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

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции

Методические указания
МУК 4.2.3065—13

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.9
Л12

Л12 **Лабораторная** диагностика дифтерийной инфекции: Методические указания.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013.—63 с.

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Е. Б. Ежлова, А. А. Мельникова, Н. А. Кошкина); ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора (М. В. Зароченцев, И. В. Новокшонова); ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора (И. К. Мазурова, О. Ю. Борисова, С. Ю. Комбарова, В. Г. Мельников, Н. М. Максимова, Т. Н. Якимова); ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве» Роспотребнадзора (Н. Я. Салова, И. П. Требунских).

2. Рекомендованы к утверждению Комиссией по государственному санитарно-эпидемиологическому нормированию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (протокол от 30 мая 2013 года № 1).

3. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 14 июля 2013 г.

4. Разработаны взамен МУ 4.2.698—98 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

ББК 51.9

© Роспотребнадзор, 2013
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2013

Содержание

1. Область применения 4
2. Общие положения. Сущность метода 4
3. Характеристика возбудителя дифтерийной инфекции 9
4. Требования к взятию и транспортированию материала для бактериологической диагностики дифтерии 13
5. Организационно-методическая работа 15
6. Бактериологическое исследование 16
6.1. Порядок проведения бактериологического исследования 16
6.2. Бактериологическое заключение 20
6.3. Схема бактериологического исследования 22
7. Методики идентификации возбудителя дифтерийной инфекции 23
7.1. Определение токсигенных свойств коринебактерий дифтерии с помощью реакции преципитации в геле 23
7.2. Методики определения биохимических признаков 30
8. Питательные среды 32
8.1. Методы приготовления питательных сред и реактивов 34
8.2. Среды для определения биохимических свойств 39
9. Хранение контрольных штаммов в лабораторных условиях 42
10. Методы контроля питательных сред 43
10.1. Метод бактериологического контроля питательных сред для первичного посева и сред для определения токсигенных и биохимических свойств 43
10.2. Метод количественного определения аминного азота 45
11. Методика постановки реакции пассивной гемагглютинации для выявления противодифтерийных антитоксических антител (РПГА) 46
12. Нормативные и методические ссылки 53
Приложение 1. Рецепты красок 54
Приложение 2. Материалы и оборудование 56
Приложение 3. Таблица и рисунки 59

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации
Г. Г. Онищенко
14 июля 2013 г.

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции

Методические указания
МУК 4.2.3065—13

1. Область применения

Методические указания (далее – МУ) предназначены для специалистов бактериологических лабораторий санитарно-эпидемиологической службы, лечебно-профилактических организаций независимо от их организационно-правовой формы и формы собственности и научно-исследовательских институтов, осуществляющих лабораторную диагностику дифтерийной инфекции.

2. Общие положения. Сущность метода

Бактериологическое исследование проводят с целью лабораторной диагностики дифтерийной инфекции, выявления источников инфекции, подтверждения эпидемиологических связей и наблюдения за распространением токсигенных коринебактерий дифтерии. Цель бактериологического исследования – выявление возбудителя дифтерии с помощью минимального количества диагностических тестов, необходимых, достаточных и специфичных для получения достоверного ответа в максимально сжатые сроки: не менее трёх суток – отрицательный ответ, трёх-четырёх суток – ответ о выделении токсигенных коринебактерий дифтерии (возбудителя дифтерии), четырёх-пяти суток – ответ о выделении нетоксигенных коринебактерий дифтерии или других представителей этого рода.

Возбудитель дифтерии – коринебактерии дифтерии (*Corynebacterium diphtheriae*), продуцирующие дифтерийный токсин (экзотоксин).

Источником инфекции является больной или бактерионоситель токсигенных *C. diphtheriae*.

Нетоксигенные *C. diphtheriae* не вызывают дифтерийную инфекцию. «Этиологическая» значимость этих микроорганизмов при фарингите, артрите, эндокардите и др. гнойно-септических заболеваниях требует специальных доказательств. При выделении нетоксигенных штаммов C.diphtheriae от больных с подозрением на дифтерийную инфекцию следует обратить внимание на правильность проведения бактериологического исследования и оценку токсигенных свойств.

Способность *C. diphtheriae* вырабатывать экзотоксин опосредован феноменом фаговой (или лизогенной) конверсии. Конверсию нетоксигенных штаммов *C. diphtheriae* в токсигенные и наоборот можно воспроизвести в особых экспериментальных (лабораторных) условиях. В тех случаях, когда при первичном посеве исследуемого материала от больных дифтерией или бактерионосителей выделяют токсигенные, а при повторных обследованиях после лечения антибиотиками – нетоксигенные коринебактерии дифтерии, можно предположить, что токсигенные и нетоксигенные *C. diphtheriae* колонизировали слизистые ротоглотки и носа одновременно. При лечении антибиотиками в первую очередь исчезают токсигенные штаммы, как более чувствительные к их действию, а нетоксигенные штаммы продолжают выделяться. Обнаружение только нетоксигенных штаммов у бактерионосителей при повторных обследованиях после лечения нельзя трактовать, как утрату способности токсигенных штаммов продуцировать экзотоксин.

Таксономически близкими к виду *C. diphtheriae* являются *Corynebacterium ulcerans* и *Corynebacterium pseudotuberculosis* – природные патогены крупного и мелкого рогатого скота, лошадей, домашних животных, способные вырабатывать дифтериеподобный экзотоксин, в редких случаях могут вызывать заболевания у человека.

Известны случаи выделения токсигенных *C. ulcerans* при клинической картине заболевания, сходной с дифтерией, а также токсигенных *C. pseudotuberculosis*, вызывающих лимфадениты. Инфекции, вызванные этими микроорганизмами, у человека встречаются крайне редко, не имеют эпидемического распространения, а, следовательно, значение этих случаев в медицине невелико.

На слизистых оболочках ротоглотки и носа в норме часто встречается *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (ложнодифтерийная палочка Гофмана). Умение выделять и идентифицировать данные микроорганизмы, а также нетоксигенные *C. diphtheriae* служит критерием оценки

качества работы бактериологов, особенно в период снижения и спорадической заболеваемости дифтерией.

C. diphthereiae растут на питательных средах, сбалансированных по своему составу, и не растут на простых питательных средах. Требуется кровь любого животного или человека (донора), как источник аминокислот, ростовых факторов, железа и пр. Не всегда коммерческие среды удовлетворяют этим требованиям, поэтому контроль качества питательных сред и всех ингредиентов в лабораториях обязателен.

Кровяные теллуритовые среды (КТА, Клауберг II) остаются лучшими селективными дифференциально-диагностическими средами, обеспечивающими рост колоний через 24 ч, что на одни сутки сокращает сроки выдачи окончательного бактериологического ответа. КТА прост в приготовлении: основой этой среды является коммерческий сухой питательный агар (СПА), в качестве кровяных добавок используют кровь, однако не исключены любые гемолизированные кровяные добавки.

Трудоемкость бактериологического метода и стоимость анализа сокращается при использовании двух половин одной чашки с селективной дифференциально-диагностической питательной средой (далее плотная питательная среда) для посева материала из зева и носа от одного обследуемого. Использование ¼ чашки для посева таких образцов на плотной питательной среде недопустимо, так как не позволяет, в большинстве случаев, получить рост изолированных колоний и провести исследование в установленные сроки.

Посев материала из зева и носа на кровяной агар производить нецелесообразно, так как очень сложно получить рост изолированных колоний *C.diphtheriae* на данной среде из-за обильного роста другой сопутствующей микрофлоры.

Колонии, морфология которых характерна для микроорганизмов рода *Corynebacterium*, в подавляющем большинстве не подлежат микроскопии и должны быть изучены по всем необходимым идентификационным тестам. «Сомнительные» колонии с нехарактерными морфологическими свойствами подвергают микроскопии. Если в мазках обнаруживают коринеформные микроорганизмы, исследование следует продолжить по всем необходимым идентификационным тестам.

Окрашивание мазков осуществляют по Лёффлеру (щелочной метиленовый синий) или с использованием других синих красителей. Окраску по Граму не применяют, т. к. в процессе окраски клетки грамположительных *C.diphtheriae* легко обесцвечиваются спиртом и могут выглядеть грамотрицательными (розовый оттенок). Чаще всего это явление наблюдают при окрашивании токсигенных *C. diphtheriae* (клеточная

стенка токсигенных *C. diphtheriae* ближе по организации и структуре к грамотрицательным микроорганизмам).

В бактериологической практике опираться только на морфологические свойства микробной клетки или колоний при идентификации *C. diphtheriae* недостаточно. Описаны случаи бактериологической гипо- и гипердиагностики (в 55,0 и 14,5 % случаев соответственно), когда использовали учет только морфологических признаков.

При идентификации *C. diphtheriae* необходим комплекс идентификационных тестов. Основной специфический тест для выявления возбудителя дифтерии, правильная постановка которого является залогом успешной диагностики дифтерийной инфекции, – определение у выделенной культуры способности к продукции дифтерийного токсина. Определять продукцию токсина следует начинать уже в первый день появления роста изолированных колоний на чашках с плотной питательной средой, исключая этап накопления чистой культуры. Не соблюдение этого правила увеличивает сроки исследования на одни сутки.

Во избежание ошибок при определении токсигенных свойств коринебактерий необходимо изучать данный признак у максимального числа выросших колоний (двадцать и более) с чашек первичного посева. При множественном росте подозрительных колоний нельзя ограничиться формированием только одной-двух бляшек. Кроме того, необходимо изучать токсигенные свойства отдельных изолированных колоний, чтобы не потерять нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae*, присутствие которых также возможно при наличии токсигенных *C. diphtheriae* в патологическом материале.

Используют два способа постановки пробы на токсигенность:

1) модифицированная проба Элека с бумажными полосками, утверждённая для бактериологической практики в нашей стране в 1961 г.;

2) проба Фельдмана Ю. Г. и соавторов с бумажными дисками, разработанная в нашей стране и утвержденная в 1988 г., получившая одобрение Международной рабочей группы ВОЗ по лабораторной диагностике дифтерийной инфекции к применению в зарубежных лабораториях.

В пробе на токсигенность следует использовать только антитоксин – противодифтерийные антитоксические антитела, очищенные методом специфической сорбции, что позволяет избежать появления неспецифических линий преципитации микробного происхождения. В исключительных случаях при отсутствии антитоксина допускается использование лечебной противодифтерийной антитоксической лошадиной сыворотки. В таком случае возможно появление неспецифических линий

преципитации микробного происхождения, которые необходимо отличить от специфических линий токсического происхождения.

Обязательными являются биохимические тесты – на цистиназу, уреазу, расщепление глюкозы, сахарозы и крахмала. Тест на нитраты проводят только при положительной уреазной реакции. Использование других тестов, применяемых в некоторых зарубежных странах, необоснованно увеличивает продолжительность, трудоемкость, стоимость исследования и не всегда приводит к точной идентификации «недифтерийных» микроорганизмов (других представителей рода *Corynebacterium*). При лабораторной диагностике дифтерии не является обязательным определение видовой принадлежности «недифтерийных» коринебактерий рода *Corynebacterium*, тем более что их идентификация требует отдельных хемотаксономических и молекулярно-генетических методов исследования.

C. diphtheriae подразделяют на культурально-биохимические варианты (биовары) *gravis*, *mitis*, *intermedius*, *belfanti*. В бактериологической практике определению подлежат биовар *gravis* и объединенная группа «митисных форм» – *mitis*, *intermedius*, *belfanti*, т. е. группа микроорганизмов *C. diphtheriae*, которая не обладает амилазной активностью (не разлагает крахмал). Биовар *belfanti* не подлежит отдельному определению, так как этот микроорганизм не способен продуцировать экзотоксин. В бактериологической диагностике отдельного выделения биовара *intermedius* также не требуется, так как относительно условными дифференцирующими признаками от биовара *mitis* являются только размер колоний и наличие липофильности. Таким образом, в бактериологической диагностике определяются токсигенные и биохимические свойства *C. diphtheriae* биовара *gravis* и группы микроорганизмов, у которых отсутствует амилазная активность, объединённые в группу *C. diphtheriae* биовар *mitis*.

Молекулярно-генетические методы для лабораторного выявления *C. diphtheriae* находятся в стадии разработки. Имеющиеся тест-системы для метода ПЦР не могут различить ген дифтерийного токсина токсигенных штаммов от «молчащего» гена дифтерийного токсина нетоксигенных токснесущих штаммов *C. diphtheriae*, не способных продуцировать токсин из-за мутаций в этом гене. Это может привести к гипердиагностике. Поэтому их использование в лабораторной диагностике дифтерии может иметь только вспомогательное значение – поиск нетоксигенных токснесущих штаммов *C. diphtheriae* среди нетоксигенных штаммов.

3. Характеристика возбудителя дифтерийной инфекции

Род *Corynebacterium* гетерогенный, как и группа, условно объединившая его и другие роды грамположительных палочек, не образующих споры размером 0,3—0,8 × 1,5—8,0 мкм, неподвижных, обладающих различной степенью полиморфизма и плеоморфизма. *C.diphtheriae* имеют размер 0,2—0,6 × 1,0—7,0 мкм. Арабиногалактановый полимер клеточной стенки *C.diphtheriae* отличает этот вид от всех других видов рода *Corynebacterium*. Клеточная стенка *C. diphtheriae* имеет от 3—5 до 7—9 слоёв. Известно, что клеточная стенка токсигенных C.diphtheriae лучше дифференцирована и более тонкая по сравнению с клеточной стенкой нетоксигенных *C. diphtheriae* и других коринеформных микроорганизмов этого рода, что определяет их отношение к антибиотикам – токсигенные более чувствительны, чем нетоксигенные к пенициллину, эритромицину, тетрациклину и макролидам. Однако появляются штаммы *C. diphtheriae* устойчивые к некоторым антибиотикам, преимущественно выделенные от бактерионосителей.

Патогенные для животных *Corynebacterium ulcerans* и *Corynebacterium pseudotuberculosis*, некоторые комменсалы кожи со слизистых оболочек человека, например, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* (ложнодифтерийная палочка Гофмана), *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium striatum* таксономически близки к виду *C. diphtheriae*.

Большинство видов лучше растет в аэробных условиях, в том числе и микроорганизмы вида *C. diphtheriae*. Вместе с тем, *C. diphtheriae* являются факультативными анаэробами (генерируют энергию, используя как молекулярный O_2, так и органические соединения), что крайне важно учитывать при изучении их ферментативной активности.

Все коринебактерии, в т. ч. и *C. diphtheriae*, являются мезофилами и растут при 36—37 °С.

Устойчивость к факторам внешней среды

C. diphtheriae устойчивы к низкой и чувствительны к высокой температуре (низкие температуры не убивают дифтерийные палочки длительное время, под действием прямого солнечного света палочки дифтерии гибнут в течение нескольких дней); значительно устойчивы во внешней среде и длительно сохраняют жизнеспособность в дифтерийной плёнке, в капельках слюны, на ручках дверей, детских игрушках до 15 дней; в пыли, на полу, на предметах в окружении больного до 18—40 дней; в сухой дифтерийной плёнке до 7 недель; в воде выживают в течение 6—20 дней. Коринебактерии дифтерии не устойчивы к действию физических и химических обеззараживающих средств и разрушаются под действием обычных дезинфектантов в обычных концентрациях (3—

5 %) при экспозиции 30 мин; погибают при нагревании до 60 °С в течение 10 мин, кипячение убивает их моментально.

Культурально-морфологические свойства

Обычно колонии микроорганизмов из рода *Corynebacterium* на плотных питательных средах (например, на кровяном агаре) имеют серовато-белую или желтую окраску, непрозрачные или полупрозрачные, приподнятые, округлой формы, диаметром 1—3 мм. Чаще всего они бывают мягкой, маслянистой консистенции, хотя некоторые виды рода *Corynebacterium* могут образовывать шероховатые R-колонии и крошиться при прикосновении. На питательных средах, сбалансированных по своему составу и удовлетворяющих требованиям культивирования *C. diphtheriae* через 24—48 ч роста вариант *mitis* образует колонии S-типа – приподнятые, гладкие, диаметром 1—2 мм; S-R-колонии варианта *gravis* обычно выпуклые, с приподнятым центром, диаметром 2—3 мм; колонии варианта *intermedius* – S-типа, мелкие, плоские, гладкие, с ровным краем, диаметром 0,5—1 мм.

