

Поступила 13.02.89

A METHOD FOR ISOLATING *SALMONELLA TYPHOSA* AND OTHER *SALMONELLAE*.

Yu. I. Litinsky, G. I. Gerok, I. S. Molochayeva, D. Kh. Karimova, B. R. Boboyeva, M. N. Getz, Z. A. Mahkambayeva

The suggested method for the isolation of hemocultures of *Salmonellae* is based on the inoculation of the patient's blood into special semiliquid medium. After stirring, the medium is poured into Petri dishes. If *Salmonellae* are present in the blood, characteristic colonies colored black or dark-gray, 5 to 15 mm in diameter, are detectable on the surface of and deep in the medium. In contrast to the routine technique for the isolation of hemocultures, the suggested method helps essentially increase the number of positive answers and accelerates the investigation.

© Г. П. КАЛИНА, Г. М. ТРУХИНА, 1990

УДК 616.935-078

Г. П. Калина, Г. М. Трухина

СПОСОБ УПРОЩЕННОЙ И УСКОРЕННОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ ДИЗЕНТЕРИЙНОЙ ГРУППЫ ПРИ МАССОВЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Московский институт гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана

В медицинской микробиологии четко определились две альтернативные тенденции развития — научная, достигшая особенного прогресса в годы НТР, и практическая, отвечающая запросам лабораторий, основная задача которых — ускорение диагностики инфекционных заболеваний с возможно меньшими затратами труда и времени. В процессе углубленных таксономических исследований количество тестов, позволяющих определять свойства и признаки отдельных таксонов, доведено в последнее время до десятков единиц, например в руководстве [6] число свойств дизентерийной группы доведено до 30, а в руководстве [4] их 36, а для дифференциации отдельных видов — 19. В практической работе отмечается стремление снизить

насколько возможно количество операций по идентификации выделяемых культур, хотя даже в инструкции по исследованию пищевых отравлений [1] рекомендовано 15 тестов. Несомненно, что при массовых практических исследованиях такая идентификация трудоемка и длительна и в большинстве практических лабораторий она сведена до минимума. Совершенно резонно ставится вопрос о создании «универсальных» сред, обеспечивающих диагностику, хотя бы сигнальную, основных возбудителей кишечных инфекций, тем более, если речь идет только о дизентерийной группе. И такие попытки предпринимались издавна, хотя, как правило, были основаны не на диагностике искомого патогена, а на исключении сопутствующей микрофлоры, при исследовании испражнений — преимущественно бактерий группы кишечных палочек. Первой такой попыткой была среда Russel и Washington [11], положившая начало обширному семейству сред по принципу «столбик—скошенная поверхность», в которой учитывали сбраживание глюкозы и лактозы. В отдельных комбинациях добавляли ферментацию сахарозы [11], продукцию сероводорода [10], разложение мочевины [5, 13]. Комбинация этих тестов — ферментации глюкозы, лактозы, сахарозы, продукции сероводорода и уреазы привела к созданию за рубежом среды TSI (three sugar iron) [9], а в СССР — сред Олькеницкого [3] и ДУКС [2]. Преимущество последней перед средой Олькеницкого, отмеченное в руководстве «Энтеробактерии» [4], заключается в двуслойности среды, допускающей устранение интерференции, возникающей в среде Олькеницкого, между продукцией сероводорода или уреазной активностью и ферментацией углеводов. Это расширяет возможности сигнального определения не только шигелл, но и сальмонелл, что в среде Олькеницкого невозможно. Двуслойность среды была первоначально принята и Russel и Washington [11] и Stroup [13] в случаях, когда необходимо избежать маскировки сероводородом и разложением мочевины ферментацией углеводов. Однако и среда Олькеницкого и среда ДУКС не в со-

стоянии исключить по набору принятых в них ограниченных ключевых тестов аналогов шигелл. Это вызвало необходимость разработки метода, также основанного на использовании отрицательных свойств шигелл, но их набор позволяет четко отдифференцировать шигеллы от других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, а также и от многих представителей других семейств.

