**Предисловие**

Несмотря на то, что стафилококки принадлежат к числу наиболее легко обнаруживаемых и распозна­ваемых микроорганизмов, не требующих сложных диагностических приемов для их выявления, в прак­тической работе микробиологи до сих пор испыты­вают определенные трудности при установлении их причинной роли в ряде различных заболеваний. С од­ной стороны, присутствие патогенных стафилококков, обнаруживаемое в исследуемом материале, не всегда является убедительным доказательством их этиоло­гического значения. С другой, учитывая большое разнообразие проявлений биологической активности этих микробов, зависящее от разных, не всегда под­дающихся учету факторов, широкую их изменчивость под влиянием лекарственных веществ и самого мак­роорганизма, довольно сложно бывает определить их потенциальную патогенность. Наконец, третья причи­на связана с тем, что стафилококки являются пред­ставителями нормальной микрофлоры из группы условно патогенных микроорганизмов и, наряду с не­патогенными, патогенные представители обитают в организме людей, распространяясь при этом весьма неравномерно на разные участки человеческого тела.

Если выделение патогенного стафилококка, из кро­ви больных людей и различных полостей, которые принято считать стерильными, в подавляющем боль­шинстве случаев может служить доказательством его роли как возбудителя болезни, то присутствие ста­филококков на слизистых зева, носа и т. д. даже при явном болезненном состоянии их требует большой осторожности исследователя в выводах об этиологии данных заболеваний.

Поэтому, естественно, не может быть общих ре­комендаций, как при диагностике различных стафи­лококковых инфекций, так и при микробиологических исследованиях участков тела человека и разных объ­ектов внешней среды. Широкий обмен мнениями между микробиолога­ми научных учреждений и практических лаборато­рий, осуществляемый на съездах и конференциях, посвященных проблемам стафилококковых инфекций, а также при личных контактах, казалось бы, должен был привести к определенным взглядам на различ­ные методы исследования, предлагаемые для выде­ления и идентификации стафилококков. Однако боль­шое число запросов, поступающих из лабораторий СЭС и лечебных учреждений, свидетельствует о яв­ных затруднениях, которые возникают у исследова­телей при решении разных вопросов микробиологи­ческой диагностики стафилококков, а в ряде микро­биологических учреждений бытуют еще некоторые устаревшие методы и приемы, приводящие к непра­вильным оценкам и даже досадным недоразумениям.

Важным условием эффективности лабораторной диагностики является сочетанное определение каче­ственных и количественных критериев содержания патогенных стафилококков в исследуемом материале. Исходя из этого, я считаю необходимым изложить ряд методов основных микробиологических исследо­ваний, наиболее простых и доступных для каждой практической и научной лаборатории, которыми мы пользуемся в течение многих лет.

**ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ОБНАРУЖЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ СТАФИЛОКОККОВ**

Предварительная диагностика стафилококков мо­жет основываться на бактериоскопическом изучении препаратов — мазков, окрашенных по Граму. Пато­генные стафилококки, помимо гроздевидного распо­ложения, характеризуются правильной сферической формой клеток. Обнаружение стафилококков, нахо­дящихся внутри клеток, позволяет дать ответ о на­личии стафилококковой инфекции. В большинстве же случаев для точного установления патогенности об­наруженных стафилококков требуется выделить эти микроорганизмы в чистой культуре путем посева исследуемого материала на плотные питательные среды.

В настоящее время ассортимент дифференциаль­ных, элективных и накопительных сред, предложен­ных для выделения патогенных стафилококков, весь­ма значителен и продолжает расширяться. Многие исследователи на основе знания основных биохими­ческих характеристик и питательных потребностей патогенных стафилококков при конструировании сред стремятся повысить их высеваемость и обеспечить возможность осуществлять их количественный учет, получить надежный способ отличать потенциально болезнетворные стафилококки от сапрофитов.

Употребление жидких накопительных сред для первичного выделения стафилококков нецелесообраз­но, так как лишает исследователя возможности количественной оценки содержания микробов в об­следуемых объектах, а при случайных загрязнениях способствует ошибкам. Особенно это относится к та­ким исследованиям, как обнаружение носительства патогенных стафилококков, где доказательством яв­ляется лишь массивный рост, либо определение этио­логической роли этих микроорганизмов "при пищевых отравлениях или наружных воспалительных процес­сах. Если же речь идет об исследовании крови, а так­же о тех немногих случаях, когда бывает необходимо выявить даже единичные жизнеспособные особи этих микробов, например при контроле эффективности дезинфекции, проверке на стерильность или титрационных посевах, то в подобных случаях ис­пользование накопительных сред вполне оправ­дано.