На селективных дифференциально-диагностических средах – кровяной теллуритовый агар (КТА) и Клауберг II через 24—48 ч роста колонии *C. diphtheriae* варианта *gravis* имеют серо-черную или черную окраску с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), непрозрачные, матовые, приподнятые с выпуклым центром, округлой формы, диаметром 1—3 мм, имеют радиальную исчерченность (форма «маргаритки») или выраженную краевую изрезанность, часто крошатся при прикосновении; колонии *C. diphtheriae* варианта mitis имеют серо-черную или черную окраску («цвет мокрого асфальта»), непрозрачные, матовые, приподнятые с выпуклым центром, иногда плоские, округлой формы, диаметром 1—2 мм, чаще всего бывают мягкой, маслянистой консистенции или могут крошиться при прикосновении; колонии *C. diphtheriae* варианта *intermedius* имеют серо-черную окраску, мелкие, плоские, гладкие, с ровным краем, диаметром 0,5—1,0 мм, мягкой, маслянистой консистенции.

Морфология колоний *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis* на КТА через 24—48 ч роста идентична морфологии колоний *C. diphtheriae* варианта *gravis*, серо-черной или черной окраски («цвет мокрого асфальта»), иногда с коричневым оттенком, колонии непрозрачные, матовые, приподнятые с выпуклым центром, округлой формы с радиальной исчерченностью (или без неё), диаметром 1—2 мм. Колонии *C. pseudodiphtheriticum* – серого цвета с характерным светлым ободком, непрозрачные, приподнятые, матовые, округлой формы, диаметром 1—2 мм.

На теллуритовой среде без крови (коринебакагар) колонии *C. diphtheriae* через 24 ч роста мелкие (иногда 0,2—0,6 мм), через 48 ч роста размер колоний увеличивается до 1,0—1,2 мм, иногда наблюдаются «гигантские» колонии. Однако морфология колоний изменяется – исчезает исчерченность края, к 48 ч колонии меняют характерную для *C. diphtheriae* архитектонику – плоские, «расползающиеся» по поверхности агара, иногда меняется цвет колоний.

Помимо относительно условной оценки морфологии колоний на питательной среде первичного посева существует несколько других признаков, позволяющих различать биовары *gravis*, *mitis*, *intermedius*. Например, характерный рост на бульоне в пробирке: для биовара *gravis* – поверхностная пленка, бульон прозрачен, на дне пробирки через 24 ч организуется осадок; для биовара *mitis* – диффузное помутнение среды с образованием осадка, для биовара *intermedius* – тонкое гранулярное помутнение с последующим оседанием гранул на дно пробирки.

На кровяном агаре можно наблюдать гемолиз эритроцитов (кроличьих и крупного рогатого скота) при росте биовара *mitis*, гемолиз только кроличьих эритроцитов при росте биовара *gravis* и отсутствие гемолиза при росте биовара *intermedius*. Однако только биовар *intermedius* обладает липофильностью – способностью усиливать рост на среде с 0,3 % твина – 80.

Морфология клетки

Для *C. diphtheriae* характерен значительный полиморфизм – разнообразие размеров и формы клеток. Клетки имеют форму булавы, ракетки, палочки, овоида и т. п. Клетки *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis* чаще всего имеют овоидную форму. На средах КТА овоидную форму часто приобретают токсигенные *C. diphtheriae*. Взаиморасположение клеток напоминает римские цифры X, V, иногда – «китайские иероглифы». Подобную форму клетки приобретают при делении. Возможно параллельное расположение клеток, что особенно характерно для *C. pseudodiphtheriticum* и *C. pseudotuberculosis*.

При окраске часто обнаруживается выраженная внутриклеточная исчерченность, что объясняется наличием зерен волютина (метахроматические гранулы, тельца Бабеша-Эрнста). Описано сродство волютина к метиленовому синему (окраска по Лёффлеру), поэтому при обработке этим красителем гранулы или полоски (скопления гранул) прокрашиваются в синий цвет, а протоплазма в отдельных случаях может приобрести розовый оттенок. В бактериологической практике окраску по Граму не используют, поскольку клетки *C. diphtheriae* легко обесцвечиваются спиртом и могут выглядеть в мазке как грамотрицательные микроорга-

низмы. При окраске по Нейссеру, которую также редко используют, клетки *C. diphtheriae* окрашиваются в желтый цвет с зернами волютина (на концах клетки) темно-коричневого цвета, иногда с синим оттенком.

Ферментативная активность

Ферментативная активность коринебактерий изучается путем определения ферментов цистиназы, уреазы, способности расщеплять до кислоты глюкозу, сахарозу и крахмал (табл. 1). *C. diphtheriae* продуцируют фермент цистиназу, отсутствует продукция фермента уреазы, разлагают глюкозу, крахмал (биовар *gravis*), не разлагают сахарозу. Биовар *mitis* не разлагает крахмал. *C. diphtheriae* способны восстанавливать соли азотной кислоты (нитраты) в соли азотистой кислоты (нитриты).

Токсигенные свойства

C. diphtheriae, вызывающие заболевание дифтерией, обладают токсигенными свойствами. Основными генами патогенности *C. diphtheriae*, отвечающими за токсинообразование, являются ген дифтерийного токсина – *tox* и регуляторный ген – *dtxR*. 55—65 % токсигенных *C. diphtheriae*, циркулирующих в период спорадической заболеваемости дифтерией, имеют изменения (мутации) в этих генах, некоторые из них приводят к повышению уровня токсинообразования. Подобные изменения характеризовали большинство штаммов *C. diphtheriae*, распространенных в 90-е годы во время эпидемии дифтерии в России и вызвавшие тяжелые формы клинического течения заболевания.

Уровень токсинообразования штаммов *C. diphtheriae* биовара *gravis* в два–четыре раза превышал уровень токсинообразования биовара *mitis*, вызывая более тяжелое клиническое течение дифтерии в период последней эпидемии. Также, начиная с 90-х годов прошлого столетия, биовар *gravis* имеет доминирующее распространение среди токсигенных *C. diphtheriae,* в то время как среди нетоксигенных *C. diphtheriae* доминирующее распространение имеет биовар *mitis*. От 2,0 до 20,0 % этой группы в различные периоды эпидпроцесса составляли штаммы, несущие «молчащий» ген дифтерийного токсина (*tox*–ген), не способный к экспрессии дифтерийного токсина, так называемые нетоксигенные токснесущие штаммы *C. diphtheriae* биовара *mitis*, эпидемиологическое значение которых до конца не изучено. Для циркуляции *C. diphtheriae* характерна периодическая смена доминирующего биовара, которая, как правило, совпадает с началом интенсификации эпидпроцесса.

В период спорадической заболеваемости сокращена циркуляция токсигенных *C. diphtheriae*, вместе с тем циркуляция нетоксигенных остаётся на высоком уровне.

Несвоевременное выявление носителей токсигенных *C. diphtheriae* бактериологическим методом приводит к «скрытому» распространению возбудителя дифтерии и возникновению новых очагов дифтерийной инфекции.

4. Требования к взятию и транспортированию материала для бактериологической диагностики дифтерии

Эффективность проведения бактериологического исследования в значительной степени зависит от своевременного правильного взятия материала и соблюдения сроков доставки его в бактериологическую лабораторию.

Для взятия материала используют коммерческие стерильные сухие ватные (или дакроновые) тампоны, также возможно их приготовление в лабораторных условиях с учетом требований нормативно-методической документации. Тампоны должны иметь форму «капли», а не «веретена».

Материал из ротоглотки и носа берут отдельными тампонами, натощак или не ранее, чем через 2 ч после еды, а также до применения полоскания или других видов лечения. Взятие материала осуществляют при хорошем освещении, с использованием шпателя, не касаясь тампоном языка и внутренних поверхностей щек и зубов. Одним тампоном собирают материал с участков ротоглотки – миндалин, дужек мягкого неба, небного язычка, при необходимости – с задней стенки глотки. При наличии налетов патологический материал следует брать с границы пораженных и здоровых тканей, слегка нажимая на них тампоном. Для взятия материала из носа используют другой тампон, который вводят глубоко сначала в один, а потом в другой носовой ход, собирая материал со стенок и перегородки носа, при этом не касаясь крыльев носа снаружи.

При дифтерии других локализаций (глаза, уши, кожа, раны, гениталии и пр.) помимо материала из пораженных участков забирают материал из ротоглотки и носа. При показаниях к обследованию на дифтерию и одновременном наличии пораженных слизистых и кожи в углу рта («заеды») обследование этих участков проводят отдельным тампоном и параллельно берут материал из ротоглотки и носа.

При прямой ларингоскопии материал (слизь, пленка) собирают непосредственно из гортани. В случаях оперативного вмешательства для бактериологического исследования следует брать слизь из интубационной трахеотомической трубки.

При взятии материала с пораженного участка кожи необходимо протереть его поверхность промокательными движениями стерильной марлевой салфеткой или тампоном, смоченными стерильным физиоло-

гическим раствором, осторожно приподнять или отодвинуть струпы и корочки. После этого тампоном, предназначенным для взятия материала на дифтерию, взять секрет с пораженного участка. Одновременно забирают материал из ротоглотки и носа.

При постмортальном исследовании для выявления возбудителя дифтерии материал следует брать с миндалин, гортани и полости носа (слизь, пленки), при редких локализациях – со слизистой пищевода и желудка. Учитывая, что дифтерия является токсикоинфекцией, другие органы (сердце, печень и пр.) обследуют только для выявления токсических поражений.

Тампоны должны быть доставлены в лабораторию не позднее чем через 3 ч после взятия материала. В холодное время года для предотвращения замерзания исследуемый материал доставляют в бактериологическую лабораторию в сумках – термосах.

При невозможности доставки исследуемого материала в баклабораторию в установленные сроки (не позднее 3 ч) или проведения обследования в ЛПО во второй половине дня материал из ротоглотки (зева) и носа засевают «площадкой» с последующим рассевом на одну чашку Петри с питательной средой, разделенной пополам («чашечный метод»). После этого посевы помещают в термостат при 37 °С до утра следующего дня, после чего доставляют в сумках-термосах в баклабораторию (с указанием времени посева материала). При редких локализациях посев материала из каждого пораженного участка осуществляют на отдельную чашку Петри с питательной средой.

Медицинский персонал ЛПО должен проходить инструктаж в баклаборатории о правилах взятия и посева материала на питательные среды.

При невозможности организовать посев материала «чашечным методом» допускается засевать материал в пробирки с транспортной средой для сохранения и подращивания возбудителя дифтерии, которая готовится в лабораторных условиях согласно нормативно-методической документации. Не допускается использование коммерческих транспортных сред, предназначенных для исследования на микрофлору ротоглотки и носа, в связи с тем, что состав этих сред не удовлетворяет условиям культивирования возбудителя дифтерийной инфекции, что приводит к потере патологического материала.

В случае использования транспортной среды, приготовленной в лабораторных условиях, согласно нормативной документации, материал собирают сухим тампоном, опускают в пробирку со средой и следят за тем, чтобы пробка тампона не намокала. Следует учитывать, что приме-

нение транспортной среды увеличивает срок выдачи окончательного ответа на одни сутки, так как после подращивания в термостате при 37 °С на утро следующего дня материал доставляется в баклабораторию для последующего посева на чашки Петри с селективной питательной средой.

Незасеянные (чистые) чашки Петри с питательной средой и пробирки с транспортной средой доставляются в ЛПО из баклабораторий. Хранение питательных сред в ЛПО осуществляется в холодильнике при 4—6 °С; чашки со средой – не более трех дней; пробирки с транспортной средой – не более 10 дней. Перед взятием и посевом материала их необходимо достать из холодильника и согреть до комнатной температуры. При невозможности доставки материала в баклабораторию круглосуточно ЛПО оснащаются термостатами. В стационаре взятие патологического материала проводят круглосуточно, используя «чашечный метод».

Исследуемый материал из ротоглотки и носа, собранный сухими ватными тампонами и помещенный в пробирки (не менее двух пробирок от одного лица, при редких локализациях добавляются дополнительные пробирки), или материал, засеянный в пробирки с транспортной средой (также не менее двух пробирок от одного лица), или материал из ротоглотки и носа, а также из редких мест локализации, засеянный «чашечным методом», должен быть четко пронумерован и иметь сопроводительную документацию. Пробирки с материалом от одного лица скреплены вместе.

В сопроводительном документе указывают: фамилию, имя, отчество, возраст, адрес обследуемого лица, название учреждения, направляющего материал, локализацию взятия материала (нос, зев, кожа и др.), дату и время взятия материала, цель обследования (диагностическая с указанием диагноза, по эпидпоказаниям, с профилактической целью).

5. Организационно-методическая работа

1. Медицинским работникам лечебно-профилактических организаций (ЛПО), ответственным за взятие и транспортирование материала при обследовании на дифтерию, необходимо согласовывать методику взятия материала, условия транспортирования и возможности применения транспортной среды с врачами-бактериологами, проводящими эти исследования.

2. Медицинским работникам ЛПО, допущенным к взятию и посеву материала, следует проходить инструктаж не реже 1 раза в год в баклаборатории, проводящей исследования на дифтерию.

3. Врачам-бактериологам ЛПО и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора в субъектах Российской Федерации следует повышать квалификацию на курсах тематического усовершенствования по лабораторной диагностике дифтерии не реже 1 раза в три года.

4. Методическую помощь по вопросам взятия, транспортирования и лабораторной диагностики дифтерии осуществляют региональные центры по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II—IV групп патогенности (на базе ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора в субъектах Российской Федерации – далее Региональные центры по мониторингу) и Референс-центр по мониторингу за дифтерией (на базе ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора – далее Референс-центр).

5. Бактериологические лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора в субъектах Российской Федерации направляют все выделенные токсигенные и выборочно нетоксигенные штаммы *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*, а также штаммы с атипичными свойствами в Референс-центр для реидентификации (верификации) по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.

6. Бактериологические лаборатории Региональных центров по мониторингу и Референс-центр осуществляют внешний контроль качества лабораторных исследований на дифтерию, проводимых в бактериологических лабораториях субъектов Российской Федерации.

6. Бактериологическое исследование

6.1. Порядок проведения бактериологического исследования

Первый день. *Посев материала*

Материал для исследования из ротоглотки (зева), носа или других пораженных мест засевают раздельно на поверхность одной из рекомендуемых плотных питательных сред – КТА или Клауберг II, разлитых в чашки Петри («чашечный метод посева») (рис. 1).

Посев от одного лица производят на одну чашку, используя при этом половину поверхности (½) чашки среды для посева материала из ротоглотки (зева), а вторую – для посева материала из носа. При посеве материала с кожи или других пораженных мест добавляют еще одну чашку (все чашки маркируются). Не допускается посев материала от нескольких лиц на одну чашку.

При посеве материал тщательно втирают в среду со всех сторон тампона на участке площадью 2 × 1 см^2 у края чашки, стараясь оставить весь патологический материал на поверхности формируемой «площад-

ки». Формирование такой «площадки» является обязательным, что позволяет сохранить исследуемый материал, находящийся на тампоне. Дальнейший рассев исследуемого патологического материала осуществляют этим же тампоном, не отрывая тампон от поверхности питательной среды, засевая оставшуюся поверхность ½ чашки, что позволяет получить изолированные колонии (чистую культуру) для дальнейшей идентификации непосредственно с чашки первичного посева. Такой метод сохраняет весь патологический материал на поверхности питательной среды и позволяет работать с отдельными изолированными колониями, исключая этап накопления на агаровом косяке чистой культуры, что сокращает длительность проведения исследования на одни сутки.

Засеянные чашки с плотной питательной средой или пробирки с транспортной средой помещают в термостат для инкубации при 37 °С.

Высев из транспортной среды производят описанным выше способом на следующие сутки, используя дифференциально-диагностическую плотную питательную среду, тампоном, отжатым о стенки пробирки, или петлей, забирая материал из осадка.

Чашки со средой предварительно согревают при комнатной температуре или в термостате при 37 °С (15—20 мин). Если на поверхности чашки со средой есть конденсат, то ее подсушивают на крышке, повернув чашку вверх дном. Нельзя использовать для посева материала «охлажденные» чашки с питательной средой.

Второй день

1. Колонии, выросшие на чашках, просматривают через 24 ч после посева материала (если материал засевали во второй половине дня, то просмотр осуществляется ровно через 24 ч, т. е. во второй половине дня) визуально или с помощью микроскопа бинокулярного стереоскопического (МБС).