Материалы и методы. Шигеллы характеризуются в основном отрицательными морфологическими, культуральными и биохимическими признаками. Ключевые отрицательные признаки делятся на 3 группы: 1-я — положительные результаты характеризуются образованием кислых продуктов метаболизма; 2-я — продукты метаболизма вызывают ощелачивание среды; 3-я — конечные результаты не связаны с изменениями реакции среды (продукция сероводорода и подвижность или ее отсутствие). Все эти признаки можно определять в двух средах: на чашке признаки 1-й группы (среда Ш-2), и пробирке — 2-й и 3-й группы (среда Ш-3). Идентификация проводится синхронно, что ускоряет этот процесс. Анализ завершается агглютинацией на стекле поливалентной сывороткой, затем проводится по схеме.

Состав сред¹. Среда Ш-2: пептона 0,5 г; дрожжевого экстракта жидкого 2,2 мл; лактозы и ксилозы по 1 г; K_2HPO_4 0,05 г; KH_2PO_4 0,02 г; 1,6 % щелочного раствора бромтимолового синего 1 мл; агара 1,5 г; воды 100 мл. После стерилизации при 0,5 атм в течение 15 мин, разлить в чашки по 17—20 мл.

Среда Ш-3: пептона 0,2 г; дрожжевого экстракта жидкого 2,2 мл; глюкозы 0,02 г; тиосульфата натрия 0,01 г; KH_2PO_4 0,1 г; $NaCl$ 0,5 г; агара 0,3 г; щелочного раствора фенолсвого красного 0,1 мл; 0,01 % водного раствора кристаллического фиолетового 2 мл; воды 100 мл. После стерилизации при 0,5 атм в течение 15 мин (можно простым кипячением) прибавить 2 мл 50 % водного раствора мочевины (самостерилизуется при

хранении при комнатной температуре в течение 2—3 сут), разлить в пробирки по 5—7 мл, остудить в вертикальном положении в виде столбиков. Полоски фильтровальной бумаги пропитать насыщенным раствором уксуснокислого свинца.

Ход исследования. Подозрительные колонии с первичных сред (Эндо, ЭМС и др.) засевают уколом до дна пробирки в среду Ш-3, той же петлей — в виде газона на сектор среды Ш-2 (не более 6—8 секторов на чашке). Между стенкой и пробкой среды Ш-3 помещают реактивную бумажку на H_2S . Инкубация в течение 16—20 ч при 37 °С.

Результаты и обсуждение. Оптимальность выбранных тестов системы Ш-2/Ш-3 подтверждается характеристикой различных факультативно-анаэробных грамотрицательных бактерий семейства *Enterobacteriaceae* [6, 7] и других семейств [6]. Сопоставляя поведение всех видов этих семейств по 6 выбранным свойствам (см. таблицу), легко убедиться, что в подавляющем большинстве сравниваемые таксоны отличаются от отрицательных по всем этим тестам шигелл — 70 (95,9 %) из 73 сравниваемых видов, а если учитывать наличие двух положительных тестов и больше, то такими свойствами обладают 55 (78,1 %) из 73 видов, причем отдельно по семейству энтеробактерий, виды которого наиболее вероятные адьюванты шигелл в кишечнике человека, — 42 (85,7 %) из 49 сравниваемых видов. Если учесть, что даже по 3—5 признакам представители этого семейства дифференцируются от шигелл (26 видов из 49, 53,1 %), то надежность системы очевидна. Лишь 3 (4,1 %) вида из сравниваемых 73 — *E. ictaluri*, *T. phtyseos* и *P. haemolytica* — могут симулировать шигеллы. Но поскольку первый характеризуется замедленным ростом, первые признаки появляются лишь на 2—3-е сутки и в системе Ш-2/Ш-3, в которой результаты учитываются не позже 18—20 ч инкубации при 37 °С, этот вид не нарушает систему. *P. haemolytica* биовар Т — редкий вид, был выделен у ягненка при септицемии и к человеку не имеет отношения. Сложнее с *T. phtyseos*,

¹ Цифры 2 и 3 соответствуют этапам исследования (при последовательном применении). Первым этапом считаются плотные ограниченно-селективные среды (Эндо и др.).

