinsdale и охладить до 50 °С. Тщательно растворить добавку в дистиллированной воде и внести в основу. Разлить после перемешивания в стерильные чашки Петри.

6. Среда Бучина

Среда позволяет отличать колонии различных видов коринебактерий по цвету.

Состав.

Сухая среда Бучина	– 7—8 г
Дистиллированная вода стерильная (питательный бульон)	– 100 мл
Дефибринированная кровь	– 5 мл

Способ приготовления. К 100 мл дистиллированной воды или питательного бульона добавить 7—8 г порошка сухой хинозольной индикаторной среды Бучина коммерческого изготовления (согласно прописи на этикетке). После тщательного перемешивания подогреть на слабом огне до полного растворения среды. Среду прокипятить в течение 2—3 мин, не допуская пригорания агара, до образования крупнопузырчатой, быстрооседающей пены. К охлажденной до 50 °С среде добавляют 5 мл стерильной дефибринированной крови. Разлить в чашки Петри.

Среду можно использовать в течение 3 суток при хранении при температуре от 4 до 10 °С.

Среды и реактивы для идентификации коринебактерий

1. Определение сахаролитической активности

Принцип метода. Кислоты, образующиеся из углеводов в результате жизнедеятельности микроорганизмов, сдвигают pH среды в кислую сторону, что сопровождается изменением цвета индикатора, растворенного в среде.

Основа среды

Пептон	– 10,0 г
Натрия хлорид	– 5,0 г
Индикатор Андреде	– 10 мл
Вода дистиллированная	– до 1 000 мл

Способ приготовления. В горячую дистиллированную воду добавляют пептон и хлористый натрий, после чего добавляют индикатор Андреде. Устанавливают pH 7,4, кипятят 5 мин, фильтруют через бумажный фильтр, доводят до первоначального объема горячей дистиллированной водой.

Приготовление индикатора Андреде

Фуксин кислый	– 0,5 г
4 % раствор натрия гидроксида	– 16,4 мл
Вода дистиллированная	– до 100 мл

Способ приготовления. Посуда должна быть сухой, химически чистой, с притертой пробкой. Фуксин растворить в воде, добавить натрия гидроксид, выдержать сутки в термостате при 37 °С, периодически встряхивая. Если через 24 ч цвет индикатора не изменится с красного на коричневый, добавить щелочи до 18 мл. При наполнении стеклянной пипетки раствор должен быть светло-оранжевого или соломенно-желтого цвета. Индикатор выдерживают на свету 48 ч, затем помещают в темное место. При длительном хранении реактив в некоторой степени улучшает свои свойства, поэтому он может быть приготовлен в достаточно большом объеме и храниться в течение нескольких лет без доступа света (в посуде темного стекла) при комнатной температуре. Лучше использовать индикатор, выдержанный в таких условиях не менее 6 месяцев.

Альтернативный метод приготовления индикатора Андреде

Фуксин кислый	– 5,0 г
1 N раствор натрия гидроксида	– 150—180 мл
Вода дистиллированная	– 1 000 мл

Способ приготовления. Фуксин растворяют в воде и добавляют раствор щелочи, перемешивают и оставляют при комнатной температуре на 24 ч, периодически встряхивая. Цвет раствора должен измениться от красного до коричневого. Если цвет не изменился, добавляют еще 10 мл щелочи и выдерживают индикатор еще 1 сутки.

Альтернативный метод приготовления индикатора Андреде

Фуксин кислый	– 0,2 г
1 N раствор натрия гидроксида	– 16 мл
Вода дистиллированная	– до 100 мл

Способ приготовления. Растворить фуксин в воде, добавить раствор натрия гидроксида, оставить при комнатной температуре, периодически встряхивая. Если через 24 ч цвет фуксина не изменится с красного на коричневый, добавить еще 1—2 мл щелочи. Автоклавировать при 1 атм. в течение 20 мин.

Приготовление дифференциальных сред для определения сахаролитических свойств

К горячей основе среды добавляют глюкозу, лактозу, сахарозу, маннозу и мальтозу до концентрации 1 %. Стерилизуют при 0,5 атм. в течение 30 мин.

