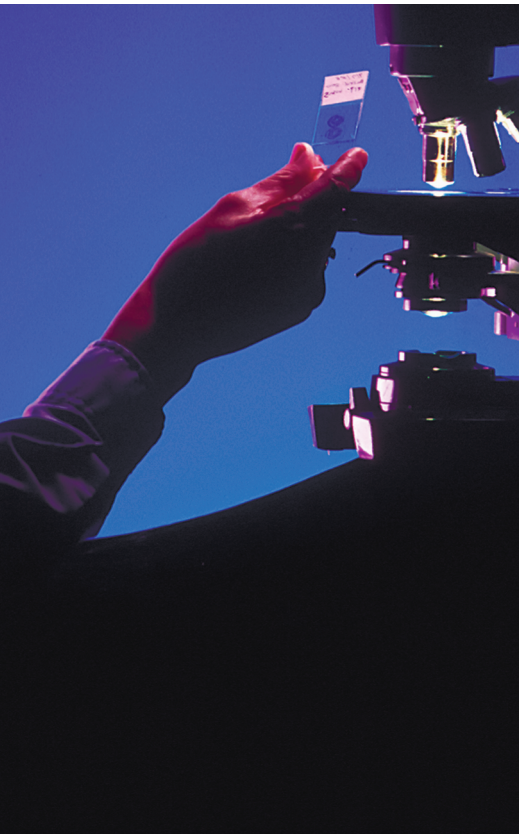


ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
Федеральное казённое учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный
институт Сибири и Дальнего Востока»

**РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ,
ЭНТЕРОПАТОГЕННЫХ ИЕРСИНИОЗОВ (ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА
И КИШЕЧНОГО ИЕРСЕНИОЗА) И ПАСТЕРЕЛЛЁЗА**



УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
ДЛЯ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ

ИРКУТСК – 2022

Федеральная служба по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека
Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Иркутский ордена Трудового Красного Знамени
научно-исследовательский противочумный институт
Сибири и Дальнего Востока»

**РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ,
ЭНТЕРОПАТОГЕННЫХ ИЕРСИНИОЗОВ
(ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА И КИШЕЧНОГО
ИЕРСИНИОЗА) И ПАСТЕРЕЛЛЁЗА**

**Учебно-методическое пособие
для врачей-бактериологов**

Иркутск – 2022

УДК 616.993-079.4

ББК 53.4:55.146

Р85

Руководство к практическим занятиям по дифференциальной диагностике возбудителей чумы, энтеропатогенных иерсениозов (псевдотуберкулеза и кишечного иерсениоза) и пастереллёза: учебно-методическое пособие для врачей-бактериологов. – Иркутск: ИНЦХТ, 2022 – 40 с.

ISBN 978-5-98277-362-3

Утверждено Ученым советом
ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора»

Руководство разработано в соответствии с программой «Бактериология. Основы безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I–II групп», утвержденной Руководителем Федеральной Службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Основное его назначение – рациональная организация практических занятий, позволяющая повысить эффективность обучения слушателей при изучении раздела «Чума». Учебный материал рассчитан на 22 часа, включает изучение биологических свойств возбудителей чумы, энтеропатогенных иерсениозов, пастереллёза и методики проведения дифференциальной диагностики между указанными возбудителями. В пособии представлена сводная таблица дифференциальных тестов для обеспечения постановки адекватного лабораторного диагноза.

К каждому занятию предлагается план-задание и перечень необходимых материалов и оборудования. В приложении представлены рецептуры основных сред и описания методик, применяемых при изучении биологических свойств возбудителей чумы, энтеропатогенных иерсениозов и пастереллёза.

Учебно-методическое пособие предназначено для обучения врачей-бактериологов (биологов) и лаборантов на курсах профессиональной переподготовки и повышения квалификации по ООИ, а также может быть использовано специалистами, занимающимися лабораторной диагностикой возбудителей чумы, энтеропатогенных иерсениозов и пастереллёза.

Авторы:

*Т.М. Долгова, Т.Ю. Загоскина, О.В. Гаврилова, О.Б. Колесникова,
В.Ю. Колесникова, С.В. Балахонов*

ISBN 978-5-98277-362-3



© Коллектив авторов, 2022

© ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский
противочумный институт Роспотребнадзора, 2022

© Оформление ИНЦХТ, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений	4
Чума	6
Энтеропатогенные иерсиниозы (возбудители псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза)	10
Пастереллёз	13
Занятие 1	19
Занятие 2	20
Занятие 3	21
Занятие 4	22
Занятие 5	22
Приложение	23
Среды	23
Методы	33
Литература	38

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Г + Ц – процентное содержание гуанина и цитозина в нуклеотиде ДНК

п/к – подкожно

ПА – питательный агар

ПБ – питательный бульон

ФР – физиологический раствор

ЦДС – цветная дифференциальная среда

СИБ – система индикаторных бумажек

Инфекционные заболевания: чума, псевдотуберкулез, кишечный иерсиниоз и пастереллёз относятся к зоонозам с природной очаговостью. Заболевания распространены повсеместно как в нашей стране, так и за рубежом.

Микроорганизмы имеют общий круг носителей, относящихся к диким и синантропным животным, не исключена возможность выделения из клещей и блох. Дифференциальная диагностика возбудителей псевдотуберкулеза, кишечного иерсиниоза и пастереллёза от чумы при лабораторном исследовании, особенно полевого материала, представляет определенную трудность, связанную со схожими культуральными, морфологическими признаками и способностью переходить в шероховатую (R) форму. Это объясняется родственной близостью возбудителей псевдотуберкулеза, кишечного иерсиниоза и чумы, являющихся представителями одного и того же рода *Yersinia*.

Возбудители пастереллёза по многим признакам близки к представителям рода *Yersinia* (Г+Ц 36–43 мол.%), они могут переходить в шероховатую форму, кроме того, могут являться причиной гибели грызунов с развитием патологоанатомической картины, аналогичной при гибели животного от чумы.

ЧУМА

Чума – острая инфекционная болезнь, протекающая с выраженной интоксикацией, лихорадкой и характеризующаяся поражением лимфатических узлов, кожи, легких и других внутренних органов, часто с развитием сепсиса.

Возбудитель чумы – *Y. pestis* – полиморфная овоидная грамотрицательная палочка длиной 1–2 мкм, толщиной 0,3–0,7 мкм, с закругленными концами и утолщенной серединой (рис. 1).

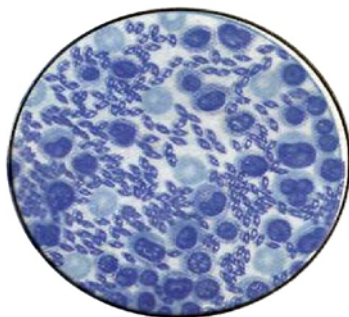


Рис. 1. Возбудитель чумы в гное из бубона.

В мазках с плотной питательной среды палочки могут быть удлинёнными, нитевидными; описаны также фильтрующиеся формы. При затяжном заболевании в мазках из бубона и органов больного возбудитель чумы может принимать форму шаров различной величины и теней. В мазках-отпечатках из тканей и органов, а также в мазках из бульонных культур окрашивается биполярно (более интенсивно на концах клетки). Биполярность ярче выявляется при окраске метиленовой синькой Леффлера.

Возбудитель чумы не имеет жгутиков и спор. Капсулу образует в организме теплокровных животных и людей, кровяном и сывороточном агаре при температуре 37 °С.

Чумной микроб – облигатный паразит с факультативным анаэробным типом дыхания, относится к природным ауксотрофам. Помимо источника энергии нуждается в дополнительных факторах роста – аминокислотах и витаминах. Для роста при 28 °С необходимы фенилаланин, валин, метионин, изолейцин и глицин или треонин; при 37 °С – биотин, тиамин, глютаминовая кислота и пантотенат. Штаммы из разных очагов чумы,

как правило, имеют неодинаковые потребности в факторах роста, что находит отражение в схеме внутривидовой таксономии чумного микроба.

Для культивирования возбудителя требуются питательные среды с глубоким расщеплением белка. Лучшими по качеству являются среды, приготовленные из ферментативных гидролизатов кровяных сгустков (не требуют добавления стимуляторов и рост наблюдается при посеве 10–100 микробных клеток) и казеина, перевара Хоттингера, кислотного гидролизата рыбкостной муки.

Самые распространенные среды для изучения чумного микроба – бульон и агар Хоттингера.