2. Чашки с колониями, «подозрительными» на дифтерийные, отбирают для дальнейшей идентификации культуры по всем тестам. «Подозрительные» колонии на кровяно-теллуритовых средах (КТА) через 24 ч роста – темно-серого или серо-черного цвета, выпуклые, округлой формы, непрозрачные, с ровными краями или с легкой изрезанностью края или радиальной исчерченностью, мягкой, маслянистой консистенции; через 48 ч окончательно формируется типичная морфология (архитектоника) колоний – серо-черного или черного цвета с металлическим оттенком («цвет мокрого асфальта»), непрозрачные, матовые, приподнятые с выпуклым центром или выпуклые, округлой формы, гладкие с ровными краями и мягкой консистенции (S-форма) или шероховатые, с радиальной исчерченностью (напоминающие форму «маргаритки»), с

приподнятым центром (R-форма). Иногда крошащиеся при прикосновении петлей.

3. Микроскопию препаратов – мазков из «подозрительных» колоний можно не проводить, так как все эти колонии подлежат обязательному изучению в пробе на токсигенность и в пробе Пизу.

4. Из «сомнительных» колоний готовят препараты – мазки. В препаратах-мазках, как «подозрительных», так и «сомнительных» колоний клетки *C. diphtheriae* из культуры, выросшей на средах первичного посева с ингибиторами роста (теллурит калия), могут быть укорочены, утолщены, однако присущее им расположение и полиморфизм сохраняются. Оценка морфологических признаков не позволяет установить видовую принадлежность микроорганизмов, но дает возможность при обнаружении коринеформных микроорганизмов предположительно отнести их к роду *Corynebacterium* и подвергнуть дальнейшей идентификации по всем тестам. В случае обнаружения других форм микроорганизмов (кокков, дрожжей, споровых палочек) дальнейшее изучение этих колоний прекращается.

5. В случае роста «подозрительных» по морфологии колоний, похожих на колонии коринебактерий, необходимо сразу через 24 ч роста приступить к изучению их токсигенных свойств. Токсигенные свойства изучают не менее чем у 2 изолированных колоний путем посева одной половины каждой колонии на среду для определения токсигенности и «необожженной» петлей – на среду Пизу, а другой половины колонии - в пробирку со скошенным сывороточным агаром для сохранения и накопления чистой культуры.

6. При невозможности снять ½ колонии в первые 24 ч роста для посева на токсигенность и на среду Пизу используется материал целой колонии. Посев на скошенный агар исключается и в дальнейшем используется культура, выросшая через 24 ч в пробирке с пробой Пизу. Учитывая, что через 24 ч роста колонии имеют небольшие размеры и материала ½ или 1 колонии может быть недостаточно для накопления дифтерийного токсина в пробе на токсигенность, а также то, что в исследуемом материале могут находиться одновременно токсигенные и нетоксигенные разновидности *C. diphtheriae*, крайне важно изучить токсигенные свойства, по возможности, у максимального числа выросших колоний (20 и более), смешивая по 5—7 однотипных колоний в одну бляшку. При невозможности постановки пробы на токсигенность классическим способом из-за недостаточного количества и малого размера колоний, выросших через 24 ч, изучают, смешивая однотипные по морфологии и размеру колонии в нескольких бляшках и, не прожигая петли,

производят посев в среду Пизу. Чашки с пробами на токсигенность и Пизу помещают в термостат.

7. Чашки с первичным посевом исследуемого материала вновь помещают в термостат на 24 ч и просматривают их повторно через 48 ч роста первичного материала (на третьи сутки).

8. Предварительный ответ о выявлении *C. diphtheriae* может быть выдан при наличии множественного роста однотипных «подозрительных» колоний на чашках первичного посева после 24 ч инкубации. Выявляют наличие фермента цистиназы (через 3 ч) и определяют наличие фермента уреазы (через 30 мин) путем внесения в пробирки большого количества колоний (до 5—6).

Третий день

1. Через 24 ч, при появлении специфических линий преципитации на среде для определения токсигенности, положительной пробе на цистиназу, изучаемую культуру идентифицируют как коринебактерии дифтерии токсигенные и выдают документированный ответ о выделении *C. diphtheriae* токсигенных. При отсутствии специфических линий преципитации на среде для определения токсигенности чашки инкубируют еще 24 ч.

2. Культуру, выросшую на скошенном сывороточном агаре или с пробы Пизу (после оценки ее чистоты), засевают на среды для определения биохимического варианта (глюкоза, сахароза, крахмал) и фермента уреазы (гидролиз мочевины).

3. Чашки с первичным посевом исследуемого материала просматривают визуально или с помощью микроскопа бинокулярного стереоскопического (МБС) повторно через 36—48 ч инкубации в термостате. При наличии «подозрительных» колоний изучают их токсигенные свойства, цистиназную активность и выделяют чистую культуру на скошенном сывороточном агаре, если эти процедуры не были выполнены через 24 ч роста первичного материала.

4. Если вырастает только одна колония через 48 ч роста на чашках первичного посева, ее засевают на среду для определения токсигенности и, не обжигая петли, в столбик среды Пизу для определения цистиназы. Для дальнейшей идентификации можно использовать культуру из пробирки с пробой Пизу или с бляшки через 48 ч роста в пробе на токсигенность, или через 24 ч роста в случае выявления токсигенных свойств идентифицируемой культуры.

5. При отсутствии колоний, подозрительных на коринебактерии дифтерии, выдают окончательный ответ, что коринебактерии дифтерии не выявлены.

6. При отсутствии роста микроорганизмов на «площадках» в чашках первичного посева через 48 ч инкубации в ряде случаев требуется повторное взятие и исследование материала. Отсутствие роста чаще всего свидетельствует о нарушении правил проведения бактериологического исследования (взятия, транспортирования, посева и культивирования исследуемого материала и качества питательных сред для первичного посева).

Четвертый день (или пятый)

1. При появлении специфических линий преципитации на среде для определения токсигенности (через 24 ч инкубации пробы на токсигенность 48-часового роста первичного посева), положительной пробе на цистиназу выдают документированный ответ о выделении токсигенных коринебактерий дифтерии.

2. Культуру, выросшую на скошенном сывороточном агаре или с пробы Пизу, после определения ее чистоты, засевают на среды для изучения биохимических свойств (среды Гисса с сахарозой, глюкозой, крахмалом, проба Заксе или бульон с мочевиной), если эта процедура не была сделана ранее.

3. Повторно (через 48 ч) учитывают результаты пробы на токсигенность, поставленной во 2 день исследования. Одновременно производят учет сахаролитических свойств и уреазной активности в пробах, поставленных в 3 день исследования.

При отсутствии специфических линий преципитации через 48 ч после постановки пробы на токсигенность, но при положительных результатах проб на цистиназу, глюкозу, отрицательных результатах проб на уреазу и сахарозу, только на 4—5 сутки культуру идентифицируют как *C. diphtheriae* нетоксигенные, с указанием биохимического варианта.

4. При выделении токсигенных *C. diphtheriae* на 3—4 сутки от начала исследования дополнительно ответ о биохимических свойствах может быть выдан на 4—5 сутки (через 72 или 96 ч с момента первичного посева исследуемого материала).

6.2. Бактериологическое заключение

1. Наличие специфических линий преципитации при определении токсигенных свойств, положительная проба на цистиназу, отрицательная проба на уреазу, характерные морфологические, культуральные и биохимические свойства (отсутствие ферментации сахарозы, ферментация глюкозы и крахмала или неферментация крахмала) позволяют заключить, что выделенная культура является *C. diphtheriae*, токсигенная, биохимического варианта гравис или митис.

2. Отсутствие специфических линий преципитации при определении токсигенных свойств, положительная проба на цистиназу, отрицательная проба на уреазу, характерные морфологические, культуральные и биохимические свойства (отсутствие ферментации сахарозы, ферментация глюкозы и крахмала или неферментация крахмала) позволяют заключить, что выделенная культура является *C. diphtheriae*, нетоксигенная, биохимического варианта гравис или митис.

3. При выделении *C. pseudodiphtheriticum* (ложнодифтерийной палочки Гофмана) или других дифтероидов, бактериологический ответ считают отрицательным.

4. При наличии линий преципитации (чаще «размытых» в виде «облачка»), идентичных специфическим линиям контрольного штамма коринебактерий дифтерии, положительных проб на уреазу, цистиназу, ферментации глюкозы и крахмала, отсутствии ферментации сахарозы, отсутствии редукции нитратов в нитриты, культуру относят к виду *C. ulcerans*, токсигенный вариант.

При отсутствии линий преципитации при определении токсигенных свойств и наличии всех других признаков, характерных для *C. ulcerans*, нетоксигенный вариант, бактериологический ответ считают отрицательным.

5. *C. pseudotuberculosis* идентифицируется по положительной реакции в пробе на уреазу. Тест восстановления нитратов в нитриты у этих микроорганизмов является вариабельным признаком, поэтому дифференциацию от *C. ulcerans* проводят по крахмалу (*C. pseudotuberculosis* не способны разлагать крахмал – отрицательный результат). Необязательный тест для практических бактериологов – для дифференциальной диагностики *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis* вводят дополнительную пробу ферментации трегалозы и гидролиз желатина. Возможно выделение токсигенных *C. pseudotuberculosis*.

6. При выделении *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis* необходимо подтверждение подобной идентификации в Референс-центре ФБУН МНИИЭМ им. Г. Н. Габричевского Роспотребнадзора, чтобы исключить ошибки при возможном выделении *C. diphtheriae*.

7. Предварительный ответ при обследовании с диагностической целью и по эпидпоказаниям может быть выдан при наличии множественного роста однотипных «подозрительных» колоний на чашках первичного посева после 24 или 48 ч инкубации (на 2—3 сутки). Выявляют наличие фермента цистиназы и отсутствие фермента уреазы путем внесения в пробирки большого количества колоний. Предварительный от-

вет может быть изменен после окончания бактериологического исследования.

При нативной микроскопии (по просьбе инфекционистов) требуется дополнительный материал на тампонах из ротоглотки и носа. Однако чаще всего микроорганизмы в виде «палочек» не обнаруживают, что делает этот способ практически не пригодным.

6.3. Схема бактериологического исследования

1 день

Посев исследуемого материала на селективную дифференциально - диагностическую или, при необходимости, в транспортную среду. Инкубирование в термостате при 37 °С.

2 день (24 часа)

1. Изучение выросших колоний, при возможности – постановка пробы на токсигенность, цистиназу и посев культуры на скошенный сывороточный агар.

2. При использовании транспортной среды необходимо произвести пересев на селективную дифференциально-диагностическую среду.

3. При множественном росте, в случае необходимости, можно провести исследования для выдачи предварительного ответа – дополнительные пробы Пизу и Заксе.

3 день (48 часов)

1. Учет результатов проб на токсигенность и на цистиназу, поставленных во второй день исследования. В случае наличия специфических линий преципитации и при положительной пробе Пизу выдают документированный ответ о выделении токсигенных коринебактерий дифтерии.

2. Посев чистой культуры, выделенной во второй день исследования, на среды Гисса для изучения биохимических свойств (сахароза, глюкоза, крахмал, мочевина).

3. Повторный просмотр (через 48 ч) чашек первичного посева визуально или с помощью МБС. Постановка проб на токсигенность, цистиназу и отсев колоний на скошенный сывороточный агар.

4. В случае использования транспортной среды, ход исследования см. начиная с п. 1 второго дня и далее по схеме.

5. Выдача бактериологического ответа об отсутствии коринебактерий дифтерии.

6. При обнаружении у исследуемой культуры фермента цистиназы, отсутствии фермента уреазы, можно выдать предварительный ответ о выделении дифтерийного микроба.

4 день (72 часа)

1. Учет токсигенных свойств культуры, выделенной в 3 день исследования (через 48 ч роста первичного посева), при обнаружении специфических линий преципитации выдают документированный ответ о выделении токсигенных коринебактерий дифтерии. Определяют биохимические свойства (сахароза, глюкоза, крахмал, мочевина).

2. Учет биохимических свойств культуры (токсигенной или нетоксигенной), выделенной во второй день исследования (через 24 ч инкубации первичного посева).

3. Выдача бактериологического ответа о выделении нетоксигенных коринебактерий дифтерии с указанием биохимического варианта и дополнительного ответа о биохимических свойствах токсигенных коринебактерий дифтерии, выделенных ранее.

5 день (96 часов)

1. Выдача бактериологического ответа о выделении токсигенных или нетоксигенных коринебактерий дифтерии с указанием биохимического варианта (в случае 48 ч инкубации первичного посева и 48 ч проявления или не проявления специфических линий преципитации в пробе на токсигенность).

7. Методики идентификации возбудителя дифтерийной инфекции

7.1. Определение токсигенных свойств коринебактерий дифтерии с помощью реакции преципитации в геле

В основе метода определения токсигенности коринебактерий дифтерии (модифицированный тест Элека с бумажными полосками и тест Фельдмана с соавт. с бумажными дисками) лежит процесс встречной иммунодиффузии токсина и антитоксических антител в плотной питательной среде. В местах оптимального количественного соотношения между токсином, продуцируемым коринебактериями, и антитоксином, нанесенным на фильтровальную бумагу, происходит их взаимодействие с образованием преципитата в виде белой линии.

Токсигенность коринебактерий дифтерии определяют, как правило, в чистой культуре (отдельные колонии со среды первичного посева или культура со скошенного агара, или с пробы Пизу). Смесь колоний или культуры, загрязненные посторонней микрофлорой, также могут быть испытаны на токсигенность. При отсутствии, в этом случае, преципитатов в агаровом геле, опыт следует повторить с выделенными на скошенной сывороточно-агаровой среде или после рассева на КТА чистыми культурами.

Для постановки пробы на токсигенность необходимо иметь: стерильные чашки Петри с ровным дном (стеклянные или одноразовые пластиковые), питательную среду – сухую коммерческую питательную среду для определения токсигенности или агар Мартена, нормальную сыворотку крови крупного рогатого скота (СКРС), стерильные полоски из фильтровальной бумаги размером 0,7 см × 8,0 см, или бумажные диски диаметром 0,6 см, очищенный ферментолизом и специфической сорбцией дифтерийный антитоксин (в дальнейшем именуется антитоксин), при отсутствии которого в исключительных случаях можно использовать противодифтерийную антитоксическую сыворотку лошадиную, лечебную (в дальнейшем именуется антитоксическая сыворотка). Лучше использовать коммерческие или приготовленные в лаборатории бумажные диски, пропитанные антитоксином. Обязательным является использование контрольного токсигенного штамма коринебактерий дифтерии биовара *gravis* 24—48-часового роста.

7.1.1. Методика определения токсигенных свойств коринебактерий дифтерии с использованием бумажных дисков с антитоксином (по Фельдману с соавт.)

Приготовление чашек для постановки пробы на токсигенность

Питательный агар для определения токсигенности целесообразно разливать в пробирки по 10 мл (количество, необходимое для приготовления одной чашки). При большом объеме работы питательный агар разливают во флаконы по 70—80 мл (на 7—8 чашек пробы на токсигенность). Питательный агар следует расплавлять только 1 раз; многократное плавление ухудшает свойства среды. Питательный агар расплавляют в водяной бане при 90 °С, тотчас же вынимают из бани, охлаждают до 50 °С и добавляют 20 % сыворотки крупного рогатого скота. Так, к 10 мл питательного агара добавляют 2 мл сыворотки крупного рогатого скота (СКРС), перемешивают и выливают, соблюдая правила асептики, в стерильную чашку Петри, распределяют среду по дну осторожным вращением чашки, не допуская «вспенивания» – появления неровностей на поверхности среды.

Чашку подсушивают в термостате при 37 °С в течение 15—20 мин, при открытой крышке, повернув ее вверх дном, до нанесения бумажных дисков с антитоксином на поверхность среды. Чашки с питательной средой недопустимо пересушивать.

В редких случаях, когда на чашках первичного посева вырастают единичные колонии (не более 8), токсигенные свойства которых надлежит изучить, возможно использование полистироловых чашек Петри

диаметром 4,5 см. Количество питательного агара и СКРС уменьшается (3,2 мл питательного агара 1,8 % + 0,8 мл СКРС).

Чашки со средой для определения токсигенности хранить не рекомендуется.

Приготовление бумажных дисков с дифтерийным антитоксином

Диски из плотной фильтровальной бумаги нарезают диаметром 6 мм, стерилизуют автоклавированием при 2 атм. в течение 20—30 мин, высушивают и пропитывают антитоксином, разведенным в 1 мл дистиллированной воды (500 МЕ в 1 мл). Достаточно 1 мл антитоксина для приготовления 80—100 дисков, 1 диск содержит (5 ± 1) МЕ дифтерийного антитоксина. Далее диски подсушивают в термостате (соблюдая асептические условия) в течение 18—24 ч. Готовые диски помещают в стерильный флакон или пробирку с силикагелем или другим гигроскопическим веществом и сохраняют в холодильнике при 4—6 °С.