Глюкозу можно добавить к питательной среде до стерилизации. Дисахариды (лактоза, манноза, мальтоза) в виде 10 %-го рабочего раствора стерилизовать при 1 атм. в течение 10 мин. Можно стерилизовать растворы сахаров методом фильтрации, используя фильтр с диаметром пор не более 0,22 мкм. После стерилизации раствор соответствующего углевода добавляют асептично к стерильной питательной основе до концентрации 1 %. Разлить в стерильные пробирки по 1 мл.

Инокуляция микроорганизмов. Засеять исследуемую культуру (суточный или двухсуточный рост).

Инкубация. При 37 °С в течение 24—48 ч с ежедневным учетом результатов.

Оценка результатов. Через указанные сроки инкубирования при разложении углеводов до кислоты появляется розово-красное окрашивание (цвет индикатора фуксина кислого красный при значении pH 5,0 и светло-желтый при pH 8,0).

2. Тест на фосфатазу

Принцип метода. Фермент фосфатаза отщепляет фосфатную группу от фосфорорганического соединения. Образующийся в результате

продукт реакции либо уже является окрашенным, либо приобретает окраску при добавлении соответствующего реактива.

Реактивы, приготовление среды для тестирования

Пара-нитрофенилфосфата динатриевая соль, хч
Натрия фенолфталеинфосфат
25 %-й раствор аммиака
50 мг динатриевой соли пара-нитрофенилфосфата растворяют в 3 мл стерильной дистиллированной воды. Указанный раствор добавляют к 100 мл расплавленного и охлажденного 1,8 % питательного агара, перемешивают, разливают в чашки Петри

Инокуляция микроорганизмов. Суточные агаровые культуры исследуемых штаммов с помощью петли засевают «бляшками» на среду (не более 16 штаммов на одну чашку).

Инкубация. При 37 °С в течение 18—24 ч.

Оценка результатов. Реакция считается положительной, если в толщине среды вокруг выросшей колонии видна зона интенсивного желтого окрашивания.

Альтернативный метод определения активности щелочной фосфатазы

Фенолфталеинфосфат натрия добавляют к агару в концентрации 0,01 %. Посев и инкубация проводятся так же, как и в предыдущем методе.

Оценка результатов. По окончании срока инкубации на крышку чашки Петри наливают 5—6 капель 25 %-го раствора аммиака, выдерживают чашку в перевернутом состоянии 5—10 мин, подвергая выросшую культуру воздействию паров аммиака. О положительной реакции свидетельствует появление розового окрашивания выросших колоний.

Определение щелочной фосфатазы по Р. Вейант и соавт.

Реактив. 100 мг п-нитрофенилфосфат-динатрий-гидрата растворить в 25 мл щелочного буфера (0,01 М глицин, 1 мМ $MgCl_2$). Реактив разливают по 0,3 мл в пробирки и хранят при –20 °С.

Инокуляция микроорганизмов и инкубация. Готовят густую суспензию 18—24 ч культуры в 0,3 мл 0,85 %-го раствора натрия хлорида. Суспензию переносят в пробирку с размороженным реактивом (0,3 мл) для теста и инкубируют 6 ч при 35—37 °С в аэробных условиях.

Оценка результатов. При положительном тесте развивается желтое окрашивание.

3. Тест с метиловым красным

(MR, оценка степени кислотообразования при ферментации глюкозы)

Принцип метода. В ходе роста микроорганизмов и ферментации глюкозы в среде накапливается смесь органических кислот, что приводит к значительному сдвигу pH. Степень кислотообразования оценивают после добавления реактива с индикатором метиловым красным, имеющим зону перехода цвета при pH 4,4.

Приготовление глюкозо-пептонной среды (W. Clark, H. Gubs, 1915)

Пептон	– 7,0 г
Глюкоза	– 5,0 г
Калия гидрофосфат (K_2HPO_4)	– 5,0 г
Вода дистиллированная	– до 1 000 мл
Растворить в воде ингредиенты, разлить по 4—5 мл в пробирки, стерилизовать при 1 атм. в течение 15 мин	

Приготовление реактива для теста MR.

Метиловый красный	– 0,1 г
Спирт этиловый 96°	– 300 мл
Вода дистиллированная	– до 500 мл
Растворить в этаноле краситель и довести объем до 500 мл дистиллированной водой	

Инокуляция микроорганизмов. Засеять в небольшом количестве суточную культуру коринебактерий.

Инкубация. Обычно тест проводят с культурами, выращенными при 37 °С не менее 48 ч.