Оптимальные условия выращивания – температура 28–30 °С и рН 7,0–7,2.

Чумной микроб на плотных питательных средах имеет характерную морфологию роста. При посеве бактериологической петлей через 24–48 часов инкубации представляет собой бурый «тяж» в начале штриха и отдельные шероховатые колонии в конце. Морфология колоний под микроскопом является одним из основных диагностических признаков возбудителя чумы.

Через 12 ч инкубации появляются микроколонии в виде нежных прозрачных образований чаще треугольной или прямоугольной формы, напоминающих битое стекло («стадия битого стекла»).

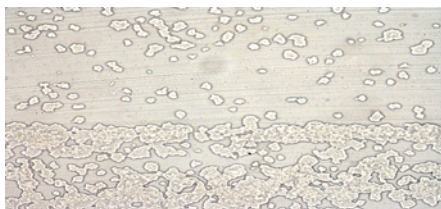


Рис. 2. «Битое стекло» (12–24 ч).

Через 18–24 ч микроколонии сливаются в плоские прозрачные образования с фестончатыми краями – «кружевные платочки» (рис. 3).

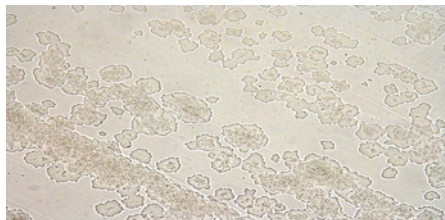


Рис. 3. «Кружевные платочки» (18–24 ч).

В дальнейшем (24–48 ч) «кружевные платочки» превращаются в зрелые колонии. Типичные зрелые колонии имеют бурый зернистый центр с постепенно уплощающейся прозрачной периферической зоной с фестончатыми краями (рис. 4).

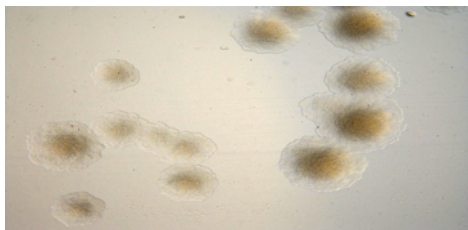


Рис. 4. Макроколонии (24–48 ч).

На скошенном агаре возбудитель чумы растет в виде сочного, серовато-белого налета, хорошо фиксированного на среде. На жидкой питательной среде (МПБ, бульон Хоттингера и др.) образует хлопьевидный или порошковидный, легко распадающийся при встряхивании осадок, в прозрачном бульоне и нежную пленку – на поверхности.

Бактерии чумы выделяются в R-форме, которая является вирулентной. Однако они относительно легко могут диссоциировать под влиянием ряда факторов (например, под действием фага) и через O-форму переходить в S-авирулентную форму.

Возбудитель чумы имеет признаки, характерные для представителей семейства *Enterobacteriaceae*, но, несмотря на это, он выделен в самостоятельное семейство *Yersiniaceae*. Возбудитель обладает каталазной активностью и не обладает оксидазной. Проявляет выраженную ферментативную активность по отношению к различным моно-, ди-, трисахаридам и спиртам. Он расщепляет на 1–3 сутки глюкозу, маннозу, маннит, мальтозу, эскулин до кислоты без газа. Не ферментирует лактозу, сахарозу, сорбит, инозит, дульцит, мочевины. Отношение к глицерину, салицину, арабинозе, рамнозе и мелибиозе переменное. Не образует индол, сероводород, ацетилметилкарбинол. Дает положительную реакцию с метиловым красным. Протеолитические свойства выражены слабо: он не разжижает желатин и не свертывает молоко. Основные ферментативные свойства возбудителей чумы представлены в таблице 1.

Таблица 1

Основные ферментативные свойства возбудителей чумы

Тест										
Глюкоза	Глицерин	Мочевина	Рамноза	Сахароза	Маннит	Мальтоза	Арабиноза	H ₂ S	Реакция Фогес-Проскауэра	Желатина
+	±	-	±	-	+	+	±	-	-	-

Обозначения: «+» – расщепление; «-» – отсутствие расщепления; «±» – возможны варианты расщепления.

ЭНТЕРОПАТОГЕННЫЕ ИЕРСИНИОЗЫ (ВОЗБУДИТЕЛИ ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА И КИШЕЧНОГО ИЕРСИНИОЗА)

Под термином «иерсиниозы» объединены две зоонозные инфекционные болезни: кишечный иерсиниоз и псевдотуберкулез, вызываемые возбудителями рода *Yersinia*, которые имеют общие черты как в патогенезе и клинической картине, так и в организации мер борьбы с ними.

Иерсиниозы – острые инфекционные болезни, характеризующиеся полиморфизмом клинических проявлений, поражением желудочно-кишечного тракта, опорно-двигательного аппарата, печени и других органов, общей интоксикацией, часто рецидивирующим и затяжным течением.

Заражение иерсиниями человека, как правило, происходит алиментарным путем и наиболее часто приводит к поражению желудочно-кишечного тракта.

Возбудитель псевдотуберкулеза – *Y. pseudotuberculosis*, возбудитель кишечного иерсиниоза – *Y. enterocolitica*.

Оба вида очень сходны между собой по морфологическим и культуральным свойствам. Это грамотрицательные факультативно анаэробные, аспорогенные палочки размером $1,5-1,8 \times 0,5-1,0$ мкм с закругленными концами (рис. 5 и рис. 6).

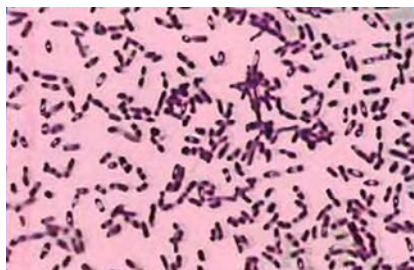


Рис. 5. Мазок из чистой культуры *Y. pseudotuberculosis*. Окраска метиленовым синим.

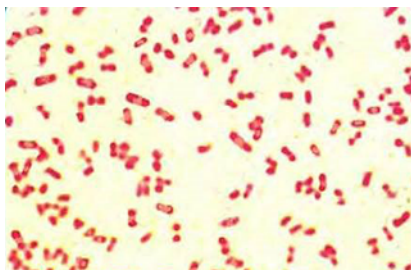


Рис. 6. Мазок из чистой культуры *Y. enterocolitica*. Окраска по Граму.

Размеры клеток зависят от условий культивирования. Культура, выращенная при температуре 37°C , имеет вид коротких кокковидных палочек, а выращенная при $22-25^{\circ}\text{C}$ – более крупных цилиндрической формы палочек.

В мазках из культур, выращенных на жидких питательных средах при температуре 18–22 °С, клетки располагаются по одиночке или парами, а при 37 °С – цепочками.

В мазках-отпечатках из органов животных или человека клетки часто окрашиваются биполярно и располагаются поодиночке, парами или в виде отдельных скоплений. Иногда вокруг клеток выявляется небольшая капсула.

Иерсинии неприхотливы и растут на обычных питательных средах, даже на голодных (голодно-кислый агар, фосфатно-буферный раствор). Оптимальные условия культивирования: температура 25–28 °С, рН 7,2–7,4.

Через 18–20 ч культивирования при оптимальных условиях на плотной питательной среде вырастают колонии диаметром 0,1–1,0 мм, выпуклые полупрозрачные, с ровным краем. Колонии могут иметь волнистый край и исчерченную поверхность.

При температуре выращивания 37–40 °С культуры могут переходить в шероховатую форму, что в большей степени характерно для возбудителя псевдотуберкулеза. У колоний появляется выпуклый бугристый, коричнево-золотистый центр и неровный утонченный край. Колонии *Y. enterocolitica* выглядят более гладкими с ровным или волнистым краем.

Часто в посеве наблюдается полиморфизм колоний по величине и различные их варианты (S, R, RS, SR). При длительном культивировании размеры колоний увеличиваются, они становятся мутными беловато-серого или коричневого цвета.

В жидких питательных средах шероховатые культуры растут в виде хлопьевидного осадка на дне, оставляя бульон прозрачным. Гладкие культуры растут в виде равномерной мути. При старении культуры появляется осадок на дне и пристеночное кольцо на поверхности бульона, которое, утолщаясь, превращается в пленку.