Постановка пробы на токсигенность

На поверхность чашки Петри со средой для определения токсигенности дифтерийных микробов помещают четыре бумажных диска с дифтерийным антитоксином. Вокруг каждого диска с антитоксином формируют 5 «бляшек»: две «бляшки» – контрольного штамма и три – испытуемые (из одного анализа с подозрительными колониями формируют минимум две «бляшки» из изолированных колоний и одну – из смеси 3—6 однотипных колоний; материалом из этого же анализа можно занять места вокруг других дисков с антитоксином). Все пять «бляшек» располагают симметрично вокруг диска на расстоянии 0,7 см от его края. Диаметр каждой «бляшки» 0,6—0,7 см. На одной чашке Петри можно разместить до четырех дисков с антитоксином и, соответственно, до 20 «бляшек» с культурами (8 «бляшек» контрольных и 12 «бляшек» испытуемых). Бумажные диски расставляют на поверхности сывороточно-агаровой среды на максимально удаленном расстоянии между дисками, чтобы не произошло перекрестных реакций (рис. 3).

Чашки с посевами помещают в термостат при 37 °С.

Учет результатов

Результат реакции учитывают через 18—24 часа, а также – через 48 ч. Наличие линий преципитации между диском с антитоксином и испытуемой культурой свидетельствует о ее токсигенности. Исследуемая культура считается токсигенной, если линия преципитации данной культуры сливается под углом с линией преципитации контрольного штамма. Отсутствие линий преципитации у испытуемых культур через

48 ч, при наличии их у контрольных штаммов, указывает на отсутствие токсигенности у изучаемых культур. Линии преципитации у контрольных штаммов должны появляться через 18—24 ч. Более позднее появление линий преципитации требует проверки качества питательной среды, проверки чистоты контрольного штамма, или улучшения его фенотипических свойств при выращивании на кровяном агаре, или замены контрольного штамма.

7.1.2. Методика определения токсигенных свойств коринебактерий дифтерии с использованием бумажных полосок (по модифицированному тесту Элека)

Чашки для постановки пробы на токсигенность этим методом готовят так же, как при работе с бумажными дисками (чашки диаметром 4,5 см не используют). В центр чашки на поверхность застывающего агара обожженным пинцетом помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанную антитоксином (или в редких случаях при отсутствии антитоксина используют антитоксическую лечебную лошадиную сыворотку). Чашку с бумажной полоской с антитоксином подсушивают в термостате при 37 °С в течение 15—20 мин при открытой крышке, повернув ее вверх дном. Приготовленные таким способом чашки не подлежат хранению.

Приготовление бумажных полосок с антитоксином

Полоски фильтровальной бумаги нарезают размером (0,7 × 8,0) см, заворачивают по 2—4 штуки в пакетик и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм. в течение 30 мин. Пакетики с бумажными полосками хранят в стерильной чашке Петри до 3 недель. Важным является сохранение ровных краев полоски и отсутствие грифельной черты при рисовании их на фильтровальной бумаге.

Перед постановкой пробы на токсигенность содержимое ампулы с антитоксином растворяют в 1 мл стерильного физиологического раствора, переносят в стерильную пробирку и указывают на ней данные этикетки (растворенный антитоксин хранят при температуре 4—6 °С не более 10 дней). Фильтровальные бумажки обожженным пинцетом помещают в стерильную чашку Петри, где на каждую полоску наносят 0,125 мл антитоксина, содержащего 500 МЕ в 1 мл.

Постановка пробы на токсигенность с бумажными полосками с антитоксином

Культуру засевают в виде «бляшек» диаметром 0,6—0,7 см на расстоянии 0,7—0,8 см друг от друга и 0,5 см от края полоски фильтровальной бумаги. На одну чашку следует засевать не более 10 «бляшек»

(по 5 «бляшек» с каждой стороны полоски). Из них 6 «бляшек» испытуемой культуры, 4 – контрольного штамма. При небольшом количестве испытуемого материала засевают 6 контрольных «бляшек» и 4 – испытуемых. Материал от одного анализа засевают параллельными «бляшками» по обе стороны полоски с антитоксином (рис. 4А).

Чашки с посевом помещают в термостат при 37 °С.

Учет результатов

Результат учитывают через 18—24 ч и 48 ч от начала постановки пробы на токсигенность. Критерием оценки специфичности преципитатов является слияние линий преципитации испытуемого штамма со специфическими линиями контрольного токсигенного штамма, чаще всего это может произойти через 48 ч, через 24 ч намечается только тенденция к слиянию. В тех случаях, когда у контрольного штамма формируется несколько линий преципитации (рис. 4Б), что практически не наблюдается при использовании антитоксина, специфическими следует считать более четкие и рано появляющиеся преципитаты. Если через 18—24 ч от момента постановки пробы на токсигенность у контрольного штамма линии преципитации не обнаруживаются, это свидетельствует о нарушении условий постановки реакции. Необходимо проверить качество питательной среды или улучшить фенотипические свойства контрольного штамма, пассируя его на кровяной агаровой среде, или заменить контрольный штамм.

Оценка результатов реакции пробы на токсигенность при использовании бумажных дисков или полосок с антитоксином

Испытуемые культуры коринебактерий дифтерии являются токсигенными, если образовавшиеся линии преципитации сливаются или имеют тенденцию к слиянию с соответствующими специфическими линиями контрольного токсигенного штамма. Результаты достоверны через 24 или 48 ч от начала постановки пробы на токсигенность.

Испытуемые культуры коринебактерий дифтерии являются нетоксигенными, если не образуются линии преципитации с антитоксином при наличии специфических линий преципитации у контрольного штамма. Результаты можно считать достоверными только через 48 ч от начала постановки пробы на токсигенность.

Очищенный ферментолизом и специфической сорбцией антитоксин не содержит антител к компонентам микробной клетки. При использовании этого препарата неспецифические линии преципитации не образуются (при условии его высокого качества).

7.1.3. Определение токсигенных свойств C. diphtheriae в реакции преципитации в геле (модифицированном тесте Элека) с использованием бумажных полосок с противодифтерийной антитоксической лечебной лошадиной сывороткой

В редких случаях при отсутствии или некачественной работе антитоксина применяют противодифтерийную антитоксическую лечебную лошадиную сыворотку.

Приготовление чашек

Питательный агар для определения токсигенности целесообразно разливать в пробирки по 10 мл (количество, необходимое для приготовления одной чашки). При большом объеме работы питательный агар разливают во флаконы по 70—80 мл (на 7—8 чашек пробы на токсигенность). Питательный агар следует расплавлять только 1 раз, многократное плавление ухудшает свойства среды. Питательный агар расплавляют в водяной бане при 90 °С, тотчас же вынимают из бани, охлаждают до 50 °С и добавляют 20 % сыворотки крупного рогатого скота. Так, к 10 мл питательного агара добавляют 2 мл сыворотки крупного рогатого скота (СКРС), перемешивают и выливают, соблюдая правила асептики, в стерильную чашку Петри, распределяют среду по дну осторожным вращением чашки, не допуская «вспенивания» – появления неровностей на поверхности среды.

В центр чашки на поверхность застывающего агара обожженным пинцетом помещают полоску фильтровальной бумаги, пропитанную антитоксической лечебной лошадиной сывороткой. Чашку с бумажной полоской подсушивают в термостате при 37 °С в течение 15—20 мин, при открытой крышке, повернув ее вверх дном. Приготовленные таким способом чашки не подлежат хранению.

Приготовление бумажных полосок

Полоски фильтровальной бумаги нарезают размером (1,5 × 8,0) см, заворачивают по 2—4 штуки в пакетик и стерилизуют в автоклаве при 0,5 атм. в течение 30 мин. Пакетики с бумажными полосками хранят в стерильной чашке Петри до 3 недель.

Разведение антитоксической сыворотки

Соблюдая правила асептики, антитоксическую сыворотку переносят из ампулы в стерильную пробирку. На пробирке указывают данные этикетки и срок хранения. Хранят сыворотку при температуре 4—6 °С.

Сыворотка должна быть разведена стерильным физиологическим раствором до содержания 500 МЕ в 1 мл. Коммерческий препарат может иметь разную активность (5 000 МЕ, 10 000 МЕ, 20 000 МЕ) и различный объем.

Например, в ампуле содержится 10 000 МЕ (в объеме 4,8 мл, как указано на этикетке коробки с ампулами) антитоксической сыворотки. Для упрощения расчетов общий объем сыворотки можно принять за 5 мл. Следовательно, в 1 мл сыворотки содержится 2 000 МЕ (10 000 МЕ : 5 = 2 000 МЕ). Чтобы получить 500 МЕ в 1 мл, следует 1 мл сыворотки развести в 4 раза, т. е. к 1 мл сыворотки добавить 3 мл стерильного физиологического раствора. При необходимости можно развести сыворотку в меньших объемах: к 0,1 мл сыворотки добавить 0,3 мл физиологического раствора или к 0,2 мл сыворотки добавить 0,6 мл физиологического раствора, или к 0,3 мл сыворотки добавить 0,9 мл физиологического раствора и т. д.

Разведение сыворотки можно выполнить другим способом. Если, например, в ампуле содержится 5 000 МЕ сыворотки в объеме 2,5 мл, то 500 МЕ содержится в 0,25 мл сыворотки. К этому объему добавляют 0,75 мл стерильного физиологического раствора и получают разведение сыворотки 500 МЕ в 1 мл.

Разведенную сыворотку можно хранить до 7 дней при температуре 4—6 °С.

Постановка пробы на токсигенность

Культуру засевают в виде «бляшек» диаметром 0,6—0,7 см на расстоянии 0,7—0,8 см друг от друга и 0,5 см от края полоски фильтровальной бумаги. На одну чашку следует засевать не более 10 «бляшек». Из них 6 «бляшек» испытуемой культуры, 4 – контрольного штамма. При небольшом количестве испытуемого материала засевают 6 контрольных «бляшек» и 4 – испытуемых (рис. 4Б). Чашки с посевом помещают в термостат при 37 °С.

Учет результатов

Результат учитывают через 18—24 ч и 48 ч роста. Следует иметь в виду, что препарат антитоксической противодифтерийной сыворотки, помимо антител к дифтерийному антитоксину, содержит антитела к антигенам микробной клетки. Поэтому при постановке пробы на токсигенность с использованием данного препарата преципитаты могут образовываться не только в результате связывания токсина с антитоксином (специфические преципитаты), но и при взаимодействии антибактериальных антител с компонентами клетки коринебактерий дифтерии (неспецифические преципитаты). Последние могут формироваться как у токсигенных, в том числе и у контрольного штамма, так и у нетоксигенных коринебактерий дифтерии (рис. 4Б). Иногда отмечается появление множественных линий преципитации. Неспецифические преципитаты, как правило, слабо выражены, имеют нечеткие контуры, появляются

чаще через 48—72 ч, в редких случаях могут появляться и на первые сутки. Критерием оценки специфичности преципитатов является слияние линий преципитации испытуемого штамма со специфическими линиями контрольного токсигенного штамма. В тех случаях, когда у контрольного штамма формируется несколько линий преципитации, специфическими следует считать более четкие и рано появляющиеся преципитаты. Поэтому просмотр чашек с пробой на токсигенность осуществляют через 18—24 ч от момента ее постановки. Если в течение данного времени у контрольного штамма линии преципитации не обнаруживаются, это свидетельствует о нарушении условий постановки реакции. Необходимо проверить качество питательной среды, или улучшить фенотипические свойства контрольного штамма, пассируя его на кровяной агаровой среде, или заменить контрольный штамм.

Варианты оценки результатов реакции:

1. Испытуемые культуры коринебактерий дифтерии являются токсигенными, если образуемые ими линии преципитации сливаются или имеют тенденцию к слиянию с соответствующими специфическими линиями контрольного токсигенного штамма.

2. Испытуемые культуры коринебактерий дифтерии являются нетоксигенными, если линии преципитации:

а) образуемые испытуемой культурой, отсутствуют, при наличии специфических линий преципитации у контрольного штамма;

б) не могут слиться со специфическими линиями преципитации контрольного штамма, а скрещиваются или имеют тенденцию к скрещиванию с ними (неидентичные, неспецифические линии);

в) испытуемой культуры сливаются с неспецифическими линиями контрольного штамма;

г) испытуемой культуры перекрещиваются со специфическими линиями и сливаются с неспецифическими линиями контрольного штамма.

7.2. Методики определения биохимических признаков

7.2.1. Определение цистиназной активности (проба Пизу)

В отличие от *C. pseudodiphtheriticum* (ложнодифтерийной палочки Гофмана), *C. pseudotuberculosis* и многих других коринеформных бактерий, *C. diphtheriae* и *C. ulcerans* обладают ферментом цистиназой.

Испытуемую культуру засевают петлей «уколом» в питательную среду для определения цистиназы, разлитую в узкие пробирки столбиком высотой 3—4 см. Посев производят строго в центре агарового стол-

бика до дна пробирки. Для получения оптимального результата целесообразно использовать длинную бактериологическую петлю.

В составе питательной среды имеется цистин и уксусно-кислый свинец. В процессе роста культура продуцирует цистиназу, расщепляющую цистин; а образующийся при этом сероводород вступает в реакцию с уксусно-кислым свинцом, который превращается в серно-кислый свинец – соединение темно-коричневого цвета. Коринебактерии дифтерии и коринебактерии ульцеранс вызывают не только почернение среды по ходу укола, но и образуют вокруг него облачко темно-коричневого цвета на расстоянии примерно 1 см от поверхности среды. Результат реакции учитывают через 24 ч. При наличии множественного роста, для получения ускоренного (предварительного) ответа через 3 ч, среду инокулируют большим количеством культуры.

Одновременно с испытуемыми культурами в качестве положительного контроля производится посев контрольного токсигенного штамма коринебактерий дифтерии биовара *gravis* в отдельную пробирку.

7.2.2. Определение уреазной активности

C. pseudodiphtheriticum (ложнодифтерийная палочка Гофмана), *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* и некоторые другие микроорганизмы рода *Corynebacterium* обладают способностью продуцировать в процессе роста фермент уреазу и расщеплять мочевину. *C. diphtheriae* такой способностью не обладают.

Пробу на уреазу можно ставить в 2 вариантах – по методу Заксе (а) и путем посева на бульон с мочевиной (б).

а) Для определения уреазы по методу Заксе ex tempore смешивают 1 часть реактива А и 19 частей реактива В. Смесь разливают в узкие пробирки по 0,1 мл и вносят одну петлю испытуемой чистой культуры со скошенного агара или из пробирки со средой Пизу. Для выдачи ускоренного (предварительного) ответа, при наличии множественного роста однотипных колоний на чашке первичного посева, допускается внесение нескольких колоний в одну пробирку с пробой на уреазу. Результат учитывают после инкубации в термостате при 37 °С в течение 30 мин.

б) Чистую культуру коринебактерий дифтерии засевают в бульон с мочевиной, разлитый в пробирки по 2—3 мл, и помещают в термостат, результат учитывают через 24 ч инкубации при 37 °С.

Фермент уреаза расщепляет мочевину с образованием аммиака и углекислоты. При этом повышается pH среды и происходит изменение цвета индикатора (покраснение). При отсутствии у исследуемой культуры этого фермента окрашивания среды не происходит. В качестве поло-

жительного контроля в отдельную пробирку засевают контрольный штамм – *C. pseudodiphtheriticum* или *C. ulcerans*.

7.2.3. Определение сахаролитической активности

Для идентификации *C. diphtheriae* используют также оценку сахаролитической активности выделенных культур на средах Гисса с углеводами – глюкозой, сахарозой, растворимым крахмалом.

Каждую пробирку со средой Гисса инокулируют 1 петлей чистой культуры. Результат учитывают через 24 ч, а при отрицательном крахмальном признаке – через 48 ч культивирования посевов в термостате при 37 °С.

При сбраживании того или иного углевода образуется кислота, происходит восстановление обесцвеченного фуксина и среда приобретает малиновую окраску.

В качестве положительного контроля в отдельную пробирку производится посев контрольного токсигенного штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis* и *C. pseudodiphtheriticum*.

7.2.4. Определение нитратредуктазной активности

Способность *C. diphtheriae* восстанавливать соли азотной кислоты (нитраты) в соли азотистой кислоты (нитриты) является дополнительным признаком, позволяющим отличать их от *C. ulcerans* и *C. pseudotuberculosis*, которые не обладают нитратредуктазой.