Оценка результатов. Внести в пробирку с выросшей культурой 5—6 капель реактива для MR и после перемешивания отметить характер окраски. При положительном результате цвет ярко-красный, при слабоположительном – красно-оранжевый, при отрицательном – желтый.

Модификация A. L. Barry и соавт.

Для сокращения времени инкубирования в 0,5 мл среды вносят относительно большое количество инокулюма и оставляют при 37 °С. Через сутки в пробирку добавляют 1—2 капли реактива и учитывают реакцию, как описано выше.

4. Тест на уреазу

(тест на ферментативное расщепление мочевины)

Принцип метода. Образующийся при гидролизе мочевины аммиак сдвигает pH в щелочную сторону, что сопровождается изменением цвета индикатора в среде.

Приготовление бульона с мочевиной

Мясо-пептонный бульон или бульон Хоттингера (pH 7,0)	– 100 мл
Мочевина	– 1 г
1,6 %-й спиртовый раствор интикатора крезолрот	– 0,2 мл
Готовый бульон с мочевиной разливают над пламенеем горелки по 2—3 мл и стерилизуют текучим паром в течение 10 мин	

Инокуляция микроорганизмов. Бульон с мочевиной густо засеять молодой (суточной) культурой микроорганизмов.

Инкубация. При 37 °С в течение 18—20 ч.

Оценка результатов. При положительном результате происходит сдвиг pH среды в щелочную сторону (pH 8,8), что сопровождается появлением красного окрашивания индикатора крезолрот. Отрицательный результат: сдвиг pH в сторону щелочи не происходит – цвет среды желтый (pH 7,2).

Альтернативный метод определения фермента уреазы по Заксе

Реактив А

Мочевина – 2 г

Спирт этиловый 96° – 2 мл

Вода дистиллированная – 4 мл

Реактив не стерилизуют и хранят в холодильнике при 4—5 °С

Реактив В

0,2 %-й раствор фенолрот	– 1 мл
Калий фосфорно-кислый однозамещенный (KH_2PO_4)	– 0,1 г
Калий фосфорно-кислый двузамещенный (K_2HPO_4)	– 0,1 г
Натрий хлористый	– 0,5 г
Вода дистиллированная	– 100 мл
Реактив стерилизуют при 1 атм. в течение 15 мин или текучим паром. Для работы оба реактива смешивают *ex tempore* из расчета 1 часть реактива А и 19 частей реактива В. Смесь разливают по 0,1 мл в узкие пробирки или в стерильные лунки планшетов для иммунологических реакций	

Инокуляция микроорганизмов. Засеять полную петлю (2 мм) суточной культуры и тщательно гомогенизировать суспензию.

Инкубация. При 37 °С в течение 30, 60 мин или 2 ч.

Оценка результатов. Через указанные сроки инкубирования при положительной реакции развивается малиново-красное окрашивание. При отрицательной реакции среда сохраняет желтоватый цвет.

5. Тест на каталазу

Принцип метода. При внесении микробной культуры в раствор перекиси водорода под влиянием фермента каталазы выделяется молекулярный кислород.

Тест-реактив – 3 %-й раствор перекиси водорода.

Тестирование. Тест-реактивом (0,5—1,0 мл) смачивают культуру, выросшую на поверхности агара (нельзя использовать кровяной агар, т. к. каталаза эритроцитов может дать ложноположительную реакцию). В течение нескольких секунд при наличии каталазной активности в жидкости образуются пузырьки газа – кислорода.

Альтернативный метод определения каталазы

Исследуемую колонию вносят в каплю 3 %-й перекиси водорода на чистом предметном стекле и сразу отмечают появление пузырьков газа.

6. Тест на восстановление нитратов
(нитратредуктазный тест)

Принцип метода. Под влиянием микробной нитратредуктазы в ходе восстановления нитрата образуется нитрит, который в присутствии N,N-диметил-1-нафтиламина образует диазосоединение, окрашивающее среду в красный цвет.

Приготовление питательной среды

Питательный бульон (pH 7,3—7,5)*	– 100 мл
Калия нитрат	– 0,1 г

Разливают среду в пробирки по 5 мл или во флаконы по 80 мл и стерилизуют в автоклаве при 120 °С в течение 15 мин

* Питательный бульон и нитрат калия не должны содержать нитриты (проверить реактивом Гриса). На содержание нитритов необходимо также проверить готовую питательную среду.