Оба микроорганизма имеют широкий спектр биохимической активности. Они ферментируют до кислоты без газа глюкозу, галактозу, маннозу, мальтозу, маннит, ксилозу, трегалозу. Не ферментируют лактозу, раффинозу, дульцит. Обладают способностью восстанавливать нитраты в нитриты. Большинство штаммов продуцируют сероводород. Дают положительную реакцию с метиловым красным. Продуцируют каталазу. Не образуют оксидазу, фенилаланиндезаминазу, лизиндекарбоксилазу. Не обладают фибринолитической, протеолитической и плазмокоагулирующей активностью. Не образуют индол. Не продуцируют ацетилметилкарбинола. Подвижны при температуре 18–22 °С, причем клетки *Y. enterocolitica* более подвижны и находятся в меньшей зависимости от температуры культивирования.

Для дифференциации видов необходимо проверить отношение к рамнозе, сахарозе, целлобиозе, сорбиту и поставить реакцию Фогес–Проскауэра при 22–25 °С.

Основные биохимические тесты дифференциации *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* представлены в таблице 2.

Таблица 2

**Основные биохимические тесты дифференциации
Y. Enterocolitica и *Y. pseudotuberculosis***

Субстрат или тест	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i> биовары				
		1	2	3	4	5
Рамноза	+	–	–	–	–	–
Сахароза	–	+	+	+	+	+*
Целлобиоза	–	+	+	+	+	–
Сорбит	–	+	+	+	+	–
Реакция Фогес–Проскауэра при 22–25 °С	–	+	+	+	+	+

Примечание: * – положительная реакция у 26–75 % штаммов.

По биохимическим свойствам возбудители псевдотуберкулеза обладают выраженной однородностью по сравнению с возбудителями кишечного иерсиниоза, которые по отношению к комплексу биохимических тестов (трегалоза, ксилоза, салицин) и образованию индола разделены на 5 биоваров. В свою очередь, биовар 1 также неоднороден и делится на две подгруппы: 1А и 1В. Выраженными патогенными свойствами обладают биовары: 1В, 2, 3, 4, 5. Из них наиболее опасными для людей являются 4, 3 и реже 2 биовары.

ПАСТЕРЕЛЛЁЗ

Пастереллёз – характеризуется септическими явлениями и геморрагическими воспалительными процессами слизистых оболочек дыхательных путей и кишечника, воспалением легких и плевры, а также отеками. Возбудители паразитируют в носоглотке многих видов теплокровных животных и при неблагоприятных условиях (обычно на фоне стресса) способны вызывать у них тяжело протекающие заболевания с летальным исходом. Заражение человека происходит после укусов или царапин, нанесенных животными; возможен алиментарный и трансмиссивный (блохи, слепни, комары) путь заражения. Случаев заражения человека от человека не наблюдается.

Возбудители пастереллёза – бактерии семейства *Pasteurellaceae*, рода *Pasteurella*.

Род включает более 20 видов. Типовой вид – *P. multocida*, имеющий подвиды: *multocida*, *septic*, *gallicida* и 4 серотипа (А, В, D и E); некоторые из них имеют подтипы. Антигенная структура и серологические типы пастерелл окончательно не изучены, но установлено, что они имеют капсульный, соматический и др. антигены. *P. multocida* способна вызывать у жвачных животных геморрагическую септицемию, а так же заболевания, известные как транспортная лихорадка и куриная холера, этот вид является основным патогенным видом для человека.

Представители рода грамотрицательные, хемоорганотрофные, факультативно-анаэробные, аспорогенные бактерии, обладающие выраженной капсулой. Размеры клеток 0,3–1,4 × 0,25–0,45 мкм. В мазках из одно-двухсуточных агаровых культур пастереллы имеют вид палочек с утолщенной серединой и закругленными концами или коккобактерий, расположенных поодиночке или парами. При окраске по Романовскому-Гимзе или метиленовым синим клетки имеют вид биполяров (особенно в препаратах из инфицированных тканей) (рис. 7).

В мазках из жидких питательных сред палочки более длинные и часто расположены цепочками. Для старых культур характерен выраженный полиморфизм.

Бактерии растут на обычных питательных средах (МПБ, МПА), но лучше на средах с глубоким расщеплением белка. Добавление

к средам 1%-й глюкозы, 0,5%-го сульфита натрия или 3–5%-й гемолизированной крови значительно улучшает их качество. В связи с этим на этапе выделения культуры рекомендуется использовать кровяные или сывороточные среды. На плотных питательных средах через 24 ч культивирования при оптимальных условиях: температура 36–38 °С, рН 7,2–7,4 появляются мелкие (0,5–1,0 мм), слизистые, круглые, прозрачные, голубоватые, слегка выпуклые колонии с ровными краями (S-форма). Через сутки они становятся более крупными, выпуклыми, белесовато-серыми. При боковом освещении выявляется «радужность». Встречаются также шероховатые, бескапсульные (R) формы пастерелл. R-форма чаще выявляется при старении культур и очень редко у свежeweделенных штаммов. Колонии в R-форме непрозрачные, с неровными краями, вросшие в агар и поэтому трудно снимающиеся петлей. Различают еще мукоидные (M) формы. Эти колонии значительно крупнее, непрозрачные, слизистые, серовато-белые с ровными краями. На жидких питательных средах через сутки рост культуры выглядит в виде легкой равномерной мути и иногда осадка. Для многосуточного роста культуры в S-форме характерно образование на дне пробирки слизистого осадка, поднимающегося при встряхивании в виде не разбивающейся косички. Рост в бульоне культуры пастерелл в R-форме ничем не отличается от роста R-форм других бактерий. Для культуры пастерелл, выделяемой в первой генерации, характерен замедленный рост на плотной питательной среде (2–5 сут).

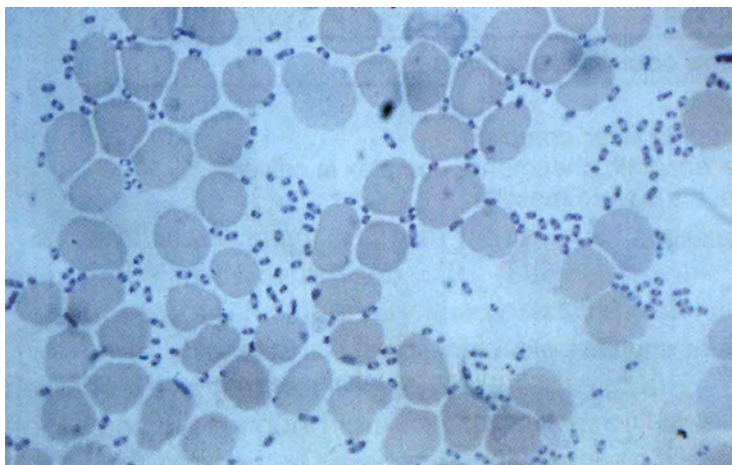


Рис. 7. *P. multocida*. Мазок из патологического материала. Окраска метиленовым синим.

Биохимические свойства пастерелл выражены слабо. Штаммы обладают широкой вариабельностью. При изучении ферментативной активности рекомендуют использовать плотные питательные среды, позволяющие получить более стабильные результаты. Большинство штаммов дают положительные каталазный и оксидазный тесты. Они сбраживают без образования газа глюкозу, сахарозу, сорбит, маннит, не сбраживают лактозу и дульцит, образуют индол и сероводород, обладают орнитиндекарбоксилазной активностью, восстанавливают нитраты в нитриты, не ферментируют мочевины, не обладают гемолизирующей активностью, не разжижают желатин, не обладают коагулазной и фибринолитической активностью. Факторами патогенности являются: капсулообразование, эндотоксин, наружные мембранные белки, Fe^{2+} 3^{+} -связывающие системы, продукция нейраминидазы.

Основные биологические свойства *P. multocida* представлены в таблице 3.

Таблица 3

Основные биологические свойства *P. multocida*

Вид возбудителя	Оксидаза	Подвижность	Ферментация								Гемолиз	Уреаза	Индол	Сероводород	Реакция Фогес-Проскауэра	Реакция с метиловым красным
			глюкозы	лактозы	сахарозы	маннита	рамнозы	глицерина	сапцина	сорбита						
<i>P. multocida</i>	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-

Кроме *P. multocida*, опасными для человека видами являются *P. pneumotropica* и *P. haemolytica*. Признаки, дифференцирующие основные патогенные для человека виды, представлены в таблице 4.