Дифференциальные признаки бактерий семейства кишечных и некоторых других на (в) средах Ш-2 и Ш-3

Микроорганизмы		Среда Ш-2		Среда Ш-3			
род	вид	лак	кси	H ₂ S	урѳ	цит	подв
Shigella	Все виды	0	0	0	0	0	0
Cedecia	davisiae	0	+	0	0	+	+
	lapagei	0	0	0	0	+	+
Citrobacter	freundii	0	+	+	0	+	+
	amalonaticus, diversus	0	+	0	+	+	+
Edwardsiella	hoshinae, tarda biogroup 1	0	0	0	0	+	+
	tarda	0	0	+	0	+	+
	ictaluri	0	0	0	0	0	0
Enterobacter	agglomerans	0	+	0	0	+	+
	cloacae, aerogenes, sakazakii, intermedium	+	+	0	0	+	+
	gergoviae	+	+	0	+	+	+
Escherichia	coli inactiv, blatte	0	+	0	0	0	0
	coli	+	0	0	0	0	+
Hafnia	alvei	0	+	0	0	0	+
Klebsiella	pneumoniae, oxytoca	+	+	0	+	+	0
Kluyvera	ascorbata, cryocrescens	+	+	0	0	+	0
Morganella	morganii	0	0	0	+	+	+
Proteus	vulgaris	0	+	+	+	0	+
	mirabilis	0	+	+	+	+	+
	myxofaciens	0	0	0	+	0	+
Providencia	rettgeri	0	0	0	+	+	+
	stuartii, alcalifaciens	0	0	0	0	+	+
Rahnella	aquatilis	+	+	0	0	+	0
Salmonella	I, II, III, IV	0	+	+	0	+	+
	gallinarum	0	0	+	0	0	0
	pullorum	0	+	+	0	0	0
	choleraesuis	0	+	0	0	+	+
	typhi	0	+	+	0	0	+
	paratyphi A	0	0	0	0	0	+
Serratia	marcescens	0	0	0	0	+	+
	plymuthica	+	+	0	0	0	0
	ficaria, rubidaea	0	+	0	0	+	+
	fanticula, odorifera	+	+	0	0	+	+
Tatumella	ptyseos	0	0	0	0	0	0
Yersinia	enterocolitica	0	0	0	+	0	0
	ruckeri	0	0	0	0	+	+
	Остальные 5 видов	0	+	0	+	0	0
Vibrio ¹	cholerae (eltor), metchnikovii, campbelli	0	0	0	0	0	+
	harveyi, parahaemolyticus, alginolyticus, vulnificus, fluvialis, anguillarum	0	0	0	0	+	+
Aeromonas	hydrophila, sobria	0	0	+	0	0	+
	caviae	0	0	0	0	0	+
Plesiomones	shigelloides	0	0	0	0	0	+
Pastereurella	haemolytica biovar T	0	0	0	0	0	0
	haemolytica biovar A	0	+	0	0	0	0
	gallinarum	0	0	+	0	0	0
	multocida	0	+	+	0	0	0
	ureae	0	0	0	+	0	0
	pneumotropica	0	0	+	+	0	0
	aerogenes	0	+	+	+	0	0
Actinobacillus	actinomycetemcomitans	0	0	0	+	0	0
	equinii, suis, capsulatum	+	+	0	+	0	0
	ligneriesi	+	+	+	+	0	0

Примечание. лак — ферментация лактозы; кси — ферментация ксилозы, уре — уреазная активность; цит — утилизация цитрата в присутствии органического азота; подв — активная подвижность.

¹ В род Vibrio включены виды, которые могут быть обнаружены в фекалиях человека, сапротрофы, паразиты, патогены [7].