Инокуляция микроорганизмов. Засеять суточную культуру с питательного агара в пробирку с нитратным бульоном.

Инкубация. При 37 °С в течение 2—5 суток. Для контроля инкубируют пробирку со средой, не засеянной культурой.

Оценка результатов. О восстановлении нитратов судят после добавления в пробирки с ростом и в контрольную реактива Грисса. При наличии нитратредуктазной активности (положительная реакция) в течение нескольких минут после добавления реактива Грисса развивается красное окрашивание. В контрольной пробирке цвет среды не изменяется.

Реактив Грисса состоит из двух растворов

Раствор № 1: 0,8 г сульфаниловой кислоты растворяют в 100 мл 30 % уксусной кислоты при слабом нагревании.

Раствор № 2: 0,6 г альфа-нафталамина растворяют в 100 мл 30 %-й уксусной кислоты. Растворы хранят в посуде из темного стекла с притертой пробкой. Перед использованием растворы смешивают в равных объемах.

7. Определение фермента пиразинамидазы

Принцип метода. Некоторые коринебактерии в ходе роста гидролизуют пиразинамид (амид пиразинкарбоновой кислоты), продукт разложения которого (2 – пиразинкарбоновая кислота) после взаимодействия с солями железа окрашивает среду в коричневый цвет.

I способ

Реактивы

5 %-й водный раствор сульфата аммонийного железа Раствор готовят *ex tempore* либо хранят в замороженном состоянии при –20 °С

Инокуляция микроорганизмов. В стерильную пробирку вносят 0,25 мл стерильной дистиллированной воды, в ней готовят густую, «как молоко», суспензию исследуемой суточной культуры. Таким же образом готовят суспензии положительного и отрицательного контрольных штаммов, а также контроль без добавления микроорганизмов. Стерильным пинцетом в каждую пробирку вносят по одной диагностической таблетке Rosco № 598-21.

Инкубация. При 37 °С в течение 4—18 ч.

Оценка результатов. В каждую пробирку вносят по 1 капле 5 %-го водного раствора сульфата аммонийного железа. При положительной реакции образуется красно-коричневое окрашивание. В незасеянной контрольной пробирке цвет не изменяется, либо приобретает слабый розовый оттенок.

II способ

В 1 мл дистиллированной воды растворяют 2 г пиразинамида. Стерилизуют, пропустив через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Хранят при –20 °С. В порошкообразном состоянии пиразинамид токсичен, поэтому не следует допускать его контакта с кожей и попадания в верхние дыхательные пути.

Раствор сульфата аммонийного железа в присутствии пиразинамида бесцветен. В качестве реактива используют 20 %-й раствор, готовят его на стерильной дистиллированной воде, хранят при –20 °С.

В 0,25 мл раствора пиразинамида вносят несколько капель густой взвеси суточной бактериальной культуры. Инкубируют при 37 °С в течение 4—24 ч, после чего в каждую пробирку прибавляют по одной капле 20 %-го раствора сульфата аммонийного железа. При наличии пиразинамидазы в пробирке появляется красно-оранжевое окрашивание, в отсутствии – среда остается бесцветной или слегка желтеет. Постановка положительного и отрицательного контролей обязательна.

8. Определение тирозиназы

Принцип метода. Образующийся при расщеплении тирозина меланин (тирозин 3,4 диоксифенилаланин 3,4 хинон 2 карбокси-2,3 дигидро-5,6 диоксииндол индол 5,6 хинон меланин) окрашивает среду в коричневый цвет.

Приготовление питательной среды

Питательный агар сухой	– 3,5 г
Тирозин	– 0,1 г
Вода дистиллированная	– 100 мл

К 100 мл дистиллированной воды добавить ингредиенты, расплавить над пламенем горелки, разлить в пробирки и стерилизовать при 0,5 атм. в течение 20—30 мин. После стерилизации приготовить скошенный агар

Инокуляция микроорганизмов. Засеять суточную культуру на поверхность скошенного агара.

Инкубация. Обычно тест проводят с культурами, которые выращивают при 37 °С в течение 24—48 ч.

Оценка результатов. Спустя указанные сроки инкубирования появляется темно-бурое окрашивание агара (положительная реакция).

9. Определение цистиназы

Принцип метода. В результате расщепления L-цистина бактериальным ферментом цистиназой выделяется сероводород, который вступает в реакцию с имеющимся в среде цитратом висмута, в результате чего образуется сернистый висмут – соединение темно-коричневого цвета.