Производят посев исследуемой культуры в пробирку с нитратным бульоном, инкубируют в течение 24 ч при температуре 37 °С. Затем добавляют 2—3 капли реактива на нитриты (Грисса или Касаткина). В случае, если произошло образование нитритов, среда окрашивается в красный цвет. Если микроорганизм не обладает нитратредуктазой, изменения окраски среды не происходит.

В качестве положительного контроля в отдельную пробирку производится посев контрольного штамма *C. diphtheriae* биовара *gravis*; в качестве отрицательного контроля инкубируют пробирку со стерильной средой без культуры. Дополнительными тестами могут служить постановка пробы с *C. ulcerans* (если имеется в лаборатории) и *C. pseudodiphtheriticum*.

8. Питательные среды

Качество питательных сред имеет важнейшее значение при любом бактериологическом исследовании. Чтобы добиться максимальной высеваемости коринебактерий дифтерии из исследуемого материала и роста колоний, видимых невооруженным глазом через 24 ч, необходимо

создать оптимальные условия для роста, размножения этих бактерий, сохранения их биологических и культурально-морфологических свойств, а также для ингибирования роста сопутствующей микрофлоры. Это достигается путем использования универсальных питательных основ с добавлением крови и теллурита калия. Теллурит калия в определенной концентрации не препятствует росту представителей рода коринебактерий и практически полностью ингибирует рост посторонней микрофлоры. Кровяные теллуритовые среды являются также дифференциально-диагностическими, поскольку колонии коринебактерий на этих средах имеют серую или черную окраску (данные микроорганизмы способны восстанавливать теллурит калия до металлического теллура, вещества черного цвета, и накапливать его внутри клеток).

Лучшими питательными средами для первичного посева материала являются кровяные теллуритовые среды – КТА, Клауберг II. В качестве основы для этих сред используют сухой питательный агар (СПА), питательный агар на основе панкреатического гидролизата рыбной муки (ГРМ), можно использовать среду АГВ, применяемую в бактериологической практике для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, однако колонии на АГВ всегда меньше по размеру, чем на других средах. Из всех перечисленных агаровых основ наиболее сбалансированным по составу является СПА.

Питательные агары готовят по прописи на этикетке и ex tempore добавляют кровь или глицериновую смесь, теллурит калия.

На питательных средах без крови значительно снижается высеваемость (в 2—3 раза), замедляется рост колоний (через 24 ч на чашках первичного посева колонии либо мелкие, либо отсутствуют, рост которых наблюдается только через 48 ч), изменяется морфология колоний, ингибирующая способность значительно ниже при замене теллурита калия на другие ингибиторы (например, хинозол). Поэтому следует не применять сывороточную среду Тинсдаля ни для первичного посева материала, ни для изучения цистиназной активности, ограничить использование среды Бучина, т. к. используется только 5 мл крови и ингибитор – хинозол. Для выделения коринебактерий дифтерии выпускается также коммерческая питательная среда Коринебакагар, в которую, согласно прописи по приготовлению, не нужно добавлять кровь. Однако данная среда уступает кровяным средам по ингибирующей активности и ростовым свойствам (образуются колонии меньшего размера на первые сутки или же они могут появляться только на вторые сутки роста).

Для определения токсигенных свойств коринебактерий дифтерии выпускается коммерческая сухая среда ОТДМ и Коринетоксагар. Ком-

мерческие среды готовят по прописи на этикетке, добавляя ex tempore нужные ингредиенты.

В лабораторных условиях готовят Мартеновский пептон для приготовления Мартеновского агара, как лучшей основы для среды на токсигенность и определения цистиназы.

Для отсева колоний и культивирования коринебактерий дифтерии готовят сывороточную агаровую среду. Применение свернутой сыворотки является нецелесообразным.

В лабораторных условиях готовят транспортную среду для сохранения и накопления коринебактерий дифтерии, которую используют при транспортировании исследуемого материала. Коммерческого выпуска этой среды нет.

Каждая новая серия питательной среды (как коммерческой, так и приготовленной в лабораторных условиях) подлежит бактериологическому контролю. В тех случаях, когда ростовые свойства питательной среды не удовлетворяют предъявляемым требованиям, питательные агаровые основы готовят на бульонах - сухой питательный бульон (СПБ), ГРМ-бульон и бульонах, приготовленных в лабораторных условиях (перевар Хоттингера, 1 % пептонная вода, с содержанием аминного азота 150—180 мг/%).

Питательные среды для первичного посева разливают по чашкам Петри слоем 3—4 мм. Они могут быть использованы в течение 3 суток при условии хранения при температуре 4—6 °С.

8.1 Методы приготовления питательных сред и реактивов

8.1.1. Транспортная среда (среда накопления)

В качестве основы для приготовления транспортной среды используют 0,1 % питательный агар на переваре Хоттингера или 0,1 % агар на коммерческом сухом питательном бульоне (ГРМ-бульон), pH 7,6. Лучшей основой является Мартеновский бульон.

Среду разливают в пробирки по 4 мл, стерилизуют в автоклаве при 1 атм. в течение 20 мин. Срок хранения – до 1 месяца при 4—6 °С. Перед употреблением в каждую пробирку, с соблюдением правил асептики, добавляют 0,5—1,0 мл сыворотки крупного рогатого скота и по 0,05 мл (1 капля) 2 % раствора теллурита калия. Среду выборочно контролируют на стерильность, выдерживая при 37 °С в течение 48 ч. Срок хранения готовой среды – 10 дней при 4—6 °С.

8.1.2. Среды для первичного посева исследуемого материала

Среда Клауберга II

К 100 мл стерильной питательной агаровой основы (pH 7,6), расплавленной и охлажденной до 50 °С, добавляют 10 мл глицериновой смеси, 50 мл «лаковой» крови и 3 мл 2 % раствора теллурита калия. Принимая во внимание, что питательная среда разводится глицериновой смесью и «лаковой» кровью в 1,6 раза, при приготовлении данной среды следует увеличить навеску сухого питательного агара в 1,6 раза.

Пример расчета. На этикетке флакона с сухим коммерческим питательным агаром указана навеска, необходимая для приготовления 1 л среды, например, 30 г. Для приготовления 1 л питательной основы для среды Клауберга II следует взять навеску 48 г (т. е. 30 г × 1,6 = 48 г).

Для приготовления глицериновой смеси к 40 мл дефибринированной крови или кровяной смеси добавляют 20 мл химически чистого стерильного глицерина (глицерин стерилизуют при температуре 110 °С в течение 30 мин).

Для приготовления «лаковой» крови к 34 мл стерильной дистиллированной воды добавляют 16 мл дефибринированной крови.

Кровяной теллуритовый агар (КТА)

К 100 мл стерильной питательной агаровой основы (pH 7,6), расплавленной и охлажденной до 50 °С, добавляют 7 мл дефибринированной или 10 мл гемолизированной крови и 2 мл 2 % раствора теллурита калия. Вместо крови можно использовать кровяную теллуритовую смесь (11 мл на 100 мл среды), при этом на 100 мл КТА добавляют ex tempore 1 мл 2 % раствора теллурита калия, т. к. 1 мл 2 % раствора уже содержится в 11 мл кровяной теллуритовой смеси. Принимая во внимание, что питательная среда разводится кровью примерно в 1,1 раза, при приготовлении данной среды следует увеличить навеску сухого питательного агара в 1,1 раза.

Пример расчета. На этикетке флакона с сухим коммерческим питательным агаром указана навеска, необходимая для приготовления одного литра среды, например, 30 г. Для приготовления 1 л питательной основы для КТА следует взять навеску 33 г (т. е. 30 г × 1,1 = 33 г).

8.1.3. Методика приготовления кровяных, кровяно-теллуритовых смесей и сывороточного агара

Для питательных сред используют коммерческую дефибринированную кровь крупного рогатого скота и баранью дефибринированную кровь.

Можно использовать кровь животных – крупного рогатого скота, лошадей, свиней, овец, кроликов, которую собирают на мясокомбинатах или бойнях в стерильные сосуды с бусами с помощью специально смонтированной системы, соблюдая правила асептики. В отдельных случаях

кровь собирают, не монтируя специальных систем, сливая первые порции крови вне бутыли.

Можно использовать кровь человека с истекшим сроком годности (цитратную и с консервантами), приготовив из нее специальные кровяные смеси. Для этого необходимо удалить жидкую часть отстоявшейся крови, содержащую цитрат натрия и консерванты. К оставшейся в сосуде эритроцитарной массе добавить стерильный физиологический раствор, который также можно удалить после оседания эритроцитов, и добавить дистиллированной воды до первоначального объема.

Хорошим сырьем для получения кровяной смеси служит эритроцитарная масса, которая может оставаться при производстве гаммаглобулина и других препаратов крови. К эритроцитарной массе добавляют стерильную дистиллированную воду из расчета ⅓ объема эритроцитарной массы.

Можно также использовать кровяные сгустки плацентарной или абортной крови. Сгустки собирают в стерильные бутыли со стеклянными бусами или битым стеклом, затем их замораживают и оттаивают, после чего сгустки легко разбиваются бусами. Эту процедуру можно повторить 2—3 раза. Затем добавляют стерильную дистиллированную воду из расчета ¼ объема сгустков.

В кровяные смеси, приготовленные вышеуказанным способом, добавляют теллурит калия в качестве консерванта. К каждым 10 мл кровяной смеси добавляют 1 мл 2 % раствора теллурита калия. Такую кровяно-теллуритовую смесь можно сохранять при 4—6 °С до 2 месяцев.

Пример расчета. Если из отстоявшейся цитратной крови объемом 250 мл было удалено 50—60 мл жидкой части, то необходимо добавить такое же количество – 50—60 мл стерильного физиологического раствора, перемешать, вновь дать отстояться, после чего удалить 50—60 мл жидкой части и внести 50—60 мл стерильной дистиллированной воды. Таким образом будет получено 250 мл кровяной смеси. Для ее консервирования необходимо добавить 25 мл 2 % теллурита калия (на каждые 10 мл кровяной смеси прибавляют 1 мл 2 % теллурита калия).

В дальнейшем при приготовлении кровяной теллуритовой среды на каждые 100 мл питательного агара добавляют 11 мл кровяной теллуритовой смеси (10 мл кровяной смеси и 1 мл 2 % раствора теллурита калия). Ex tempore в такую среду добавляют еще 1 мл 2 % раствора теллурита калия.

Приготовление раствора теллурита калия

Для теллуритовых сред используют готовый коммерческий 2 % раствор теллурита калия.

При отсутствии коммерческого препарата раствор теллурита калия готовят следующим образом: в 100 мл дистиллированной воды растворяют 2 г кристаллического теллурита калия. Для стерилизации раствор прогревают в кипящей водяной бане 30 мин и сохраняют при температуре 4—6 °С. Кристаллический теллурит калия хранят герметически закрытым в банке из темного стекла.

Сывороточный агар

Сывороточный агар, используемый для отсева колоний и культивирования коринебактерий дифтерии, может быть приготовлен на любой из перечисленных выше питательных основ.

К 100 мл расплавленного и охлажденного до температуры 50 °С питательного агара (рН 7,6) стерильно добавляют 10 мл сыворотки крупного рогатого скота. Среду перемешивают, разливают в стерильные пробирки по 4—5 мл и устанавливают их в наклонном положении для получения скошенного агара, каждая партия которого проверяется на стерильность. Несколько пробирок помещают на сутки в термостат. В случае прорастания среды бракуется вся партия. Пробирки со скошенным сывороточным агаром хранят при 4—6 °С до 2 недель.

8.1.4. Мартеновский агар с мясной водой двойной концентрации

Использование Мартеновского агара может улучшить лабораторную диагностику дифтерии. Два главных идентификационных теста (выявление токсина и фермента цистиназы) требуют сбалансированной по своему составу среды, удовлетворяющей требованиям культивирования токсигенных *C. diphtheriae*.

Мартеновский пептон – 0,5 л, мясная вода – 0,5 л, агар-агар – 15 г, уксусно-кислый натрий – 5 г, мальтоза – 3 г.

В течение рабочего дня промывают в проточной водопроводной воде 15 г агара, тщательно отжимают и переносят в 1 л мартеновского бульона (0,5 л мартеновского пептона и 0,5 л мясной воды). Устанавливают рН 7,8—8,0 путем подщелачивания бульона 20 % раствором NaOH по бумажке с индикатором крезоловый красный, которая при этой реакции изменяет желтый цвет на розово-малиновый. Бульон кипятят в течение 10 мин, затем добавляют 0,5 % (5 г на 1 л) уксусно-кислого натрия, 0,3 % мальтозы (3 г на 1 л), проверяют рН и, если нужно, снова доводят до 7,8—8,0, кипятят в течение 15 мин, дают отстояться в теплом месте (в аппарате Коха или термостате) 2—3 ч и фильтруют через тканевый или ватно-марлевый фильтр. Разливают в стерильные флаконы

(70—80 мл) при большом объеме работы или пробирки (10 мл) и стерилизуют однократно текучим паром в течение 30 мин.

Мартеновский пептон

Свиные желудки, желательно парные, с упругими стенками, большим количеством слизи и без катаральных явлений очищают от жира (желудки, пропитанные желчью отбрасывают), разрезают и измельчают в мясорубке. Полученный фарш из желудков помещают в бутыли емкостью 3—5 л и заливают подогретой до 50 °С водой из расчета на 1 л воды 300—500 г измельченной массы. Туда же добавляют 1 % химически чистой соляной кислоты (уд. вес 1,19). Массу хорошо перемешивают и ставят в термостат: либо на 15—18 ч (или более) при 37 °С; либо, при наличии отдельного термостата при 42 °С, на 18 ч (или более). В течение процесса переваривания бутыль встряхивают, вначале чаще (через 1—1,5 ч), затем реже. В хорошо переваренном пептоне на дне бутыли лежит небольшой слой мелкого темного осадка.

Полноту осаждения балластных белков можно проверить путем добавления к 5 мл профильтрованного пептона 1—2 капли 10 % NaOH, муть не должна появляться.

Действие фермента останавливают нагреванием в водяной бане, постепенно доводя температуру до 80 °С, устанавливаемую по показанию термометра, погруженного в бутыль с перевaром. Нагревание продолжается в течение 10 мин. Для этой цели можно использовать аппарат Коха или автоклав. Бутыли тщательно взбалтывают, закрывают ватно-марлевой пробкой с бумажным колпачком и ставят в прохладное сухое помещение для отстаивания при температуре не выше 12 °С. Пептон годен к употреблению не ранее, чем через 7 дней, когда плотно осядут взвешенные частицы.

Необходимо добавить 20 мл хлороформа на 1 л пептона для консервирования и закрыть бутыль резиновой пробкой. В таком виде пептон может храниться без стерилизации при комнатной температуре.

Мясная вода

Для приготовления мясной воды двойной концентрации желательно использовать свежее мясо молодого животного средней упитанности. Обезжиренное, освобожденное от сухожилий мясо пропускают через мясорубку, заливают водой в пропорции 1 л воды на 1 кг фарша и оставляют на ночь при 4 °С, утром смесь кипятят на асбестовой сетке в течение 15—20 мин с момента закипания. Готовый отвар фильтруют, фарш отжимают, полученную мясную воду разливают в стерильные бутыли по 250—500 мл и стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 мин. Хранят при 4 °С.

Бумажки с индикатором крезоловый красный

0,1 г крезолового красного растворяют в 100 мл 95 % спирта и оставляют при температуре 37 °С на 24 ч, часто встряхивая. На следующий день смачивают в этом растворе полоски фильтровальной бумаги и быстро высушивают. Ярко-желтый цвет бумажек в щелочной среде переходит в разные оттенки красного.

8.2. Среды для определения биохимических свойств

8.2.1 Среды для определения цистиназной активности

Среда Пизу на основе коммерческой среды АГВ

Коммерческие сухие среды для определения цистиназной активности готовят по прописи на этикетке.

Для приготовления среды Пизу можно использовать доступную и сбалансированную по составу коммерческую среду АГВ, применяемую в бактериологической практике для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам. Навеску сухой среды АГВ в количестве 2,7 г вносят в 90 мл дистиллированной воды и кипятят до ее полного растворения. Готовят 5 % раствор гидрокарбоната натрия. Для этого растворяют 0,5 г $NaHCO_3$ в 10 мл дистиллированной воды. Затем в раствор вносят 0,1 г L-цистина и кипятят до полного растворения цистина. Затем 2 мл кипящего щелочного раствора цистина вносят в 90 мл расплавленной среды АГВ, доводят pH до 7,6 и стерилизуют при 112 °С в течение 10 мин. К расплавленной и охлажденной до 45 °С основе последовательно добавляют: 10 мл сыворотки крупного рогатого скота, 1 мл 10 % раствора уксуснокислого свинца, 1,5 мл стерильного свежеприготовленного 10 % раствора тиосульфата натрия и разливают по пробиркам, высота столбика питательной среды должна быть не менее 3 см.