Таблица 4

Дифференциальные признаки основных патогенных для человека видов *Pasteurella*

Тест или субстрат	<i>P. multocida</i>			<i>P. pneumotropica</i>	<i>P. haemolytica</i>
	<i>multocida</i>	<i>septica</i>	<i>gallicida</i>		
Оксидаза	+	+	+	+	+
Индол	+	±	+	+	-

Уреаза	–	–	–	+	–
Образование H ₂ S	+	+	+	+	±
Орнитин декарбоксилаза	+	±	+	±	±
Ферментация					
сорбита	–	+	+	–	+
маннита	+	±	+	–	±
трегалозы	+	±	–	+	±
ксилозы	+	±	+	±	+
лактозы	–	–	–	±	±
Гемолиз*	–	–	–	–	+
Рост на агаре Мак Конки	±	±	±	–	+

Примечание: * – на агаре с овечьей кровью.

Большинство свежевыделенных штаммов патогенны для лабораторных животных (белых мышей, морских свинок, белых крыс, кроликов) и голубей. При подкожном введении 0,5 мл бульонной культуры белые мыши чаще погибают на 1–2 сут, реже – на 3–4 сут.

Характерной особенностью пастерелл является медленный рост на питательных средах из первой генерации (2–5 сут), их слабая жизнеспособность на искусственных питательных средах при доступе кислорода и затхлый запах плесени, исходящий от колоний.

Хранить пастереллы рекомендуют в 1%-й пептонной воде под слоем вазелинового масла при температуре 22 ± 1 °С.

Пастереллы чувствительны к тетрациклинам, аминогликозидам, левомицетину. Они не очень устойчивы во внешней среде (в земле микроб сохраняется не более 3–4 дней), особенно чувствительны к высушиванию, солнечному свету и температуре выше 50 °С, при которой быстро погибают. Действие 1%-го раствора карболовой кислоты и 0,1%-го раствора формалина так же приводит к быстрой гибели микроорганизма. Сводная таблица 5 дифференциальных тестов позволит правильно поставить лабораторный диагноз.

Таблица 5

Сводная таблица дифференциальных тестов

Субстрат или тест	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>P. multocida</i>
Каталаза	+	+	+	+
Оксидаза	-	-	-	+
Ферментация:				
глюкозы	+	+	+	+
лактозы	-	-	-	- (+)
сахарозы	-	-	+	+
рамноза	-/+	+	-	-/+
глицерина	+/-	+	+	-/+
сорбита	+/-	-	+	+
маннита	+	+	+	+
Подвижность				
при 25 °С	-	+	+	-
при 37 °С	-	-	-	-
Уреаза	-	+	+	-
Индол	-	-	-/+	+
Сероводород	-	-	-	+
Фибринолизин плазмокоагулазная активность	+	-	-	-
Восстанавливают нитраты в нитриты	+	+	+	+
Реакция с метиловым красным	+/-	+	+	-
Рост на среде с генцианвиолетом (1 : 200 000)	+	+	+	+

Гидролиз желатина	–	–	–	–
Гибель биопробных животных (п/к заражение белых мышей)	5–6 сут	–	–	2–3 сут
Лизабельность чумным фагом Покровской в ДРТ	+	–/+	–	–
Лизабельность фагом Лариной Л-413С	+	–	–	–
Лизабельность псевдотуберкулезным фагом в ДРТ	+	+	–	–
Запах, исходящий от культуры	–	–	–	затхлой плесени
Видимый рост на ПА	2 сут	1 сут	1 сут	2–5 сут

Условные обозначения: «+» – замедленная реакция, «–/+» – большинство культур негативны, «+/-» – большинство культур позитивны.

При исследовании полевого материала самую большую трудность представляет работа, связанная с дифференциацией возбудителя чумы и возбудителя псевдотуберкулеза. В схему дифференциальной диагностики входит ряд дополнительных исследований, которые более подробно представлены в руководстве к практическим занятиям по лабораторной диагностике чумы [4].

ЗАНЯТИЕ 1 (6 ч)

1. Морфологические, культуральные и биохимические свойства *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *P. multocida*

1.1. Изучить характер роста культур на скошенном агаре.

1.2. Изучить морфологию микробов в мазках, приготовленных из агаровых культур, окрашенных по Граму и синькой Леффлера (прил. 2.1.).

1.3. Изучить морфологию микробов в мазках-отпечатках органов грызунов.

1.4. Поставить тест на оксидазу, используя СИБ (прил. 2.4.).

1.5. Поставить тест на каталазу (прил. 2.5.).

1.6. Поставить пробу с 3% КОН (прил. 2.3.).

1.7. Посеять каждую культуру на 2 чашки питательного агара (ПА), 2 чашки агара с генцианвиолетом (прил. 1.10.), в пробирки с 0,3% питательным агаром (прил. 1.15.), средами Гисса с глюкозой, лактозой, сахарозой, глицерином, рамнозой, арабинозой, маннитом, мальтозой (прил. 1.13.), со средой Кристенсена (прил. 1.16.), цветной дифференциальной средой (ЦДС) (прил. 1.14.), в питательный бульон (ПБ) – 5 мл, бульон Кларка (прил. 1.17.).

Материал и оборудование

2-суточная культура <i>Y. pestis</i> EV на скошенном ПА pH 7,2	1 пробирка
2-суточная культура <i>Y. pseudotuberculosis</i> на скошенном ПА pH 7,2	1 пробирка
2-суточная культура <i>Y. enterocolitica</i> на скошенном ПА pH 7,2	1 пробирка
2-суточная культура <i>P. multocida</i> на скошенном ПА pH 7,2	1 пробирка
Мазки-отпечатки органов грызуна, павшего от чумы	1 шт.
Мазки-отпечатки органов грызуна, павшего от пастереллёза	1 шт.
СИБ на оксидазу	4 шт
ПА pH 7,2	8 чашек
ПА с генцианвиолетом pH 7,2	8 чашек
ПА 0,3%-й	4 пробирки
ПБ 5 мл	4 пробирки
Среды Гисса с глюкозой, лактозой, сахарозой, арабинозой, рамнозой, глицерином, маннитом, мальтозой	4 набора
ЦДС	4 пробирки
бульон Кларка pH 6,9 1,0 мл	4 пробирки

Среда Кристенсена	4 пробирки
КОН 3%-й 0,5 мл	1 пробирка
Метиленовый синий по Леффлеру 0,5 мл	1 пробирка
Пипетка пастеровская	6 шт.
Пипетка бактериологическая 1,0 мл	1 шт.
Чашка Петри (не стерильная)	3 шт.
Стекло предметное	8 шт.
Набор для окраски по Граму	1 шт.
0,9%-й раствор натрия хлорида рН 7,2 0,5 мл	1 пробирка
Термостаты на 28 °С и 37 °С	по 1 шт.

Примечание:

- посевы на ПА и ПА с генцианвиолетом поместить в термостат при 28 °С и 37 °С;
- посевы на 0,3% ПА – в шкаф при комнатной температуре.

ЗАНЯТИЕ 2 (4 ч)

1. Морфологические, культуральные и биохимические свойства *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *P. multocida*

1.1. Изучить морфологию формирующихся колоний на ПА, ПА с генцианвиолетом.

1.2. Изучить морфологию роста культур в бульоне.

1.3. Приготовить мазки из агаровой и бульонной культур, окрасить по Граму и синькой Леффлера.

1.4. Определить подвижность на 0,3% ПА.

1.5. Отметить предварительные результаты ферментации углеводов и спиртов на средах Гисса, уреазной активности на среде Кристенсена и ЦДС (прил. 2.2.).

1.6. Поставить тест на образование сероводорода с суточными бульонными культурами (прил. 2.8.).

2. Изучение фаголизабельности

2.1. Поставить пробу на чувствительность к бактериофагам-413С, Покровской, псевдотуберкулезному методом «стерильного пятна» (прил. 2.9.).

Материал и оборудование

ПБ 8,0–10,0 мл	4 пробирки
ПА 1,5–2,0 % рН 7,2	4 чашки
Бактериофаг диагностический чумной Л-413С 0,5 мл	1 пробирка
Бактериофаг диагностический чумной Покровской разведенный до ДРТ 0,5 мл	1 пробирка
Бактериофаг псевдотуберкулезный, разведенный до ДРТ 0,5 мл	1 пробирка
Пипетка 1,0 мл	5 шт.
Набор для окраски по Граму	1 шт.
Метиленовый синий по Леффлеру 0,5 мл	1 пробирка
Бумажная полоска, пропитанная ацетатом свинца или железа	4 шт.
Стекло предметное	8 шт.
Термостат на 28 °С и 37 °С	по 1 шт.