I способ

Питательная среда для идентификации коринебактерий по тесту расщепления цистина разработана и выпускается НПО «Питательные среды» (г. Махачкала).

Основа среды, г/л

Панкреатический гидролизат казеина	– 30,0
Экстракт кормовых дрожжей агаризованный	– 15,0
Мальтоза	– 3,0
Натрия хлорид	– 1,5
Висмута цитрат	– 1,5
L-цистин	– 0,2
Хинозол	– 0,001
Натрия карбонат	– 1,5

Приготовление среды. Навеску препарата, указанную на этикетке, размешать в 1 л дистиллированной воды, кипятить 2—3 мин до полного растворения агара. Среду не стерилизовать. Стерильной пипеткой разлить среду в стерильные пробирки по 4 мл. Готовая среда имеет соломенно-желтый цвет. Допускается осадок на дне пробирки и легкая опалесценция.

Исследуемые культуры вносят бактериологической петлей в столбик среды (уколом) и инкубируют при температуре 37 °С в течение 20 ч.

II способ

В 90 мл дистиллированной воды вносят 2,7 г АГВ – агара, кипятят до полного растворения. Готовят 10 мл 5 %-го раствора гидрокарбоната натрия ($NaHCO_3$), в него вносят 0,1 г L-цистина и кипятят, пока навеска не растворится. 2 мл кипящего раствора цистина вливают в 90 мл АГВ – агара, доводят pH до 7,7, стерилизуют при 0,5 атм. в течение 10 мин, охлаждают до 50 °С и последовательно добавляют 10 мл лошадиной сыворотки, 1 мл 10 %-го раствора уксусно-кислого свинца и 1,5 мл 10 %-го раствора гипосульфита натрия – последние приготовлены перед использованием на стерильной дистиллированной воде, в стерильных пробирках и прогреты на водяной бане при 90 °С в течение 30 мин.

Среду разливают в узкие пробирки столбиком высотой 3—4 см. Посев – уколом. Результаты учитывают через 3—5 ч инкубации.

Постановка заведомо положительного и отрицательного контролей обязательна.

Оценка результатов. Почернение среды по ходу укола и вокруг него и характерное «облачко» коричневого цвета на расстоянии 0,5—1 см от поверхности среды указывают на наличие фермента цистиназы – положительная реакция. Изменения цвета среды отсутствуют или наблюдается слабое почернение по ходу укола, не сопровождающееся «облачком», – отрицательная реакция.

10. Тест на гидролиз крахмала

Принцип метода. В присутствии негидролизованного крахмала йодный раствор синеет, а в случае гидролиза – вокруг колоний бактерий образуется розовая или бесцветная зона.

Состав среды

Пептон	– 1,0 г
Натрий хлористый, хч	– 0,5 г
Крахмала растворимого	– 0,5 г
Индикатор Андреде	– 1 мл
Дистиллированная вода	– 100 мл

Приготовление среды. К 100 мл горячей дистиллированной воды добавить 1,0 г пептона, 0,5 г натрия хлористого и 1 мл индикатора Андреде, установить pH 7,4. Кипятить 5 мин, профильтровать через бумажный фильтр, довести до первоначального объема горячей дистиллированной водой. К полученной основе добавляют 0,5 г растворимого крахмала. Среду разливают в пробирки по 2—3 мл и стерилизуют при 0,5 атм. 30 мин. Готовая среда бесцветная или имеет слегка розоватый оттенок.

Инокуляция микроорганизмов и инкубация. Исследуемые культуры в среду вносят бактериологической петлей. Инкубируют при 37 °С в течение 18—20 ч.

Оценка результатов. При положительной реакции появляется розово-красное окрашивание.

Альтернативный метод.

Питательный агар с крахмалом

Питательный агар*	– 100 мл
Крахмала растворимого	– 2,0 г
Дистиллированная вода	– 10 мл

Смешать 2 г крахмала с 10 мл дистиллированной воды, растворить кипячением и внести в расплавленный питательный агар. При необходимости довести pH до 7,6. Стерилизовать при 1 атм. в течение 15 мин, после чего охладить до 50 °С, тщательно размешать и разлить в стерильные чашки Петри

*Можно использовать среду АГВ, агар Хоттингера, мясо-пептонный агар 1,5 %.