Растворы уксусно-

кислого свинца и тиосульфата натрия готовят ex temporе, используя стерильные пробирки и дистиллированную воду, стерилизуют текучим паром или на водяной бане в течение 30 мин.

Данный вариант среды Пизу используют при отсутствии коммерческой среды или Мартеновского агара. Однако необходимо учитывать, что дифференциально-диагностические свойства этой среды по сравнению со средой, приготовленной на Мартеновском агаре в лабораторных условиях, менее выражены.

В лабораторных условиях можно приготовить среду Пизу на Мартеновском агаре.

Среда Пизу на Мартеновском агаре

К 90 мл расплавленного 1,5 % Мартеновского агара (не допускается использование агара Хоттингера), pH 7,6, добавляют 2 мл 1 %-го раствора L-цистина в 0,1 N растворе соляной кислоты (HCl), тщательно перемешивают и добавляют такой же объем 0,1N раствора NaOH для нейтрализации кислоты. Растворы кислот и щелочей должны быть взаимно оттитрованы, можно использовать фиксаналы, выпускаемые предприятиями химической промышленности.

Среду стерилизуют при температуре 112 °С в течение 30 мин, сохраняют в течение 1 месяца при 4 °С.

Агар с цистином расплавляют при 90 °С (среду не кипятят – для сохранения цистина). К охлажденной до 45 °С среде добавляют 1 мл 10 % раствора уксусно-кислого свинца и 9 мл сыворотки крупного рогатого скота, с соблюдением правил асептики, и разливают по пробиркам.

Необходимо учитывать, что при температуре среды 50 °С и выше, в присутствии уксусно-кислого свинца, сыворотка мутнеет и среда приобретает молочный цвет. Это затрудняет учет результатов реакции.

8.2.2. Среды для определения уреазной активности

Пробу на уреазу можно ставить в 2 вариантах: по методу Заксе и путем посева на бульон с мочевиной.

Приготовление реактивов для определения уреазной активности по методу Заксе

Готовят 2 реактива – А и В.

Реактив А:

Мочевина	2 г
96 % этиловый спирт	2 мл
Дистиллированная вода	4 мл

Реактив В:

0,2 % раствор фенолрот	1 мл
Однозамещенный фосфат калия ($KHPO_4$)	0,1 г
Двузамещенный фосфат калия (K_2HPO_4)	0,1 г
Хлорид натрия (NaCl)	0,5 г
Дистиллированная вода	100 мл

Реактив А не стерилизуют и хранят при температуре 4—6 °С. Реактив В стерилизуют в автоклаве текучим паром.

Бульон с мочевиной

К 100 мл стерильного ГРМ-бульона или мясо-пептонного или бульона Хоттингера (pH 7,0) добавляют 1 г мочевины и 0,2 мл 1,6 % спир-

тового раствора индикатора крезолрот. Разливают по 2—3 мл в стерильные пробирки и стерилизуют текучим паром в течение 10 мин.

8.2.3. Среды для определения сахаролитической активности

Для определения сахаролитической активности рекомендуется использовать питательную среду на 1 % пептонной воде.

К 100 мл горячей дистиллированной воды добавляют 1 г пептона, 0,5 г химически чистого NaCI и 1 мл индикатора Андреде. Устанавливают pH 7,4, кипятят 5 мин, фильтруют через бумажный или полотняный фильтр, доводят до первоначального объема горячей дистиллированной водой. К полученной основе добавляют один из углеводов: сахарозу, глюкозу (в количестве 1 г), крахмал (легко растворимый – 0,5 г).

Среды разливают в пробирки по 2—3 мл и стерилизуют текучим паром в течение 3 дней по 30 мин или при 0,5 атм. 30 мин. Готовые среды с индикатором Андреде бесцветные или имеют слегка розоватый оттенок, что достигается установлением необходимого значения pH.

Индикатор Андреде

Посуда для приготовления индикатора должна быть сухой, химически чистой, с притертой пробкой.

К 100 мл дистиллированной воды добавляют 0,5 г кислого фуксина и 16,4 мл 4 %-го раствора NaOH. Раствор на сутки оставляют при 37 °С, периодически встряхивая, двое суток выдерживают на свету и затем убирают в темное место. Свежеприготовленный раствор имеет соломенно-желтый цвет или слегка розовый оттенок, который исчезает в процессе хранения. При интенсивно-розовой окраске раствора в процессе приготовления индикатора необходимо добавить еще 1,6 мл 4 %-го раствора NaOH.

8.2.4. Среда для определения нитратредуктазной активности

К 100 мл питательного бульона (ГРМ-бульон или МПБ или бульона Хоттингера) pH 7,3—7,5, свободному от нитритов (проверить реактивом Грисса или Касаткина), прибавляют 0,1 г свободного от нитритов нитрата калия (KNO_3). Проверяют еще раз на содержание нитритов и разливают по 2 мл в химически чистые, сухие пробирки. Среды стерилизуют 15 мин при 120 °С.

Реактив Грисса

Раствор 1: 0,8 % сульфаниловая кислота в 5N уксусной кислоте.

Раствор 2: 0,6 % диметил-альфа-нафталамин в 5N уксусной кислоте.

Перед выполнением реакции смешивают равные объемы растворов 1 и 2. Реактив годен к применению в течение 15 мин, бесцветен, при

появлении розового окрашивания – непригоден. Растворы 1 и 2 хранят при 4 °С в течение 2 мес.

Реактив Касаткина

Раствор 1: 0,1 % раствор риванола в дистиллированной воде.

Раствор 2: 12 % раствор соляной кислоты (HCl).

Перед выполнением реакции смешивают равные объемы растворов 1 и 2. Реактив годен к применению в течение 15 мин. Растворы 1 и 2 хранят при 4 °С в течение 2 мес.

Выпускается коммерческая тест-система (ДС-ДИФ-КОРИНЕ) для определения биохимических свойств (уреазная, сахаролитическая и нитратредуктазная активность).

9. Хранение контрольных штаммов в лабораторных условиях

Контрольный токсигенный штамм коринебактерий дифтерии, варианта гравис получают в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России. В пробе на токсигенность нельзя использовать, в качестве контрольного, производственный штамм PW-8 и его варианты. Контрольный токсигенный штамм и другие контрольные штаммы коринебактерий необходимо периодически пассировать на кровяном агаре. Для успешной идентификации *C. diphtheriae* контрольный токсигенный штамм пересевается каждые 1—2 суток.

Для проверки работы сред Гисса используют контрольный токсигенный штамм *C. diphtheriae* варианта гравис, а также штамм *C. pseudodiphtheriticum* (ложнодифтерийную палочку Гофмана). При изучении ингибирующих свойств питательных сред применяют штамм стафилококка.

Перечень используемых контрольных штаммов

А) штамм *C. diphtheriae* токсигенный биовара gravis № 665;

Б) штамм *C. ulcerans* № 675 или штамм *C. pseudodiphtheriticum* «Соколов»;

В) штамм *Staphylococcus aureus* № 25923.

Поддержание и хранение контрольных штаммов в лаборатории

А) Для хранения контрольных штаммов можно использовать полужидкий сывороточный агар, приготовленный на бульоне Мартена или другом коммерческом питательном бульоне (pH 7,6), например, ГРМ. Хранить в холодильнике, пересев один раз в 2—3 месяца. Полужидкий агар разливают по 8 мл в пробирки и добавляют по 1 мл сыворотки крупного рогатого скота.

Б) Способ длительного хранения – бактериальную взвесь *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudodiphtheriticum* или *S. aureus* можно хранить в 50 % растворе глицерина до 6 месяцев при температуре –(18—20 °С). Раствор глицерина готовят в физиологическом растворе, разливают по 1,5 мл в 2 мл одноразовые пластиковые пробирки с закручивающимися крышками (рекомендуется закладывать по несколько аликвот контрольных штаммов). Для восстановления контрольных штаммов коринебактерий, бактериальную взвесь переносят в бульон (ГРМ-бульон, бульон Мартена или другой питательный бульон), содержащий сыворотку крупного рогатого скота и теллурит калия (пример расчета: 4 мл бульона, 500 мкл сыворотки крупного рогатого скота и 1 капля теллурита калия). Далее инкубируют при 37 °С в течение 24 ч и производят высев на одну из рекомендуемых дифференциально-диагностических плотных питательных сред.

10. Методы контроля питательных сред

На конечный результат качества питательной среды может оказать влияние множество факторов. Поэтому контроль качества питательных сред должен осуществляться на всех этапах, начиная от момента закупки среды до непосредственного ее использования, осуществляя проверку документации и визуальный контроль. Сроки и условия хранения соблюдать в соответствии с указаниями производителя.

Бактериологическому контролю подлежат среды для первичного посева материала и среды для определения токсигенных, биохимических и сахаролитических свойств. Результаты проведения контроля качества питательных сред оформляются в соответствующем журнале в установленном порядке.

10.1. Метод бактериологического контроля питательных сред для первичного посева и сред для определения токсигенных и биохимических свойств

В практических лабораториях каждая серия питательных сред, особенно при использовании новых основ (промышленного или лабораторного изготовления) и новых ингредиентов, подлежит бактериологическому контролю ввиду возможной их нестандартности.

1. Контроль качества сред для первичного посева исследуемого материала устанавливают путем определения:

а) всхожести клеток коринебактерий дифтерии;

б) времени формирования колоний, интенсивности их роста, размера и культурально-морфологических свойств;

в) ингибирующей активности в отношении сопутствующей микрофлоры.

С этой целью используют контрольный токсигенный штамм с типичными культурально-морфологическими свойствами, штамм золотистого стафилококка (контрольный или свежевыделенный).

Для контроля качества питательных сред необходимо использовать два контрольных штамма – токсигенный штамм *C. diphtheriae* биовара *gravis* и штамм *Staphylococcus aureus*. Суточные культуры коринебактерий дифтерии и стафилококка, выращенные на сывороточном агаре, смывают физиологическим раствором. Мутность полученной суспензии должна соответствовать 10 ед. оптического стандарта мутности (ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России) или 0,5 ед. по стандарту мутности МакФарланда, что условно соответствует 1 млрд бактериальных клеток в 1 мл взвеси. Из исходных взвесей культур коринебактерий дифтерии и стафилококка готовят последовательные разведения в физиологическом растворе (см. схему).

Схема приготовления разведений культуры коринебактерий дифтерии и стафилококка

№ пробирки	Кол-во физ. р-ра, мл	Объем вносимой суспензии, мл	Условное кол-во микр. клеток в 1 мл взвеси
1	1,0	1,0 из исходной взвеси	5×10^8
2	4,5	0,5 из 1-й пробирки	5×10^7
3	4,5	0,5 из 2-й пробирки	5×10^6
4	4,5	0,5 из 3-й пробирки	5×10^5
5	4,5	0,5 из 4-й пробирки	5×10^4
6	4,5	0,5 из 5-й пробирки	5×10^3
7	2,0	0,5 из 6-й пробирки	10^3

Из двух последних разведений (6 и 7) по 0,1 мл суспензии культуры коринебактерий дифтерии вносят в две чашки с испытуемой средой, досуха втирают стеклянным шпателем. На две другие чашки с испытуемой средой таким же образом, из 6 и 7 разведений, производят посев взвеси *S. aureus*.

Учет результатов производят через 24 и 48 ч. Питательная среда для первичного посева патологического материала удовлетворяет необходимым требованиям, если колонии *C. diphtheriae* формируются на испытуемой среде через 24 ч инкубации. При высеве из 7 разведения

должна вырастать хотя бы одна колония *C. diphtheriae*. Отсутствие формирования (наличие «видимых невооруженным глазом») колоний *C. diphtheriae* через 24 ч инкубации в посевах из 6 и 7 разведений или через 48 ч инкубации в посеве из 7 разведения свидетельствует о сниженных ростовых свойствах питательной основы. В этом случае питательную основу необходимо поменять или возможно улучшить ростовые свойства питательной среды путем приготовления агаровой основы на питательных бульонах.

Возможен рост единичных колоний стафилококка в посеве из 7 разведения (чаще всего на КТА). Такая среда может использоваться для посева, но в журнале контроля питательных сред отмечают снижение ингибирующих свойств данной серии среды. Повышение концентрации теллурита калия в среде не допускается.

2. Контроль среды для определения токсигенности коринебактерий дифтерии осуществляют путем испытания ее контрольным токсигенным штаммом, соблюдая все этапы методики определения токсигенных свойств на плотных питательных средах. Критерием оценки качества среды является наличие специфических линий преципитации и время их образования. Пригодными для работы считаются такие серии среды, при использовании которых у контрольного токсигенного штамма интенсивные линии преципитации образуются не позднее 24 ч после посева «бляшками». Среды (или новые ингредиенты) не могут быть использованы и подлежат замене в случае отсутствия линий преципитации или появления их в более поздние сроки.

3. Бактериологический контроль сред для определения биохимических свойств проводят путем определения степени выраженности и времени формирования признака. Среды Пизу, Гисса, бульоны с мочевиной (или субстрат по методу Заксе), с нитратом калия (KNO_3) засевают (не более одной петли) контрольным токсигенным штаммом *C. diphtheriae* биовара *gravis*, дополнительным контролем для сред с мочевиной (или субстрат по методу Заксе) является контрольный штамм *C. pseudodiphtheriticum* (или *C. ulcerans*).

10.2. Метод количественного определения аминного азота

В случае неудовлетворительной работы питательных сред необходимо проверить основы сред на содержание аминного азота.

Принцип метода основан на блокировании формальдегидом при pH 7,0 свободных аминогрупп и титровании щелочью эквивалентного количества карбоксильных групп. Начало и конец титрования определяют потенциометрически.

Реактивы:

1. Гидроксид натрия (NaOH) 0,1N раствор.

2. Соляная кислота (HCl) 0,1N раствор.

3. Формалин (40 % раствор формальдегида). Перед каждым определением необходимо довести pH формалина до 7,0.

Ход определения

Для анализа используют определенный объем жидкого образца. Для жидких гидролизатов с низкой степенью расщепления (0,1—0,2 % аминного азота) – 3 мл; со средней степенью расщепления (0,3—0,6 % аминного азота) – 1 мл; с высокой степенью расщепления (0,7—1,3 % аминного азота) – 0,5 мл; для жидких питательных сред (0,08—0,04 % аминного азота) – 3 мл; для жидких экстрактов (0,02—0,04 % аминного азота) – 10 мл.

В стакан емкостью 50 мл вносят исследуемый образец и доводят общий объем дистиллированной водой до 20 мл. Электроды потенциометра погружают в исследуемый раствор и доводят pH раствора до 7,0 с помощью 0,1N раствора NaOH или 0,1N раствора HCl. Затем добавляют 2 мл нейтрального формалина, перемешивают и, не вынимая электродов, титруют содержимое пробы с помощью 0,1N раствора NaOH до pH 9,1. При титровании следует использовать микробюретку на 5 мл.

Содержание аминного азота в исследуемом образце в % (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot K \cdot 1{,}4 \cdot 100}{B \cdot 1000}, \text{ где}$$

A – количество 0,1N раствора NaOH в мл, пошедшее на титрование исследуемой пробы;

K – поправка к титру 0,1N раствора NaOH;

1,4 – количество аминного азота в мг, эквивалентное 1 мл 0,1N раствора NaOH;

100 – коэффициент пересчета в проценты;

B – количество жидкого образца в мл, взятое на анализ;

1 000 – коэффициент пересчета мг в г.

11. Методика постановки реакции пассивной гемагглютинации для выявления противодифтерийных антитоксических антител (РПГА)

Для оценки состояния противодифтерийного иммунитета проводят определение антитоксических противодифтерийных антител в сыворот-

ке крови человека методом постановки реакции пассивной гемагглютинации.

РПГА – двухкомпонентная реакция, предполагающая взаимодействие диагностикума эритроцитарного дифтерийного антигенного, который представляет собой эритроциты, сенсибилизированные дифтерийным анатоксином, и антитоксических противодифтерийных антител, находящихся в сыворотке крови обследуемых. При наличии в исследуемой сыворотке антитоксина образуется специфический комплекс: антитоксин + сенсибилизированные анатоксином эритроциты. В результате формируется осадок в виде агглютината эритроцитов.