Из большого числа разнообразных питательных сред, опробованных для первичного выделения ста­филококков, в практике оправдал,;1' себя немногие. Обычный питательный агар (рН 7,2 7,4), приготов­ленный путем добавления 2% агар-агара к мясопептонному бульону или к триптическому перевару Хоттингера, может быть использован при исследова­нии экссудатов из закрытых полостей. Стафилококки вырастают через 18—24 ч инкубации при 37° С в виде гладких блестящих с ровными краями непрозрачных и слегка выпуклых колоний. Характер пигмента вы­является лучше после дополнительного суточного выдерживания чашек при комнатной температуре (20° С) на свету. Если в исследуемом материале при­сутствует посторонняя флора, то по внешнему виду колонии стафилококков могут быть трудно отличимы.

Употребление кровяного агара дает возможность, кроме выявления пигмента, определить и гемолитическую активность стафилококков. При этом необхо­димо помнить, что гемолитическая способность, определяемая на чашках с кровяным агаром, зависит от многих факторов — вида крови, ее концентрации, наличия в ней антитоксинов, толщины слоя среды, содержания углекислого газа в атмосфере культиви­рования, густоты посева, присутствия и характера со­путствующей флоры и т. д.

При отборе колоний с кровяного агара необходи­мо отвивать как гемолитические, так и не дающие гемолиза, особенно если исследование проводится на среде с человеческой или лошадиной кровью, а от­сутствие гемолиза на таких средах не позволяет за­ключить об отсутствии вообще гемолитической актив­ности. Поэтому использование кровяного агара для первичного посева целесообразно только при обсле­довании объектов, не содержащих посторонней мик­рофлоры, и желательно добавлять в питательную среду кровь кролика или барана.

Если же проводится исследование гноя открытых ран или отделяемого язв или свищей, то следует пользоваться элективно-дифференциальной средой для стафилококков — желточно-солевым агаром (ЖСА) Г. Н. Чистовича. Элективность этой среды обеспечивается высоким содержанием хлористого натрия, а добавленный яичный желток позволяет вы­являть лецитовителлазную активность, которая является одним из показателей патогенности стафило­кокков и в силу этого ЖСА более четко дифференци­рует патогенных представителей, чем кровяной агар. Приготовление ЖСА несложно.

Заготовляют впрок и стерилизуют в автоклаве при 120 °С" в течение 20 мин питательный агар (МПА или Хоттингера) рН 7,2—7,4, содержащий 10% поваренной соли. Перед употреблением солевой питательный агар растапливают, остужают до 45—50 °С и добавляют к нему 20% по объему стерильной желточной взве­си (1 желток куриного яйца на 200 мл физиологического рас­твора). Для лучшего эмульсирования желательно иметь колбы со стеклянными бусами. После тщательного перемешивания среду разливают по 20—25 мл в чашки, которые могут храниться в хо­лодильнике в течение нескольких дней.

Следует производить массивный посев исследуе­мого материала на чашки с ЖСА, а инкубацию вести в течение 2 суток при 35—37° С. Посторонняя флора резко подавляется, стафилококки же на ЖСА выра­стают практически в чистой культуре. Непосредст­венно при просмотре чашек вокруг колоний отме­чается образование радужных венчиков и мутной зоны — лецитовителлазная реакция. Такие колонии, не менее двух из каждого посева, отвивают на скошенный мясо-пептонный агар для последую­щей проверки выросших культур в реакции плазмо-коагуляции.

Чтобы избежать ошибок в определении желточ­ной реакции, необходимо иметь в виду, что иногда наблюдается помутнение среды без радужного обод­ка, в этом случае проба на лецитовителлазу считает­ся отрицательной. Если же колонии, выросшие на ЖСА, не дают лецитовителлазной реакции, т. е. не окружены радужным венчиком, но имеется рост ста­филококков, то их тоже считают подозрительными и также отвивают не менее двух из каждого такого посева на чашки с простым питательным агаром пятнами диаметром 5—10 мм. После суточного инкубирования при 37° С полученные макроколонии про­веряют в реакции плазмоагглютинации, для чего микробную массу размешивают петлей на стекле в каплях цитратной кроличьей или человеческой плаз­мы, разведенной 1 :4. Образование хлопьев учиты­вают в течение 30с—1 мин. При наличии плазмоаг­глютинации такие штаммы считают подозрительными и отвивают на скошенный агар для дальнейшего изу­чения в коагулазной реакции. При таком отборе число пропускаемых штаммов патогенных стафило­кокков человеческого происхождения невелико, куль­туры же, выделенные от животных, требуется прове­рять в реакции плазмокоагуляции.