ЗАНЯТИЕ 3 (4 ч)**1. Морфологические, культуральные и биохимические свойства *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *P. multocida***

- 1.1. Изучить морфологию 2-суточного роста культур на ПА, ПА с генцианвиолетом.
- 1.2. Изучить морфологию роста культур в бульоне через 48 ч.
- 1.3. Отметить ферментацию углеводов и спиртов на средах Гисса.
- 1.4. Поставить реакцию с метиловым красным (прил. 2.7.).

2. Изучение фаголизательности

- 2.1. Учить пробы с фагами.

Материал и оборудование

Метиловый красный 0,5 мл	1 пробирка
Пипетка 1,0 мл	1 шт.
Термостат на 28 °С и 37 °С	по 1 шт.

ЗАНЯТИЕ 4 (4 ч)

1. Морфологические, культуральные и биохимические свойства *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *P. multocida*

1.1. Изучить морфологию многосуточного роста культур на ПА, ПА с генцианвиолетом и в бульоне.

1.2. Учесть способность культур к образованию сероводорода.

1.3. Поставить тест на образование индола с культурой, выросшей в ПБ (прил. 2.6.).

Материал и оборудование

Эфир 5,0 мл	1 пробирка
Реактив Эрлиха 2,0 мл	1 пробирка
Пипетка 1,0 мл	2 шт.
Термостат 28 °С и 37 °С	по 1 шт.

ЗАНЯТИЕ 5 (4 ч)

1. Морфологические, культуральные и биохимические свойства *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *P. multocida*

1.1. Изучить многосуточный рост культур на плотных и жидких питательных средах.

1.2. Приготовить и просмотреть окрашенные по Граму мазки с агаровой и бульонной культур.

1.3. Отметить ферментацию углеводов и спиртов на средах Гисса.

1.4. Составить таблицу дифференцирующих тестов.

1.5. Сдать посевы для обеззараживания.

Материал и оборудование

Метиленовый синий по Леффлеру 0,5 мл	1 пробирка
Набор для окраски по Граму	1 шт.
Стекло предметное	8 шт.

ПРИЛОЖЕНИЕ

1. Среды

1.1. Бульон на переваре Хоттингера

Состав:

Ингредиенты	Кол-во
Перевар Хоттингера (см. ниже «Триптический перевар Хоттингера») разведенный в несколько раз дистиллированной или водопроводной водой до соломенного цвета	
Натрия хлорид	0,5 %
Двузамещенный калия фосфат	0,1 %

pH $7,5 \pm 0,1$

Кипятят 15–20 мин. Фильтруют через ватно-марлевый или бумажный фильтр, разливают во флаконы или пробирки и стерилизуют при 120 ± 1 °C 20–30 мин.

Триптический перевар Хоттингера

1 кг говяжьего мяса заливают 1000,0 мл воды. Кипятят 15–20 мин. Пропускают через мясорубку. Бульон смешивают с фаршем и сливают в бутыл. Подщелачивают 20%-м раствором питьевой соды до pH $7,9 \pm 0,1$, прибавляют дважды пропущенную через мясорубку поджелудочную железу в количестве 10 % от имеющегося объема. Вместо поджелудочной железы можно прибавить панкреатин в количестве 0,5 % и более, в зависимости от его активности. Через 1–2 ч повторно подщелачивают его до pH $7,4 \pm 0,1$. Содержимое бутылки тщательно перемешивают, добавляют хлороформ из расчета 10,0–30,0 мл на каждый литр перевара. Бутылку плотно закрывают резиновой пробкой, ставят в термостат при 37 °C на 7–10 сут и регулярно перемешивают (1-й день каждые 15–20 мин, затем через 2–3 ч). Готовый перевар прозрачный, соломенно-желтого цвета. Об окончании переваривания судят по образованию триптофана, для этого к 3–4 мл фильтрованного перевара добавляют 3–4 капли бромной воды (для приготовления бромной воды берут 100,0 мл дистиллированной воды и добавляют 3,0–3,5 мл чистого брома, хранят в склянке из темного стекла). При наличии триптофана жидкость приобретает розово-фиолетовый цвет.

Перевар фильтруют через бумажный фильтр, разливают в бутылки и стерилизуют 30 мин при температуре 120 ± 1 °С. Триптический перевар Хоттингера содержит смесь продуктов распада белков, образующихся при гидролизе мышечной ткани ферментами поджелудочной железы. Действие ферментов приводит к полному гидролизу. В результате этого образуются пептоны, представляющие собой смесь пептидов и аминокислот, которые для микроорганизмов служат основным источником азота, серы, витаминов и других веществ, необходимых для их роста.

1.2. Мясопептонный бульон на основе перевара Хоттингера

Состав:

Ингредиенты	Кол-во
Разведенный раствор Хоттингера (перевар Хоттингера, разведенный дистиллированной или водопроводной водой до соломенного цвета)	1000,0 мл
Пептон	5,0 г
Натрия хлорид	5,0 г

pH $7,3 \pm 0,1$

Ингредиенты разводят при медленном нагревании, кипятят 20 мин, фильтруют через бумажный фильтр. Разливают в пробирки или флаконы. Стерилизуют 20 мин при 120 ± 1 °С.

1.3. Агар на основе перевара Хоттингера.

В бульон Хоттингера, подогретый до температуры 50–60 °С, вносят агар-агар (9,0–11,0 г на 1000,0 мл бульона). Периодически помешивая, доводят до кипения для полного растворения агар-агара. В горячем состоянии среду фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают во флаконы или колбы, стерилизуют в автоклаве 30 мин при температуре 120 ± 1 °С. Разливают в чашки Петри или пробирки.

1.4. Сывороточный мясо-пептонный бульон.

В качестве основы используют мясо-пептонный бульон pH 7,2–7,4, к которому, соблюдая правила асептики, добавляют 10 % стерильной без консерванта сыворотки крови лошади.

1.5. Сывороточный мясо-пептонный агар.

В качестве основы используют 2,0–2,5% мясо-пептонный агар, pH 7,2–7,4, расплавленный и охлажденный до 45–50 °С, к которому,

соблюдая правила асептики, добавляют 10 % стерильной сыворотки крови лошади без консерванта. Смесь тщательно перемешивают, следя за тем, чтобы не образовывалась пена, и разливают в чашки Петри.

1.6. Сывороточный агар Хоттингера.

К бульону Хоттингера добавляют 2,0–2,5 % мелконарезанного агар-агара, после его набухания ставят на огонь и кипятят до полного растворения агара, производя постоянное помешивание, чтобы избежать пригорания.

По окончании кипячения следует восстановить объем среды добавлением горячей дистиллированной воды. После установления нужного рН, агар кипятят, дают отстояться в теплом месте, затем фильтруют в горячем состоянии через ватно-марлевый фильтр. Осадок на фильтр не выливают. Разливают во флаконы и стерилизуют 30 мин при 1 атм.

Перед употреблением к расплавленному и охлажденному до 40–45 °С агару добавляют 10 % стерильной сыворотки крови лошади и разливают в чашки Петри.

1.7. Бульон Мартена.

Состав:

Ингредиенты	Кол-во
А. Мясная вода	1 часть
Б. Основной пептон Мартена	1 часть

Смесь кипятят 10 мин, подщелачивают 10%-м раствором едкого натра до рН $8,1 \pm 0,1$, добавляют 0,5 % ацетата натрия, кипятят 5 мин, фильтруют и разливают в матрацы. Бульон Мартена стерилизуют дробно текучим паром 2 дня подряд по 40 мин.

А. Для приготовления мясной воды берут 500,0 г мясного фарша, заливают 1000,0 мл воды, кипятят 40 мин и фильтруют. Затем смешивают равные количества мясной воды и пептона Мартена.

Б. Для приготовления основного пептона Мартена тщательно очищают свиные желудки, не промывая внутренней части, нарезают на куски и пропускают через мясорубку. Полученный фарш помещают в бутылки, доливают водопроводной водой, подогретой до температуры 50 °С (на 200,0 г фарша прибавляют 1000,0 мл воды), а затем добавляют 10,0 мл концентрированной соляной кислоты. Содержимое бутылки хорошо перемешивают и ставят на сутки в термостат при температуре 45–48 °С. Первые 6–7 ч бутылку периодически встряхивают, а затем

дают жидкости отстояться. К концу 2-х суток жидкость окрашивается в интенсивно-желтый цвет и вместо крупного фарша на дне бутылки образуется небольшое количество гомогенного, похожего на желтый песок, осадка. Надосадочный слой осторожно сливают, прогревают 10 мин при температуре 80 °С для прекращения действия ферментов. Пептон Мартена стерилизуют текучим паром 30 мин, хранят в сухом прохладном месте. Используют не ранее, чем через 5 суток после приготовления.