Йодный раствор Люголя. Использовать тот же раствор, которым пользуются для окраски по Граму.

Инокуляция микроорганизмов и инкубация. Суточные культуры исследуемых штаммов засеять в виде бляшек на поверхность агара со средой. Инкубировать при 37 °С 48 ч.

Оценка результатов. После окончания инкубирования чашку заливают раствором Люголя. При отрицательном результате агар вокруг бляшки сразу окрашивается в темно-синий цвет. В случае неполного гидролиза крахмала вокруг бляшек образуется розовая или бесцветная зона.

Примечание. В случае скудного роста коринебактерий к 90 мл расплавленного и охлажденного до температуры 50 °С агара после автоклавирования добавляют 10 мл инактивированной при температуре 56 °С в течение 30 мин сыворотки крови лошади или КРС.

11. Тест на цитохромоксидазу

1. Метод Эрлиха. *Принцип метода.* В присутствии микробной цитохромоксидазы и α-нафтола из N,N-диметил-n-фенилендиамина образуется индофенол синий и развивается ярко-синее окрашивание.

Тест-реактивы.

Раствор А

α-нафтол	– 1,0 г
Спирт этиловый 96°	– до 100 мл
Раствор хранится при 4 °С в темной посуде до 10 дней	

Раствор В

N,N-диметил-n-фенилендиамин (можно заменить на n-аминодиметиланилин гидрохлорид)	– 1,0 г
Спирт этиловый 96°	– до 100 мл
Раствор готовится в небольшом количестве. Хранить при 4 °С в темной посуде 1 день	

Перед употреблением к 3 частям раствора А прибавить 7 частей раствора В.

Альтернативный метод. Полоску фильтровальной бумаги пропитывают смесью реактивов А и В и высушивают. Готовые полоски хранят в сухом темном месте. Полоски, не изменившие свой цвет, пригодны для использования.

Тестирование. На колонии 24-часовой культуры исследуемого штамма нанести смесь реактивов, смачивая всю поверхность роста.

При применении тест-полосок платиновой петлей или запаянной стеклянной пипеткой растирают несколько колоний исследуемой культуры на полоске. При использовании петель из нихрома или других сплавов развивается ложноположительное окрашивание. Активность реактивов и тест-полосок необходимо регулярно проверять с положительными по оксидазе тест-штаммами (например, *Pseudomonas aeruginosa*).

Оценка результатов. При наличии цитохромоксидазы через 2 мин на поверхности роста культуры или на полоске фильтровальной бумаги, пропитанной реактивом, развивается синее окрашивание. Большинство оксидазоположительных культур дают темно-синее окрашивание через 30 с. Сомнительные реакции, которые развиваются позже 2 мин, как положительные не учитываются.

2. Метод Ковача. *Принцип метода.* Из тетраметил-п-фенилендиамина гидрохлорида под воздействием окисленного бактериального цитохрома С образуется вурстеровский синий и развивается темно-красное окрашивание. Метод имеет преимущество как более стабильный и чувствительный, при этом реактив тетраметил-п-фенилендиамина гидрохлорид менее токсичен.

Тест-реактив (реактив Ковача)

Тетраметил-п-фенилендиамина гидрохлорид	– 0,5 г
Дистиллированная вода	– до 100 мл
Для приготовления реактива рекомендуется использовать воду, полученную с помощью стеклянного дистиллятора	

Тестирование. На изолированную колонию тестируемого штамма наносят каплю реактива.

Альтернативный метод. Применение тест-полосок из фильтровальной бумаги, пропитанной реактивом Ковача, аналогично описанному выше.

Контроль реактива и тест-полосок проводят, как для метода Эрлиха.

Оценка результатов. При положительном результате на поверхности культуры или тест-полоски через 10 с появляется розовое (с переходом в темно-лиловое) окрашивание.

12. Тест на подвижность

Принцип метода. Подвижные бактерии образуют в прозрачной полужидкой среде диффузное помутнение различной степени.

Полужидкий питательный агар

Мясной экстракт*	– 3,0
Пептон	– 10,0
Натрий хлорид	– 5,0
Агар	– 4,0
Дистиллированная вода	– до 1 000 мл

* Мясной экстракт при необходимости можно готовить на мясной воде (400 мл), уменьшив соответственно количество дистиллированной воды или заменив на дрожжевой экстракт (2,0).