потенциальным патогеном для человека, обнаруживаемым в верхних дыхательных путях человека и в крови. Однако этот вид — не частный колонизатор человеческого организма, дан-

ных о его обнаружении в кишечнике человека нет, и вряд ли он может сколько-нибудь существенно осложнить диагностику шигелл системой Ш-2/Ш-3. К грамотрицательным факультатив-

ным анаэробам относятся роды, не входящие в какое-либо семейство — *Chromobacterium*, *Cardiabacterium*, *Calymmatobacterium*, *Eikenella*, *Streptobacillus*. Эти виды сапротрофы, но потенциально патогенные для человека. Они аналоги шигелл по 6 признакам, но *Chromobacterium violaceum* характеризуется глубоким фиолетовым пигментом, сразу изобличающим его на поверхности плотной среды. Остальные перечисленные роды требовательны к пищевым ресурсам и не растут на средах типа Эндо, ЭМС и др., с которых снимают подозрительные на шигеллы колонии.

Обширная группа неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов (НФГОМ), начиная с псевдомонад и кончая строгими паразитами человека — моракселлами и патогенными нейссериями, исключается из сравнительной оценки с шигеллами основным признаком — полным отсутствием роста в глубине среды Ш-3 при резко выраженном росте на поверхности среды, часто сопровождающемся сильным ощелачиванием даже при отсутствии у штамма уреазной активности и утилизации цитрата натрия. Наиболее часто встречающийся в кишечнике человека представитель НФГОМ — *P. aeruginosa* на среде Ш-2 образует интенсивный газон с характерной сине-зеленой окраской. Лабораторная проверка поведения музейных и свежесделанных штаммов наиболее часто встречающихся видов энтеробактерий и других семейств показала надежность системы и позволяет рекомендовать ее для широкой проверки практическими лабораториями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Инструкция о порядке расследования, учета и проведения лабораторных исследований в учреждениях санитарно-эпидемиологической службы при пищевых отравлениях.— М., 1975.
2. Калина Г. П. // Журн. микробиол.— 1978.— № 9.— С. 77—81.
3. Олькеницкий И. С. // Лаб. дело.— 1958.— № 5.— С. 40.
4. Энтеробактерии: Руководство / Под ред. В. И. Покровского.— М., 1985.
5. Bader R., Hotz G. // Z. Hyg. Infekt.— Kr.— 1951.— Bd 33.— S. 20—25.

6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.— Baltimore, 1984.— Vol. 1.
7. Edwards P., Ewing W. Identification of Enterobacteriaceae.— 3rd Ed.— Minneapolis, 1972.
8. Hajna A. // J. Bact.— 1945.— Vol. 49.— P. 516—517.
9. Kligler J. // Amer. J. publ. Hlth.— 1917.— Vol. 7.— P. 1042—1044.
10. Krumquiede Ch., Kohn L. // J. med. Res.— 1917.— Vol. 37.— P. 225—227.
11. Russel F., Washington D. // Ibid.— 1911.— Vol. 25.— P. 217—220.
12. Singer J. // Amer. J. clin. Path.— 1950.— Vol. 20.— P. 880—883.
13. Stroup J. // J. Ass. Off. analyt. Chem.— 1972.— Vol. 55.— P. 214—218.

Поступила 14.02.89

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.34-022.7-036.11-02-078

Е. И. Хубка, П. И. Яровой, Т. П. Калининская, В. Ф. Болога, М. Л. Станку, В. Д. Раку, М. Я. Няга

ЭТИОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Молдавский НИИ профилактической и клинической медицины, Кишинев

Знание этиологической природы острых кишечных заболеваний (ОКЗ) — важная основа, определяющая проведение целенаправленных мер борьбы с ними. Однако уровень нерасшифрованных заболеваний как у нас в стране, так и в республике довольно велик. Одной из причин является недооценка роли условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) в этиологии ОКЗ. Имеются сведения о том, что представители этой группы микроорганизмов (протей, клебсиелла, цитробактер и др.) вызывают не только спорадические заболевания, но и вспышки [1—3].

Систематическое наблюдение за этими микроорганизмами как возбудителями ОКЗ не проводится. Остаются неустановленными уровень и характер распространения указанных заболеваний. В то же время факт обнаружения условно-патогенных энтеробактерий у больных нельзя считать абсолютным доказательством их этиологической значимости, так как они являются составной частью нормальной микро-