1.8. Агар Мартена.

На 1000,0 мл бульона Мартена берут 9,0–11,0 г агар-агара и, периодически помешивая, доводят до кипения. После полного растворения агар-агара среду, не охлаждая, фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Разливают в требуемые емкости и стерилизуют в автоклаве 30 мин при температуре 120 ± 1 °С.

1.9. Питательный агар для выращивания чумного микроба, сухой.

Состав:

Ингредиенты	Кол-во
Панкреатический гидролизат казеина	15,0 г
Натрия хлорид	5,0 г
Натрия фосфат двузамещенный	1,0 г
Натрия метабисульфит	0,3 г
Агар	10,0 г
Вода дистиллированная	1000,0 мл

pH $7,2 \pm 0,1$

39,3 г порошка питательного агара размешивают в 1000,0 мл дистиллированной воды, доводят до кипения, кипятят до полного расплавления агара (2–3 мин), фильтруют через ватно-марлевый фильтр. Разливают в емкости и автоклавируют 20 мин при 121 ± 1 °С. Охлаждают до 50 °С, разливают в чашки Петри и подсушивают при комнатной температуре 40 мин.

Среда предназначена для выращивания возбудителя чумы, который через 24 ч формирует на ней типичные колонии в виде «кружевных платочков».

1.10. Среда с кровью и генцианвиолетом (по В.М. Туманскому)

Генцианвиолет используется для подавления сопутствующей микрофлоры при посеве материала контаминированного посторонней микрофлорой (кокковой, споровой патогенной и непатогенной) в концентрации 1 : 100 000–1 : 400 000 (в зависимости от активности серии краски).

Рабочий раствор генцианового фиолетового готовят из насыщенного раствора, для получения которого 1 г сухого препарата заливают 10 мл 96° спирта и оставляют на сутки при температуре 22 ± 1 °С. Затем к 99 мл дистиллированной воды добавляют 1 мл насыщенного спиртового раствора и получают спиртово-водный рабочий раствор генцианвиолета (1 : 1 000).

Для выбора доз генцианового фиолетового испытывают следующие концентрации препарата в агаре: 1 : 100 000, 1 : 150 000, 1 : 200 000, 1 : 250 000, 1 : 300 000, 1 : 400 000 для чего к 100 мл расплавленного агара (зарегистрированного или агара Хоттингера с проверенными стимуляторами роста и при необходимости витамином В₁) добавляют соответственно 1,0; 0,66; 0,5; 0,4; 0,36; 0,25 мл рабочего раствора генцианвиолета.

Для полного подавления роста грамотрицательных микробов (кишечной палочки, палочки Фридлиндера и особенно вульгарного протея) необходимо применение в 10 раз больших концентраций краски генцианового фиолетового – от 1 : 10 000 до 1 : 40 000 соответственно. При этом следует помнить, что такие концентрации препарата задерживают рост возбудителя чумы. Поэтому генциановый фиолетовый в концентрации 1 : 40 000–1 : 10 000 рекомендуют употреблять параллельно с концентрациями 1 : 400 000–1 : 100 000.

Для приготовления среды к 100,0 мл растопленного и охлажденного до 45–50 °С агара Хоттингера или Мартена рН 7,0–7,2, прибавляют 1,0 мл лизированной крови и 0,5–1,0 мл спиртоводного раствора генцианвиолета в концентрации, установленной путем предварительной проверки данной серии генцианвиолета.

1.11. Питательная среда для выделения и культивирования чумного микроба сухая (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора). Среда имеет регистрационное удостоверение Росздравнадзора РФ № ФСР 2011/11608.

Среда предназначена для выделения чумного микроба из инфицированного материала и его культивирования.

Состав:

Ингредиенты	Кол-во (грамм/литр)
Ферментативный гидролизат казеина	12,0
Ферментативный гидролизат кормовых дрожжей	1,2
Глюкоза	1,5
Натрий лимоннокислый	1,0
Танин	0,02
Калий фосфорнокислый однозамещенный	2,5
Натрий фосфорнокислый двузамещенный	7,5
Аммоний молибденовокислый	0,5
Кристаллический фиолетовый	0,0025
Агар	15,0 ± 2,0

Препарат в количестве, указанном на этикетке, размешивают в 1000,0 мл дистиллированной воды, кипятят 5 мин до полного расплавления агара, охлаждают до 45–50 °С, тщательно взбалтывают, разливают в стерильные чашки Петри, высушивают при температуре 18–22 °С в течение 1–2 ч. Готовую среду можно хранить 10–14 суток при температуре 4–10 °С.

1.12. Питательные среды для проведения микробиологических исследований фирмы «HiMedia».

Основа триптозного кровяного агара / то же с дрожжевым экстрактом M097 / M450 (Tryptose Blood Agar Base / with Yeast Extract)

Среду используют для выделения и культивирования чумного микроба, определения гемолиза.

Ингредиенты	M097 (г/л)	M450 (г/л)
Триптоза	10,00	10,00
Мясной экстракт	3,00	3,00
Дрожжевой экстракт	–	1,00
Натрия хлорид	5,00	5,00
Агар-агар	15,00	15,00
pH	7,2 ± 0,2	7,3 ± 0,2

Размешать 33,0 г порошка M097 или 34,0 г порошка M450 в 1000,0 мл дистиллированной воды. Прокипятить для полного растворения частиц.

Стерилизовать автоклавированием при давлении 1,06 кгс/см² 121 ± 1 °С в течение 15 мин. Для получения кровяного агара в остуженную до температуры 45–50 °С среду стерильно добавляют до 7 % дефибринированной крови барана. Тщательно перемешивают, не допуская образования пузырьков, и разливают в стерильные чашки Петри.

Основа кровяного агара / Основа кровяного агара с низким рН M073 / M089 (Blood Agar Base / withlow pH)

Среда рекомендуется для выделения и культивирования чумного микроба после добавления крови.

Ингредиенты	M073 (г/л)	M089 (г/л)
Настой сердечной мышцы (сухой эквивалент 500 г настоя)	10,00	10,00
Триптоза	10,00	10,00
Натрия хлорид	5,00	5,00
Агар-агар	15,00	15,00
рН	7,3 ± 0,2	6,8 ± 0,2

Размешать 40,0 г порошка в 1000,0 мл дистиллированной воды. Прокипятить до полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием при давлении 1,06 кгс/см² 121 ± 1 °С в течение 15 мин. Остудить до температуры 50 °С и стерильно внести до 5 % дефибринированной крови барана. Тщательно перемешать и разлить среду в чашки Петри.

Среды с настоем сердечной мышцы применяют в качестве основы для приготовления кровяного агара. Основа M073 высокопитательная и может использоваться без добавления крови в качестве среды общего назначения.

Соевый агар с казеиновым переваром (триптон-соевый агар) / Соевый бульон с казеиновым переваром (триптон-соевый бульон) M290 / M011 Soyabean Casein Digest Agar / Medium (Tryptone Soya Agar Broth)

Среды рекомендованы для выделения и культивирования чумного микроба.

Ингредиенты	M290 (г/л)	M011(г/л)
Гидролизат казеина	15,00	17,00
Папаиновый перевар соевой муки	5,00	3,00
Натрия хлорид	5,00	5,00
Калия гидрофосфат	–	2,50
Глюкоза	–	2,50
Агар-агар	15,00	–

pH $7,3 \pm 0,2$

Размешать 40,0 г порошка M290 или 30,0 г порошка MO11 в 1000,0 мл дистиллированной воды. Прокипятить до полного растворения частиц. Стерилизовать автоклавированием при давлении 1,06 кгс/см² 121 °С в течение 15 мин. Для получения кровяного агара в предварительно остуженную до температуры 45–50 °С среду стерильно добавляют до 5 % дефибрированной крови барана.

1.13. Среда Гисса.

Состав:

Ингредиенты	Кол-во
Пептон сухой ферментативный	20,0 г
Индикатор Андрее	15 мл
Натрий хлористый	5,0 г
Углевод	1,0 г
Вода дистиллированная	1000,0 мл

Разливают во флаконы с герметичной упаковкой и стерилизуют 15 мин при 112 ± 1 °С.