Приготовление. Растворить питательную основу и соль в воде, установить pH 7,2—7,4, добавить агар, расплавить при нагревании, постоянно помешивая, профильтровать. Готовая среда должна быть прозрачной. Разлить в пробирки по 8,0 мл. Стерилизовать при 1 атм. – 15 мин. Охладить в вертикальном положении.

Инокуляция. Засеять молодую культуру со скошенного питательного агара уколом в верхнюю часть столбика среды на глубину около 5 см.

Инкубирование. При 37 °С в течение 1—2 дней.

Оценка результатов. Подвижные бактерии дают диффузное помутнение среды. Неподвижные – растут по ходу укола. Среда при этом остается прозрачной.

Альтернативный тест на подвижность.

Состав полужидкого питательного агара

Натрий хлорид	– 5 г
Гидролизат Хоттингера	– 120—150 мл
Агар	– 3—4 г
Вода дистиллированная	– 1 000 мл

Приготовление. Гидролизат Хоттингера разводят водой до содержания в среде 1,3—1,4 % аминного азота, добавляют агар и полностью расплавляют, подогревая среду при постоянном помешивании. Затем фильтруют в горячем состоянии, проверяют визуально прозрачность. Освобождают от мути отстаиванием в узких сосудах. Среду разливают по 5 мл в пробирки и стерилизуют при 121 °С в течение 30 мин. Готовый полужидкий агар охлаждают в виде столбика. Среда должна быть совершенно прозрачной.

13. Индикаторная проба

Принцип метода. Метод основан на редукции и оксидации красок в средах при выращивании листерий.

Приготовление индикаторов

Настойка лакмуса: 5 г сухого лакмуса (но не лакмойда) растирают в порошок, смешивают с 50 мл спирта-ректификата и ставят в термостат при температуре 37 °С на 3 дня; каждый день спирт меняют. На четвертые сутки спирт сливают, порошок высушивают в чашке Петри и заливают десятикратным количеством дистиллированной воды; раствор фильтруют.

Метиленовую синь, нейтраль-рот, метил-рот, конго-рот и амидо-черный готовят в виде 0,1 %-х растворов на дистиллированной воде и стерилизуют отдельно от питательной среды при 1 атм. 30 мин.

Приготовление индикаторных сред

Среда с лакмусом: к 100 мл МПБ или бульона Хоттингера добавляют 1 мл настойки лакмуса. Цвет среды – сиреневый.

Среда с нейтраль-ротом в смеси с метиленовой синью: к 100 мл МПБ или бульона Хоттингера добавляют по 1 мл 0,1 %-х растворов нейтраль-рота и метиленовой сини. Цвет среды зеленовато-голубой или зеленый.

Среды с лакмусом и нейтраль-ротом в смеси с метиленовой синью разливают по пробиркам с ватными пробками и стерилизуют при 1 атм. 30 мин.

Среда с метил-ротом: в пробирку с 10 мл стерильного МПБ или бульона Хоттингера добавляют 0,3 мл стерильного 0,1 %-го водного раствора метил-рота, цвет среды лимонно-желтый.

Среда с конго-ротом: в пробирку с 10 мл стерильного МПБ или бульона Хоттингера добавляют 0,3 мл стерильного 0,1 %-го водного раствора конго-рота, цвет среды красный.

Среда с амидо-черным: к 10 мл стерильного МПБ или бульона Хоттингера добавляют 0,3 мл стерильного 0,1 %-го водного раствора амидо-черного, цвет среды черный с фиолетовым оттенком.

Примечание. Практически 0,1 %-е стерильные растворы метил-рота, конго-рота, амидо-черного можно добавлять в пробирки со стерильным МПБ или бульоном Хоттингера стерильной пастеровской пипеткой из расчета по 1 капле раствора индикатора на 1 мл бульона.

Ход исследования. Исследуемую бульонную культуру или смыв агаровой культуры засевают в объеме 2—4 капель не менее чем на две из пяти указанных выше сред. Пробирки встряхивают и помещают в термостат при 37—38 °С вместе с контрольными (незасеянными) средами. Результат учитывают через 3—6, 24, 48 ч.

Возбудитель листериоза через 3—6 ч обесцвечивает среду с лакмусом и среду с нейтраль-ротом в смеси с метиленовой синью до цвета бульона, лишь у поверхности на границе с воздухом остается окрашенный ободок. При встряхивании цвет частично восстанавливается, поэтому посевы просматривают, не встряхивая пробирки.