РПГА рекомендуется ставить одновременно с двумя диагностикумами – дифтерийным и столбнячным. Несмотря на возможность использования коммерческих наборов, необходимо соблюдать основные требования, предъявляемые при постановке РПГА, чтобы устранить ошибки, некоторые неточности и даже ошибочные сведения, встречающиеся в Инструкциях по применению от производителей.

При проведении реакции необходимо обратить внимание на следующее.

– Используют полистироловые одноразовые планшеты с лунками только «U»-образной формы (со сферическим дном). Не допускается повторное использование одноразовых планшетов.

– Испытуемые сыворотки должны быть прогреты и адсорбированы эритроцитами барана формалинизированными 50 %.

– Титрование испытуемых сывороток всегда начинают (1-я лунка) с разведения 1 : 10.

– Используют контрольную противодифтерийную сыворотку (СДК) с содержанием противодифтерийных антитоксических антител – 10 МЕ в мл, разводя её 1 : 100 (до содержания 0,1 МЕ в мл). Контрольная противостолбнячная сыворотка (ССК) содержит 4 МЕ в мл, разводят 1 : 40 (до содержания 0,1 МЕ в мл).

– Перед проведением исследований необходимо провести контроль на специфическую активность диагностикума с СДК.

– Обязательные отрицательные контроли:

• на отсутствие спонтанной агглютинации диагностикума;

• на отсутствие агглютининов к эритроцитам барана в испытуемых сыворотках.

– Испытуемые сыворотки с титром антитоксических противодифтерийных антител менее 1 : 10 и 1 : 20 подлежат повторному исследованию.

– Сбор, а также обработку проб крови для получения сывороток с целью исследования следует проводить в ЛПО в установленном порядке.

Оснащение и его подготовка для проведения РПГА

Постановка РПГА возможна микро- и макрометодом.

Для проведения РПГА микрометодом/макрометодом необходимы:

– коммерческий набор для определения противодифтерийных антитоксических антител «Диагностикум эритроцитарный дифтерийный антигенный жидкий» для микро/макро метода;

– мерная посуда, пипеточные дозаторы, многоканальные пипетки, наконечники;

– полистироловые планшеты «U»-образные (со сферическим дном) для микро/макро метода.

Каждую лунку полистироловых планшетов перед проведением реакции протирают ватно-марлевым тампоном, смоченным в разведенном ФБР с твином, а затем протирают сухим тампоном.

Подготовка растворов и диагностикума для РПГА

1. Коммерческий набор содержит:

– фосфатно-солевой буферный раствор концентрированный без твина (ФБР без твина) – для разведения диагностикума и контрольных эритроцитов;

– фосфатно-солевой буферный раствор концентрированный с твином (ФБР с твином) – для разведения сыворотки антитоксической противодифтерийной контрольной и проведения РПГА;

– диагностикум эритроцитарный дифтерийный 3 %;

– эритроциты барана формалинизированные 50 % - для адсорбции гетерогемагглютининов в испытуемых сыворотках;

– эритроциты барана контрольные;

– сыворотка противодифтерийная контрольная, содержащая 10 МЕ/мл.

2. Приготовление раствора ФБР без твина.

Содержимое флакона «ФБР без твина» разводят до объема 62,5 мл дистиллированной водой (pH готового раствора от 7,15 до 7,25). Приготовленный раствор используют в день проведения реакции.

3. Приготовление раствора ФБР с твином.

Содержимое флакона «ФБР с твином» разводят до объема 125 мл дистиллированной водой (pH готового раствора от 7,15 до 7,25). Разведенный раствор можно разлить по флаконам, герметически укупорить и хранить при температуре 5—8 °С в течение 72 ч.

4. Приготовление раствора противодифтерийной контрольной сыворотки (СДК).

Сыворотку противодифтерийную контрольную (10 МЕ/мл) разводят в 100 раз до содержания 0,1 МЕ/мл с помощью ФБР с твином (к 9,9 мл ФБР с твином добавляют 0,1 мл СДК) – для микро- и макрометода. СДК должна быть использована в течение суток.

5. Приготовление рабочего разведения диагностикума эритроцитарного дифтерийного (ДЭД).

Диагностикум эритроцитарный дифтерийный 3 % разводят ФБР без твина в 8 раз (к 7,0 мл ФБР без твина добавляют 1,0 мл 3 % взвеси ДЭД). При проведении РПГА макрометодом используют неразведенный ДЭД.

6. Приготовление рабочего разведения эритроцитов барана контрольных (КЭ).

Контрольные эритроциты разводят ФБР без твина в 8 раз (к 7,0 мл ФБР без твина добавляют 1,0 мл КЭ). КЭ при проведении РПГА макрометодом не разводят.

Подготовка исследуемых сывороток

Исследуемую сыворотку человека перед определением уровня дифтерийного антитоксина разводят в 5 раз 0,85 % свежеприготовленным раствором хлорида натрия. Для этого к 0,1 мл исследуемой сыворотки добавляют 0,4 мл 0,85 % раствора хлорида натрия для микрометода, для макрометода к 0,2 мл исследуемой сыворотки добавляют 0,8 мл 0,85 % раствора хлорида натрия. Разведенную сыворотку прогревают в течение 30 мин в водяной бане (термостате) при температуре 56 °С. Разведенную и прогретую сыворотку адсорбируют эритроцитами барана, формалинизированными 50 %, которые перед использованием встряхивают до получения гомогенной взвеси. Эритроциты добавляют из расчета 0,05—0,1 мл на 1,0 мл разведенной сыворотки, выдерживают 15—20 ч при температуре 2—8 °С. После сорбции прозрачная надосадочная жидкость готова к исследованию (без предварительного центрифугирования).

Проведение реакции пассивной гемагглютинации (микрометод/макрометод)

Контроль на активность диагностикума и отсутствие спонтанной агглютинации

Перед исследованием сывороток следует на отдельном планшете провести контроль на активность диагностикума и отсутствие спонтанной агглютинации. Для этого в два ряда по 12 лунок планшета вносят по 0,025 разведенного ФБР с твином для микрометода (по 0,4 мл для мак-

рометода). После этого в 1 лунку ряда вносят 0,025 мл СДК разведенной 1 : 100 (по 0,4 мл для макрометода), получают разведение 1 : 200, содержимое лунки тщательно перемешивают и, перенося по 0,025 мл раствора из предыдущей лунки в последующую (по 0,4 мл для макрометода), делают двукратные разведения до 10 лунки включительно. Из десятой лунки, после перемешивания, удаляют 0,025 мл (0,4 мл для макрометода), а затем во все лунки с 1 по 12 закапывают по 0,025 мл диагностикума (0,05 мл для макрометода). 11 и 12 лунки являются контролем диагностикума на отсутствие спонтанной агглютинации.

Контроль на активность диагностикума следует ставить для каждого флакона с диагностикумом из набора перед проведением исследований испытуемых сывороток. Разведенный диагностикум может быть использован в течение суток, если его активность соответствует требуемой.

Исследование испытуемых сывороток(микрометод)

Во все лунки планшета вносят по 0,025 мл разведенного ФБР с твином.

В 1 лунку ряда вносят 0,025 мл разведенной в 5 раз прогретой, адсорбированной испытуемой сыворотки, тщательно перемешивают, получают разведение 1 : 10 и, перенося по 0,025 мл раствора из предыдущей лунки в последующую, делают двукратные разведения до 10 лунки включительно. Из 10 лунки после перемешивания удаляют 0,025 мл. Следует отметить, что в каждой из лунок перемешивание необходимо производить не менее 3 раз, а затем содержимое переносить в последующую лунку. При больших объемах исследований для экономии всех ингредиентов титрование сывороток можно проводить в 8 лунках «по короткому ряду» планшета.

Для контроля на отсутствие агглютининов к эритроцитам барана, при постановке РПГА «по длинному ряду», в 11 лунку вносят 0,025 мл испытуемой сыворотки, прогретой, адсорбированной, разведенной 1 : 5, перемешивают и переносят 0,025 мл в 12 лунку. Из 12 лунки, после перемешивания, удаляют 0,025 мл. В 11 и 12 лунки с испытуемой сывороткой вносят по 0,025 мл рабочего разведения контрольных эритроцитов барана. При титровании «по короткому ряду» этот контроль для испытуемых сывороток ставят на специально выделенном для этого планшете. Флакон с разведенным диагностикумом тщательно встряхивают до образования однородной взвеси эритроцитов и вносят по 0,025 мл диагностикума с 1 до 10 лунку включительно (или с 1 до 8 лунки с разведениями испытуемых сывороток при постановке реакции «по короткому ряду»).

Равномерное распределение эритроцитов в лунках планшета достигается путем постукивания по его углам. Планшеты оставляют на ровной поверхности в течение 2,5—3,5 ч при температуре 20—22 °С. Перемещение планшетов до учета результатов реакции не допускается. В исключительных случаях учет результатов реакции возможен через 18—22 ч.

Исследование испытуемых сывороток(макрометод)

Во все лунки планшета вносят по 0,4 мл разведенного ФБР с твином.

В 1 лунку ряда вносят 0,4 мл разведенной в 5 раз прогретой, адсорбированной испытуемой сыворотки, тщательно перемешивают, получают разведение 1 : 10 и, перенося по 0,4 мл раствора из предыдущей лунки в последующую, делают двукратные разведения до 10 лунки включительно. Из 10 лунки после перемешивания удаляют 0,4 мл. Следует отметить, что в каждой из лунок перемешивание необходимо производить не менее 3 раз, а затем содержимое переносить в последующую лунку. При больших объемах исследований для экономии всех ингредиентов титрование сывороток можно проводить в 8 лунках «по короткому ряду» планшета.

Для контроля на отсутствие агглютининов к эритроцитам барана, при постановке РПГА «по длинному ряду», в 11 лунку вносят 0,4 мл испытуемой сыворотки, прогретой, адсорбированной, разведенной 1 : 5, перемешивают и переносят 0,4 мл в 12 лунку. Из 12 лунки, после перемешивания, удаляют 0,4 мл. В 11 и 12 лунки с испытуемой сывороткой вносят по 0,05 мл рабочего разведения контрольных эритроцитов барана. При титровании «по короткому ряду» этот контроль для испытуемых сывороток ставят на специально выделенном для этого планшете. Флакон с диагностикумом тщательно встряхивают до образования однородной взвеси эритроцитов и вносят по 0,05 мл диагностикума с 1 до 10 лунку включительно (или с 1 до 8 лунки с разведениями испытуемых сывороток при постановке реакции «по короткому ряду»).

Планшеты оставляют на ровной поверхности в течение 2,5—3,5 ч при температуре 20—22 °С. Перемещение планшетов до учета результатов реакции не допускается. В исключительных случаях учет результатов реакции возможен через 18—22 ч.

Учет и интерпретация результатов

Результаты РПГА оценивают визуально – по степени агглютинации эритроцитов:

++++ гемагглютинат тонким слоем выстилает все дно лунки, напоминая по форме перевернутый купол, края которого могут заворачиваться;

+++ агглютинировавшие эритроциты ровным слоем выстилают дно лунки, но размер агглютината меньше, может наблюдаться фестончатое утолщение края осадка;

++ агглютинировавшие эритроциты располагаются в центральной части лунки, окружены слоем эритроцитов в виде кольца;

+ на дне лунки образуется широкое, плотное кольцо с незначительной агглютинацией по краю;

– осадок в центральной части лунки в виде диска или кольца с ровным краем.

За титр испытуемой и контрольной сывороток принимают последнее разведение, дающее агглютинацию эритроцитов на два креста (++).

Реакция в контролях на отсутствие в испытуемой сыворотке агглютининов к эритроцитам барана и на отсутствие спонтанной агглютинации диагностикума должна быть отрицательной. Если испытуемая сыворотка в лунках с контрольными эритроцитами дает гемагглютинацию, нужно повторно адсорбировать из нее гетерогемагглютинины: то есть повторно провести обработку сыворотки 50 % формалинизированными эритроцитами. Это явление встречается крайне редко.

При определении специфической активности (чувствительности) диагностикума, агглютинация на два креста с сывороткой противодифтерийной контрольной должна быть не ниже 1 : 3 200 и не выше 1 : 12 800, что соответствует 5—7 лункам. В противном случае диагностикум бракуется и реакция не учитывается. (Активность столбнячного диагностикума с противостолбнячной контрольной сывороткой должна быть не ниже 1 : 1 280 и не выше 1 : 5 120, что соответствует 5—7 лункам.)

Условно-защитным титром как противодифтерийных, так и противостолбнячных антител принимается титр 1 : 20.

Испытуемые сыворотки с титром противодифтерийных антитоксических антител 1 : 20 и менее подлежат повторному исследованию в РПГА с использованием уже разведенной 1 : 5, прогретой, адсорбированной эритроцитами барана сыворотки. При наличии достаточного количества нативной сыворотки ее вновь разводят 1 : 5, прогревают, сорбируют эритроцитами барана и исследуют в РПГА. За окончательный результат исследования принимают более высокий титр.

Количественные показатели содержания антитоксических противодифтерийных антител в сыворотке крови, полученные с помощью РПГА (в титрах), не переводят в другие единицы измерения количества антител.

Техника безопасности при постановке РПГА

Все мероприятия по технике безопасности при постановке РПГА проводятся в установленном порядке.

12. Нормативные и методические ссылки

1. СП 1.3.2322—08 «Безопасность работы с микроорганизмами III—IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

2. СП 1.2.036—95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I—IV групп патогенности».

3. СанПиН 2.1.7.2790—10 «Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами».

4. СП 3.1.2.1108—02 «Профилактика дифтерии».

5. МУ 3.1.2.3018—12 «Эпидемиологический надзор за дифтерийной инфекцией».

6. МУ 3.1.2943—11 «Организация и проведение серологического мониторинга состояния коллективного иммунитета к инфекциям, управляемым средствами специфической профилактики (дифтерия, столбняк, коклюш, корь, краснуха, эпидемический паротит, полиомиелит, гепатит В)».

Приложение 1

Рецепты красок

1. Щелочной метиленовый синий Леффлера.

Дистиллированная вода	99 мл
1 % раствор гидроксида калия (КОН)	1 мл
10 % спиртовой раствор метиленового синего	30 мл

Смешать. Окрашивать в течение 1—2 мин.

2. Уксуснокислый толуидиновый синий.

Толуидиновый синий	0,5 г
Ледяная уксусная кислота	2 мл
96 % этиловый спирт	5 мл
Дистиллированная вода	100 мл

Смешать. Окрашивать в течение 3—5 мин.

3. Кристаллический фиолетовый.

Кристаллический фиолетовый	0,25 г
5 % раствор уксусной кислоты	100 мл

Смешать. Профильтровать. Окрашивать в течение 5—7 мин

4. Окраска по Граму.

Имеется коммерческий набор окраски по Граму.

В лабораторных условиях для выполнения окраски по Граму готовят следующие растворы:

Карболовый раствор генцианового фиолетового или *кристаллического фиолетового:* 1) красителя 1 г, 96 % спирта 10 мл, кристаллической карболовой кислоты 2 г, дистиллированной воды 100 мл (растирают в ступке краситель с карболовой кислотой до консистенции кашицы, прибавляют небольшими порциями спирт и окончательно разводят водой, сливают в бутыль, оставляют на сутки, затем фильтруют) или

2) насыщенного (4,8 %) спиртового раствора красителя 10 мл, 2 % карболовой воды 100 мл.

Раствор Люголя (в модификации Грама): йодида калия 2 г, дистиллированной воды 10 мл, йода кристаллического 1 г. Смесь хорошо укупоривают, оставляют на сутки, после чего добавляют дистиллированной воды 300 мл.

Методика окраски по Граму. На фиксированный мазок накладывают кусочек фильтровальной бумаги и на нее наливают карболовый раствор генцианового фиолетового на ½—1 мин. Сливают краситель и,

не смывая, наливают раствор Люголя на 1 мин. Сливают раствор Люголя и прополаскивают препарат в 95 % спирте в течение ½—1 мин, пока не перестанет отходить краситель. Промывают водой. Дополнительно окрашивают разведенным фуксином в течение ½—1 мин. Краситель сливают, препарат промывают и высушивают.

Окраска по Нейссеру

Для выявления зерен волютина используют эту окраску. Фиксированный мазок выдерживают по 1 мин в растворе метиленового синего и в растворе Люголя. Промывают водой. Докрашивают раствором хризоидина (или везувина, или бисмарк-браун) 1—3 мин. Промывают водой. Тела бактерий окрашиваются в нежно-желтый цвет, зерна волютина – в темно-коричневый с синим оттенком.