1.14. Среда цветная дифференциальная сухая.

Состав:

Ингредиенты	Кол-во
Панкреатический гидролизат казеина	8,0 г
Натрия хлорид	3,0 г
Натрия фосфат двузамещенный	0,96 г
Глюкоза	0,96 г
Лактоза	9,6 г
Мочевина	4,8 г
Фуксин кислый	0,09 г
Бромтимоловый синий	0,09 г
Агар	8,65 г
Панкреатический гидролизат казеина	4,0 г
Вода дистиллированная	1000,0 мл

pH $7,1 \pm 0,1$

36,0 г порошка среды размешивают в 1000,0 мл дистиллированной воды, доводят до кипения, кипятят до полного растворения агара (3–5 мин), фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в стерильные пробирки, трехкратно автоклавируют текучим паром 30 мин. Среду скашивают так, чтобы поверхность скошенной части была в два раза больше высоты столбика.

1.15. Среда для изучения подвижности микробов, сухая.

Состав:

Ингредиенты	Кол-во
Панкреатический гидролизат казеина	4,0 г
Натрия хлорид	4,0 г
Натрия фосфат двузамещенный	1,0 г
Агар	4,0 г
Вода дистиллированная	1000,0 мл

pH $7,1 \pm 0,1$

13,0 г порошка размешивают в 1000,0 мл дистиллированной воды, доводят до кипения, кипятят до полного расплавления агара (2–3 мин), фильтруют через ватно-марлевый фильтр, разливают в пробирки и автоклавируют 20 мин при давлении 1 атм 121 ± 1 °С.

Среда предназначена для изучения характера роста и подвижности исследуемой культуры.

Подвижные культуры дают легкое помутнение среды в виде вуали, неподвижные – растут по уколу, не вызывая помутнения среды.

1.16. Агар Кристенсена для выявления уреазы.

К 1000,0 мл дистиллированной воды добавляют 1,0 г сухого пептона, 5,0 г поваренной соли, 20,2 г агара-агара и 1,0 г глюкозы.

Эту смесь кипятят до полного растворения агара, доливая при выкипании до первоначального объема горячую дистиллированную воду, после чего устанавливают pH 6,8. Затем прибавляют 0,012 г фенолового красного индикатора, растворенного в 1,0 мл 96%-го спирта, хорошо размешивают, фильтруют (не давая агару застыть) через ватно-марлевый фильтр, разливают в пробирки по 5,0 мл и стерилизуют 20 мин при 121 ± 1 °С. При правильно установленном pH агар в пробирках приобретает апельсиновый цвет. После стерилизации, когда агар остынет до 50 °С, в каждую пробирку прибавляют стерильно 0,5 мл 20%-го

раствора мочевины на бидистиллированной воде и среду скашивают. После добавления мочевины цвет агара бледнеет и приобретает желтоватый оттенок.

Раствор мочевины для среды Кристенсена готовят следующим образом: 20,0 г мочевины растворяют в стерильной бидистиллированной воде и кипятят на водяной бане 30 мин с момента закипания.

Штаммы, не ферментирующие мочевины, не изменяют цвета среды, в отличие от штаммов, ферментирующих мочевины, которые изменяют цвет среды на красный.

1.17. Бульон Кларка.

Используется для определения интенсивности кислотообразования за счет утилизации глюкозы в реакции с метиловым красным.

Состав:

Ингредиенты	Кол-во
Пептон	5,0 г
Калий гидрофосфат (K_2HPO_4)	5,0 г
Глюкоза	5,0 г
Вода дистиллированная	1000 мл

Устанавливают рН 6,9–7,0, разливают в пробирки по 5,0 мл. Стерилизуют при 112 ± 1 °С 20 мин или 3 дня текучим паром по 20 мин.

2. Методы

2.1. Окраска мазков метиленовым синим по Леффлеру.

Состав щелочной раствора:

Ингредиенты	Кол-во
Метиленовый синий	3,0 г
Этиловый спирт 96 %	2,0 мл
Калия гидроксид (КОН) 1%-й раствор	1,0 мл
Вода дистиллированная	100,0 мл

Перемешать в указанном порядке перечисленные ингредиенты. Дать созреть краске в течение нескольких месяцев (для ускорения созревания посуду заполнять краской не более, чем на половину, закрыть рыхлым ватным тампоном и часто перемешивать для лучшей аэрации). Раствор устойчивый и может храниться во флаконах с резиновой или стеклянной пробкой длительное время (несколько лет). В процессе хранения качество краски улучшается.

Краску наносят пастеровской пипеткой на всю площадь высушенного и фиксированного над огнем мазка. Время окрашивания 1–2 мин.

2.2. Рост на ЦДС.

Среда предназначена для дифференциации бактерий по их способности ферментировать глюкозу, лактозу и мочевины. Комплексный индикатор Андрее и бромтимоловый синий при кислой реакции окрашивает среду в оранжевый цвет, при щелочной – в синий. Незасеянная среда имеет темно-зеленый цвет.

В среде глюкоза содержится в малой концентрации (0,1 %), поэтому в скошенной части агара (аэробные условия) бактерии утилизируют ее полностью в первые часы роста. К моменту учета реакции (24–48 ч) для своего питания микроорганизмы используют уже пептоны, имеющиеся в среде в качестве белковой питательной основы. При этом происходит образование аммиака и подщелачивание среды (синий цвет). В столбике (анаэробные условия) сохраняются кислые продукты расщепления глюкозы (оранжевый цвет). Таким образом, бактерии, ферментирующие глюкозу без газообразования и не ферментирующие лактозу и мочевины, через 24–48 ч изменяют столбик в оранжевый цвет без разрывов, а скошенную поверхность – в сине-зеленый (*Y. pestis*, *Shigella*, *S. typhi*, *P. multocida*). Бактерии, сбраживающие глюкозу и лактозу, вызывают подкисление всей среды (столбик и скошенная часть оран-

жевые). Лактоза входит в состав среды в концентрации, превышающей в 10 раз концентрацию глюкозы (1 %), вследствие чего кислая реакция через 24–48 ч сохраняется не только в столбике, но и в скошенной части среды (*L. monocytogenes*, *E. coli*) (газ).

Присутствие в среде мочевины позволяет определять наличие у бактерий фермента уреазы. Расщепление мочевины завершается выделением аммиака (NH_3), под действием которого вся среда (столбик и скошенная часть) приобретает синий цвет. Учет ферментации углеводов при этом невозможен (*Y. ptbc*, *Y. enterocolitica*, *P. vulgaris* [газ] и др.).

Посев проводят вначале по скошенной части в виде прямой линии, затем в толщу агарового столбика и заканчивают по скошенному агару штрихом. Укол в толщу агарового столбика не должен достигать дна, чтобы не нарушить условия для сбраживания глюкозы в относительно анаэробных условиях. Посевы инкубируют при 28 °С. Результаты учитывают через 24–48 ч.

2.3. КОН-тест (Cregersen, 1978).

Этот тест позволяет отличить грамотрицательные микроорганизмы от грамположительных. В основе метода лежит способность клеточной стенки грамположительных бактерий сохранять целостность при воздействии гидроксида калия, тогда как клеточная стенка грамотрицательных микроорганизмов разрушается при указанном воздействии.

Исследуемую культуру суспендируют в капле 3%-го раствора КОН в чашке Петри. При положительной реакции, свойственной грамотрицательным микроорганизмам, жидкость в капле становится вязкой, нити слизи тянутся за петлей на 0,5–2 см.

2.4. Тест на оксидазу (цитохромоксидазу).

У некоторых бактерий биологическое окисление в целях получения энергии осуществляется при помощи цитохромоксидазы, которая выявляется фенилендиамином. Цитохромоксидаза, окисляя фенилендиамин, окрашивает среду в синий цвет.

Метод может быть воспроизведен двумя вариантами: прямым и непрямым.

1. Постановка теста на оксидазу по Эрлиху (прямой метод).

На поверхность 16–18-часовой культуры исследуемого микроорганизма, выращенного на МПА, пастеровской пипеткой наносят каплю 1%-го водного раствора парадиметилфенилендиамина и добавляют каплю 1%-го спиртового раствора L-нафтола. Оксидазоположительные культуры в течение 1–3 мин окрашиваются в ярко-синий цвет.

2. Постановка теста с использованием коммерческого бумажного индикатора (СИБ) (непрямой метод).