Среда с метил-ротом обесцвечивается через 3—6 ч, но восстановления цвета среды не происходит.

Обесцвечивание сред с конго-ротом и с амидо-черным происходит в более поздние сроки: через 6—48 ч, при этом исходный цвет среды после обесцвечивания не восстанавливается.

Возбудитель рожи свиней не обесцвечивает ни одну из вышеуказанных сред.

Для биохимической идентификации выделенных микроорганизмов существует ряд биохимических тест-систем и наборов.

4.2. Контроль качества питательных сред, референс-штаммы Corynebacterium, хранение музейных культур

Обязательному контролю подлежат все новые серии коммерческих и приготовленных в лабораторных условиях питательных сред. Контроль включает определение:

- аминного азота;
- pH;
- скорости формирования колоний;
- ингибирующей активности в отношении сопутствующей микрофлоры;
- стерильности;
- биохимических свойств на эталонных музейных штаммах и на клинических изолятах бактерий.

Контроль питательных сред и реактивов осуществляется с помощью методик, определенных нормативными документами по диагностике дифтерии, а также с помощью референсных штаммов микроорганизмов.

Хранение музейных культур. Культуру в течение суток инкубируют на 0,1—0,2 % питательном агаре с 10 % сыворотки. При наличии роста заливают слоем стерильного вазелинового масла. Хранят культуру в холодильнике. Пересевают один раз в три месяца. В работе при постановке тестов используют суточные культуры.

При снижении токсигенных свойств контрольные штаммы пассируют 3—4 раза через полужидкий питательный агар с добавлением 0,2 % глюкозы и 10 % крови. Хорошие результаты дает пассирование культур через 199 среду с добавлением 20 % сыворотки крупного рогатого скота.

Список литературы

1. Коротяев А. И., Бабичев С. А. Медицинская микробиология. С-Пб.: «Специальная литература», 1998. 580 с.

2. Листериозная инфекция: Учебное пособие /А .Я. Цыганенко, В. И. Белозерский, Н. В. Павленко и др. Харьков, 1996. 37 с.

3. Маянский А. Н. Микробиология для врачей. Нижний Новгород: Изд-во НГМА, 1999. 393 с.

4. Медицинская микробиология /Гл. ред. В. И. Покровский, О. К. Поздеев. М.: ГЭОТАР МЕДИЦИНА, 1999. 1200 с.

5. Нобл У. К. Микробиология кожи человека. М.: Медицина, 1986. 302 с.

6. Общая микробиология с вирусологией и иммунологией (в графическом изображении). М.: «Триада» Х, 2002. 347 с.

7. Определитель бактерий Берджи: Пер с англ. /Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крита и др. М.: Мир, 1997. В 2 т.

8. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии /ВОЗ, Женева, 1991. 132 с.

9. Приказ № 535 «Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений», утв. МЗ СССР 22.04.1985. М., 1985.

10. Строганов В. П. Нормальная микрофлора – как интерпретировать это понятие /Инфекции и антимикробная терапия. 1999, № 1. С. 1—4.

11. A Manual Of Bacteriology /Herbert U. Williams /U.S.A. 2008. 480 p.

12. General Microbiology. Fourth edition /Roger Y. Stanier, Edward A. Adelberg, John L. Ingraham /U.S.A. 1977. 874 p.

13. Koneman E. W., Allen S. D., Janda W. M. et al. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5 th . Ed. New York Lippincott, 1977.

14. Manual of Clinical Microbiology (2 Volume Set). 9-th edition /Patrick R. Murray /U.S.A. 2007. 1350 p.

15. Microbiology Laboratory Manual. 7-th Edition /John Harley, John P Harley /U.S.A. 2007. 2256 p.

16. Murray P. R., Baron E. J., Pealler M. A., Tenover F. C., Yolten R. H. Manual of clinical microbiology. 7 th Td /Washington, D.C.: ASM Press/, 1999. P. 442—496.

17. Stager C. E., Davis J. R. Automated systems for identification of microorganisms/ Clin.Microbiol.Rev. 1992. № 5. P. 302—327.

18. Topley & Wilson's Principles of bacteriology, virology and immunity /8 edition, B.C. Decker Inc. Philadelphia, Hamilton. V. 2. Systematic bacteriology.

gost.e-ecolog.ru