Приложение 2

Материалы и оборудование

Стерильный зонд-тампон (полистирол с тампоном из вискозы), в индивидуальной упаковке, стерильный зонд для взятия мазков из ротоглотки и носа у детей и взрослых	
Чашки Петри стеклянные или одноразовые пластиковые	ГОСТ 23932—90
Петли микробиологические	
Пипетки	ГОСТ 29227—91
Пробирки бактериологические	ГОСТ 25336—82
Штативы для пробирок Ш-20/18 (D = 18 мм)	ГОСТ 13726—97
Планшет полимерный для иммунологических реакций однократного применения	ТУ 9398-057-00480230—2009 РЅ ФСР 2009/05416
Калиброванные дозаторы и многоканальные дозаторы (диапазоны объемов 5-50, 50-200 и 200-1 000 мкл) и одноразовые сменные наконечники	
Мерные цилиндры объемом 50 мл и 1 л	ГОСТ 1770—74
Бутыль для промывочного буфера	
Фильтровальная бумага	
Набор для микроскопии:	
стекла покровные для микропрепаратов	ГОСТ 6672
стекла предметные для микропрепаратов	ГОСТ 9284
иммерсионное масло	ГОСТ 13739—78
Бинокулярный стереоскопический микроскоп или бинокулярная лупа с большим фокусным расстоянием	
Термостат, поддерживающий температуру (37 ± 1) °С	
Холодильник, поддерживающий температуру 4—6 °С	
Морозильник, поддерживающий температуру –(18—20) °С	
Микроскоп бактериологический	
Весы бактериологические	
pH-метр	

Водяная баня 37 °С с крышкой, или влажная камера, помещенная в инкубатор при 37 °С
Халаты, одноразовые перчатки

Питательные среды и ингредиенты

СПА	ТУ 9385-012-14237183—2007 РЗ№ ФСР 2008/02386
ГРМ-агар	ТУ 9398-020-78095326—2006 РЗ№ ФСР 2007/00001
Коринебакагар	ТУ 9398-019-78095326—2006 РЗ№ ФСР 2007/00003
Коринетоксагар	ТУ 9398-026-78095326—2007 РЗ№ ФСР 2007/00370
Среда ОТДМ	ТУ 9385-024-14237183—2007 Р № ФСР 2008/00459
ГРМ-бульон	РЗ№ 00003/01-2000
Среда Пизу	ТУ 9398-047-78095326—2008
Среда Пизу	ТУ 9385-034-14237183—2007 Р № ФСР2008/00458
Кровь крупного рогатого скота для питательных сред, дефибринированная	ТУ 10.02.01.174—93
Кровь баранья, дефибринированная	
Сыворотка крови крупного рогатого скота жидкая, стерильная	ТУ 10.02.01.174—93
Оптический стандарт мутности	
Стандарт мутности по МакФарланду	
Набор для микробиологических исследований для окраски микроорганизмов по Граму	
Мочевина	ГОСТ 6691—76
Крезоловый красный	ТУ 6-09-5207—85
Кислота соляная, конц., чда	ГОСТ 311—77
Кислота уксусная, ледяная, чда	ГОСТ 61—75
Калий азотно-кислый, чда	ГОСТ 4217—77
Калий гидроокись	ГОСТ 24363—80
Калия теллурит, ч	ТУ 6-09-2060—77
Калий фосфорно-кислый однозамещенный, чда	ГОСТ 4198—75
Калий фосфорно-кислый двузамещенный, чда	ГОСТ 2493—75
Натрия гидроокись, чда	ГОСТ 4328—77
Натрия тиосульфат, чда	ГОСТ 27068—86
Натрий уксусно-кислый, плавленый, ч	ТУ 6-09-246—84

Натрий углекислый, кислый, чда	ГОСТ 4201—79
Натрий хлористый, чда	ГОСТ 4233—77
Свинец уксусно-кислый, чда	ГОСТ 1027—67
Реактив Грисса, чда	ТУ 6-09-3569—86
Глицерин, чда	ГОСТ 6259—75
Крахмал растворимый, чда	ГОСТ 10163—76
Формалин	ГОСТ 1625—89
Хлороформ, хч	ТУ 2631-020-11291058—96
Кристаллический фиолетовый, чда	ТУ 6-09-4119—75
Метиленовый синий, чда	ТУ 6-09-29—76
Фуксин кислый, ч	ТУ 6-09-3803—82
Стерильный 0,9 % раствор натрия хлорида pH (7,0 ± 0,2)	ГОСТ 4233
Дистиллированная или дважды деионизированная вода	ГОСТ 6709—72

Приложение 3

Таблица и рисунки

Таблица 1

Биохимические свойства патогенных и некоторых непатогенных коринебактерий, встречающихся у человека и растущих на кровяных теллуритовых средах

Вид коринебактерий	Токсигенные св-ва	Цистиназа	Уреаза	Разложение			Редукция нитратов	Дополнительные тесты при идентификации коринебактерий			
				глюкозы	сахарозы	крахмала		мальтоза	трегалоза	гидролиз желатина	липофильность
C. diphtheriae var. gravis	+/–	+	–	+	–	+	+	+	–	–	–
C. diphtheriae var. mitis	+/–	+	–	+	–	–	+	+	–	–	–
C. diphtheriae var. intermedius	+/–	+	–	+	–	–	+	+	–	–	+
C. diphtheriae var. belfanti	–	+	–	+	–	–	–	+	–	–	–
C. ulcerans	+/–	+	+	+	–	+	–	+	+	+	–
C. pseudotuberculosis	+/–	+	+	+	В чаще -	–	В чаще -	+	–	–	–
C. pseudodiphtheriticum (C. hofmani)	–	–	+	–	–	–	+	–	–	–	–
C. xerosis	–	–	–	+	+	–	+/–	+	–	–	–

В – вариабельные свойства

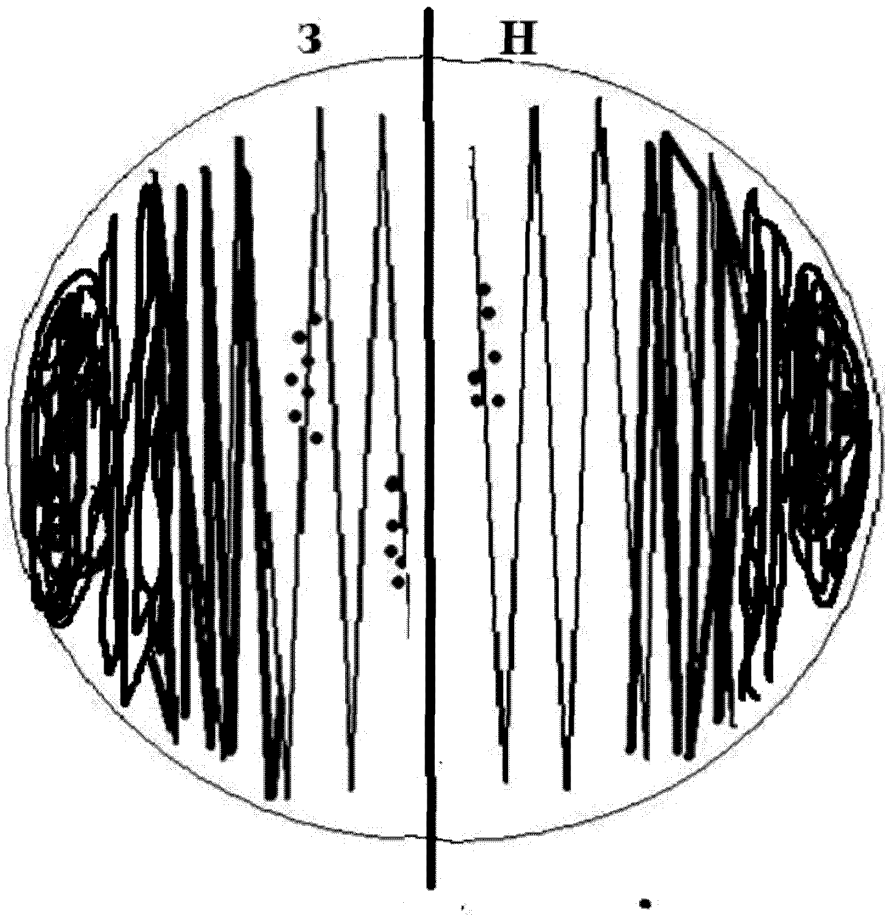

Рис. 1. Посев патологического материала «чашечным методом» с формированием «площадки»

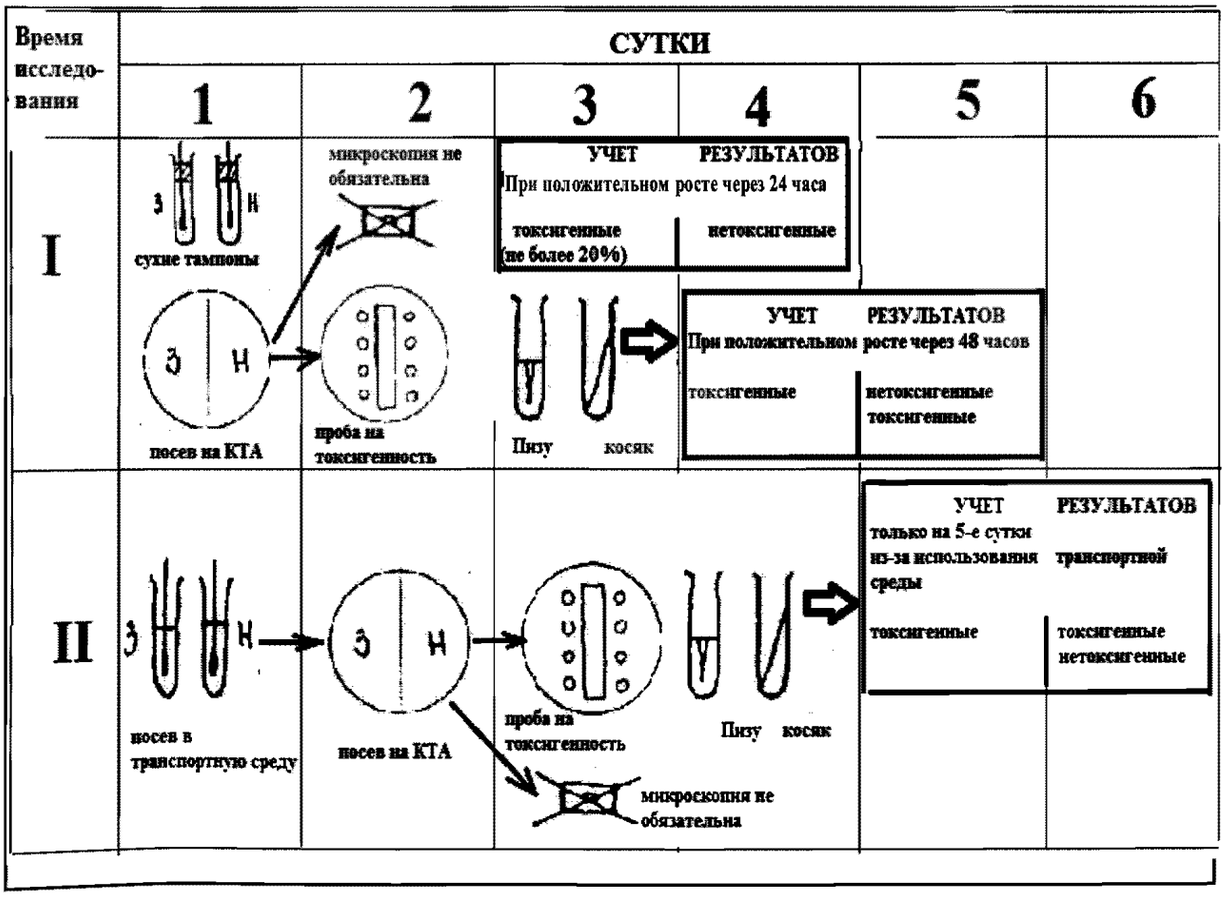

Рис. 2. Схема бактериологической диагностики дифтерии

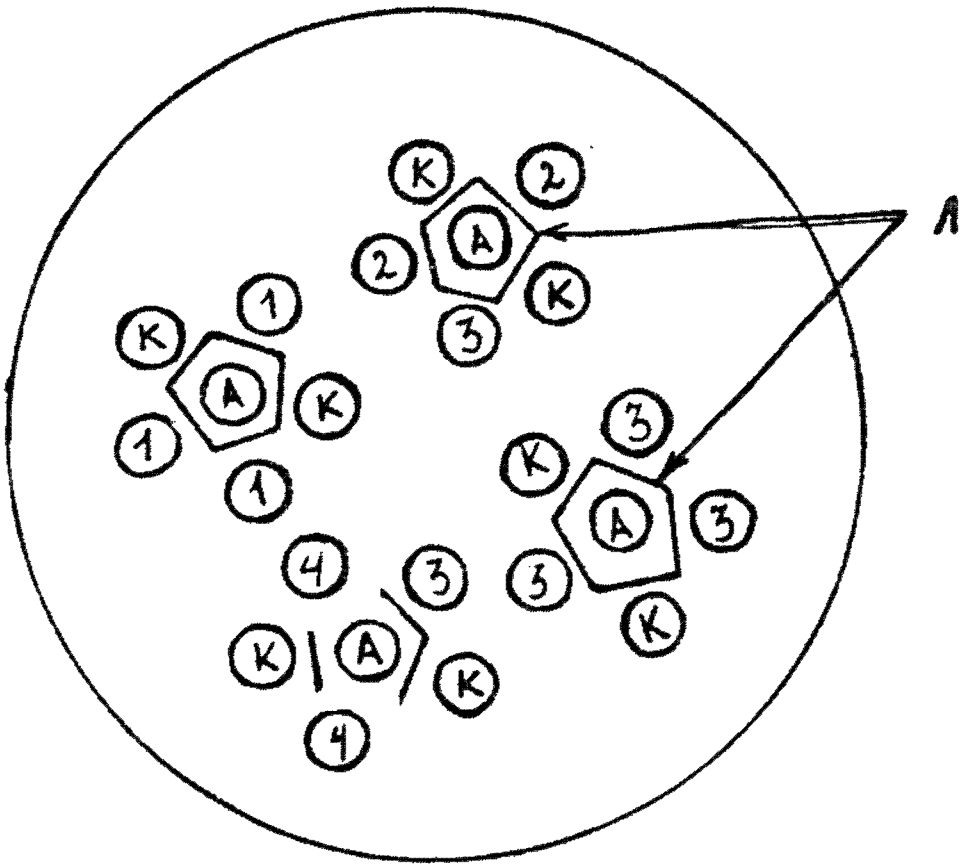

Рис. 3. Схема учета линий преципитации в пробе на токсигенность с использованием бумажных дисков с антитоксином (по Фельдману с соавт.)

А – бумажные диски с антитоксином; К – контрольный токсигенный штамм; Л – линии преципитации; 1, 2, 3, 4 – испытуемые культуры, 1,2,3 – токсигенные культуры, 4 – испытуемая нетоксигенная культура.

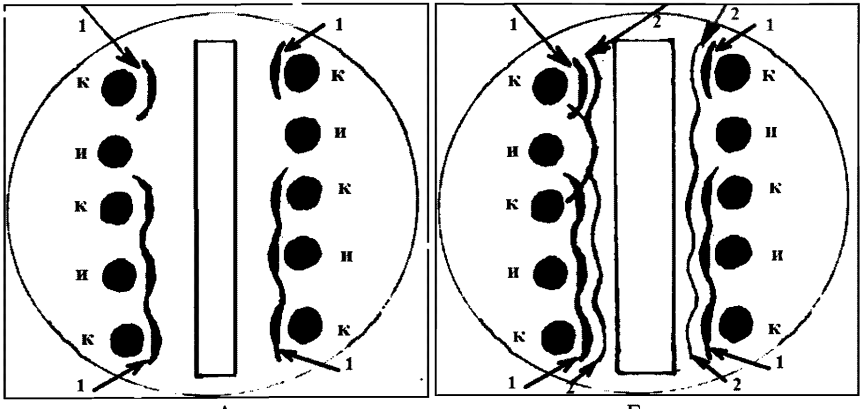

Рис. 4. Схема учета линий преципитации в пробе на токсигенность по модифицированному тесту Элека с бумажными полосками с антитоксином (А) и с сывороткой противодифтерийной лошадиной лечебной (Б)

Полоска с антитоксином; К – контрольный токсигенный штамм;
И – испытуемые культуры; стрелки 1 – специфические линии преципитации;
стрелки 2 – неспецифические линии преципитации.

gost.e-ecolog.ru