Запаянной пастеровской пипеткой или платиновой петлей наносят культуру исследуемого микроорганизма на полоску бумажного индикатора, помещенного в крышку от чашки Петри. Оксидазоположительные культуры в течение 10–30 с окрашивают полоску в темно-синий цвет.

2.5. Тест на каталазу.

Каталаза – фермент, катализирующий процесс разложения перекиси водорода (H_2O_2) на воду и кислород (пузырьки газа). Она содержится как у аэробных, так и у анаэробных микроорганизмов.

Метод может быть воспроизведен двумя вариантами: прямым и непрямым.

1. На суточную культуру исследуемого микроорганизма, выращенного на МПА (среда не должна содержать кровь), при 36 ± 1 °C наносят пипеткой свежеприготовленный 3%-й раствор перекиси водорода с таким расчетом, чтобы он тонким слоем покрыл поверхность культуры.

2. На чистое, хорошо обезжиренное предметное стекло наносят каплю свежеприготовленного 3%-го раствора перекиси водорода и эмульгируют в нем петлю исследуемой культуры.

При наличии каталазы в исследуемой культуре на поверхности среды или в капле раствора перекиси водорода в первые 2–3 сек появляются пузырьки кислорода.

2.6. Определение индола по Эрлиху.

Некоторые микроорганизмы, имеющие фермент триптофаназу, в процессе размножения расщепляют триптофан среды на индол, пировиноградную кислоту и аммиак.

Образование индола выявляют по красному окрашиванию после внесения реактива Эрлиха.

Для постановки теста по Эрлиху к 2–3-суточной бульонной культуре приливают 1–2 мл эфира. Пробирку встряхивают для извлечения индола, затем дают отстояться и приливают 0,5 мл реактива Эрлиха. При положительном результате происходит красное окрашивание.

2.7. Реакция с метиловым красным.

Некоторые бактерии при культивировании в питательных средах содержащих пептон и глюкозу (или другой моносахарид) вызывают анаэробное ферментативное сбраживание глюкозы, в результате которого происходит накопление большого количества кислых продуктов, смещающих рН в кислую зону (4,0–4,5). При внесении индикатора-

метилового красного происходит изменение цвета среды от желтого до ярко-красного, что зависит от pH среды.

В 1 мл 1–2-суточной культуры выросшей на бульоне Кларка при температуре 37 °С или 3–5-суточной культуры, выросшей при комнатной температуре (22 °С) вносят 2 капли индикатора – метилового красного. Содержимое пробирки перемешивают и учитывают реакцию по изменению цвета среды.

Учет результатов

pH среды	2,5–5,0	5,2–5,5	6,0–7,0
Результат реакции	Положительный (+)	Сомнительный (±)	Отрицательный (–)
Цвет среды	Ярко-розовый, красный	Светло-розовый, оранжевый	Желтый

Индикатор для реакции с метиловым красным.

Ингредиенты	Кол-во
Метиловый красный	0,1 г
Спирт этиловый 96°	300,0 мл
Вода дистиллированная	200,0 мл

Краску растворяют в спирте, затем прибавляют воду до 500,0 мл.

2.8. Тест на образование сероводорода (H₂S).

Некоторые бактерии способны к ферментативному высвобождению сернистых соединений (H₂S) из сероводородсодержащих ингредиентов среды. Образовавшийся сероводород вступает во взаимодействие с солями железа или свинца, которыми пропитаны бумажные индикаторные полоски. В результате взаимодействия образуется сульфат железа или сульфат свинца, окрашивающий индикаторную полоску в коричнево-черный цвет.

В пробирку питательного бульона (8–10 мл) или на поверхность скошенного питательного агара засевают суточную бульонную культуру исследуемого штамма, затем помещают бумажную индикаторную полоску пропитанную ацетатом свинца или железа. Индикаторную полоску помещают таким образом, чтобы нижний ее конец находился на 1,5–2,0 см выше уровня среды, а верхний конец (1,0–1,5 см) загибают через край пробирки и зажимают пробкой.

Посевы инкубируют 18–24 ч при температуре 36 ± 1 °С (для некоторых бактерий требуется более длительное инкубирование).

2.9. Определение чувствительности к бактериофагам методом «стерильного пятна».

Ставится как ориентировочная проба.

На поверхность подсушенного агара (Хоттингера, Мартена, казеиново-дрожжевого или мясо-пептонного рН 7,2–7,3) засевают петлей 18-часовую исследуемую агаровую культуру и равномерно распределяют ее. Затем чашку делят на 3 сегмента и в центр каждого наносят по одной капле (0,02–0,03 мл) или одной петле диаметром 2,0 мм бактериофаги: чумной Покровской, чумной Л-413С и псевдотуберкулезный. Агаровые пластинки подсушивают, переворачивают и ставят в термостат на 15–18 ч при температуре 28 ± 1 °С.

Если культура принадлежит к чумному микробу, то на месте нанесения чумного бактериофага образуется «стерильное пятно».

ЛИТЕРАТУРА

1. Апарин Г.П., Голубинский Е.П. Микробиология чумы: руководство. – Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1989. – 92 с.
2. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».
3. Воробьев А.А. Медицинская и санитарная микробиология. – М.: ИЦ Академия, 2006. – 464 с.
4. Долгова Т.М., Токарева Л.Е., Субычева Е.Н., Тайкова Т.М. и др. Учебно-методическое пособие к практическим занятиям по лабораторной диагностике чумы: учебное пособие для врачей-бактериологов. – Иркутск: ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 2017. – 103 с.
5. Дятлов И.А., Кутырев В.В., Храмов М.В. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации особо опасных инфекций бактериальной природы. – М., 2012. – 415 с.
6. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза: методические указания: МУ 3.3.2.2124-06. – М., 2007. – 35 с.
7. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: практическое руководство / Под ред. акад. РАМН Г.Г. Онищенко, акад. РАМН В.В. Кутырева. – 2013. – 560 с.
8. Медицинская микробиология / Под ред. акад. РАМН В.И. Покровского, проф. О.К. Поздеева. – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – 1200 с.
9. Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации: методические указания: МУ 3.1.1098-02. – М., 2009. – 103 с.
10. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / Под ред. В.И. Покровского. – 4-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 768 с.
11. Поздеев О.К. Энтеробактерии: руководство для врачей. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 720 с.
12. Руководство по медицинской микробиологии. В 2-х т. / Под ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Володиной. – М.: Изд-во БИНОМ, 2008 (2010).
13. Руководство по профилактике чумы / Под ред. проф. А.В. Наумова, проф. Л.В. Самойловой. – Саратов, 1992. – 278 с.

14. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой, С. Ещиной. – М.: Медицина, 2005. – 600 с.

15. Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. и др. Псевдотуберкулез. – Новосибирск: Наука, 2003. – 320 с.

**РУКОВОДСТВО К ПРАКТИЧЕСКИМ ЗАНЯТИЯМ
ПО ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ, ЭНТЕРОПАТОГЕННЫХ
ИЕРСЕНИОЗОВ (ПСЕВДОТУБЕРКУЛЕЗА
И КИШЕЧНОГО ИЕРСЕНИОЗА) И ПАСТЕРЕЛЛЁЗА**

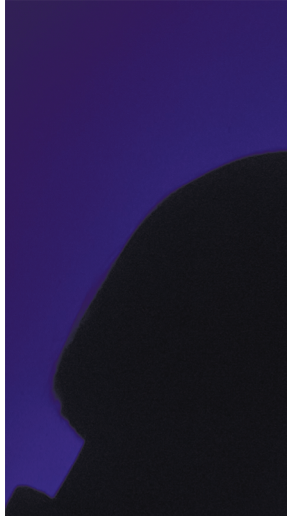
**Учебно-методическое пособие
для врачей-бактериологов**

Корректор *Булкина С.В.*
Оригинал-макет *Арсентьев Л.И.*
Художник *Фалеев К.А.*

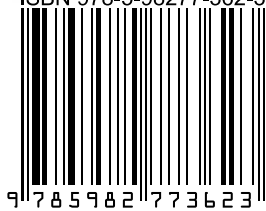
Сдано в набор 02.06.2022. Подписано в печать ##.06.2022. Бумага офсетная.
Формат 60x84^{1/16}. Гарнитура Cambria.
Усл. печ. л. 2,32. Тираж 130 экз. Заказ № 027-22.

ИНЦХТ
Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. (395-2) 29-03-37.
E-mail: arleon58@gmail.com

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ДЛЯ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ



ISBN 978-5-98277-362-3



9 785982 773623