Коагулазная проба является основным признаком, определяющим болезнетворность стафилококков, по­этому ее постановка требует к себе максимального внимания. Для выявления коагулазной активности у стафилококков, выделенных от людей, можно поль­зоваться как цельной кровью, так и плазмой кроли­ков или человека. Можно использовать также кровь или плазму, взятую непосредственно от человека. Консервированная плазма или кровь, используемые для переливания, непригодны для реакции, так как к ним часто добавляются консерванты, которые пре­пятствуют жизнедеятельности стафилококков, прояв­лению коагулазной активности. Не следует приме­нять кровь животных или людей, переносящих стафи­лококковые заболевания, в особенности затяжные, так как она может оказаться нестерильной и содержать антикоагулазу. При работе со стафилококками, выде­ленными от рогатого скота, можно пользоваться бы­чьей кровью.

Асептично взятую кровь стабилизируют с помощью 1—4% цитрата или 0,1% оксалата. Для получения плазмы нитратную кровь центрифугируют или отстаивают на холоду. Но, как уже говорилось, можно пользоваться и цельной кровью. Затем кровь разводят стерильным физиологическим раствором в соотношении 1 : 3 или 1 : 5 и разливают по 0,2—0,3 мл в стерильные пробирки, которые перед стерилизацией должны быть тщательно вымыты, так как остатки химических веществ могут влиять на результат плазмокоагуляции.

Испытуемые агаровые культуры стафилококков вносят пет­лей в плазму и хорошо перемешивают. Бульонные культуры вно­сят пипеткой в объеме 0,1 мл В каждом опыте необходимо ста­вить контроль с культурами заведомо патогенных стафилококков, дающих коагулазную реакцию, и штаммами коагулазоотрицатель-ных микроорганизмов. Кроме того, часть пробирок с разлитой плазмой следует оставлять не засеянной микробами и выдержи­вать в термостате на протяжении всего срока опыта. В случае наступления коагуляции хотя бы в одной из них весь опыт нужно переставить с новой порцией крови. Пробирки с исследуемыми культурами выдерживают в термостате при 37 °С в течение су­ток. Учет результатов проводится обязательно дважды: через 2—3 ч и 24 ч. Учитывают свертывание плазмы и образование сгустков. Обычно культуры, активно продуцирующие коагулазу, дают положительную реакцию уже через 2—3 ч. а если они обла­дают и выраженной фибринолитической активностью, то перво­начально образовавшиеся сгустки могут подвергнуться расплавлению к концу суток. Слабокоагулирующие штаммы могут давать положительную реакцию в поздние сроки—к концу суток. Опыты, давшие сомнительный результат, необходимо повторить.

Некоторые исследователи, получив отрицательный или сомни­тельный результат, оставляют пробирки на столе. Этого делать нельзя, так как свертывание плазмы в более поздние сроки мо­жет носить не специфический характер и его не следует прини­мать во внимание.

Стафилококки, дающие положительную коагу­лазную пробу, должны рассматриваться как потен­циально патогенные, независимо от наличия или от­сутствия у них гемолитических свойств и характера пигмента, их относят к виду St. aureus и в дальней­шем подвергают фаготипизации и проверке на чув­ствительность к антибио­тикам.

Углубленное изучение стафилококков показало, что основной признак па-тогенности — коагулазная реакция может под­вергаться изменчивости при воздействии различ­ных факторов (Г. Н. Чистович, 1961; Е. М. Паде­рина, 1966), поэтому в ряде случаев, при выде­лении коагулазонегативных стафилококков в мо­нокультуре из патологи­ческих очагов, целесооб­разно изучить у них дру­гие признаки потенциаль­ной болезнетворности и прежде всего — способ­ность ферментировать маннит в анаэробных условиях. Известно, что среди коагулазоотрицательных часть культур обладает способностью расщеплять маннит в анаэробных условиях (8,4% —по данным А. А. Ака­това и М. Л. Хатеневер, 1974).

Определение ферментации маннита в анаэробных условиях технически очень просто и осуществляется путем посева уколом исследуемых культур в пробирки с высоким столбиком полу­жидкого агара Хоттннгера, содержащего 1% маннита и 0,004% индикатора бромкрезолпурпура или бромтимолблау (рН == 7,2). Эту среду перед посевом «регенерируют», т. е. кипятят в водяной бане, быстро охлаждают, а после посева заливают слоем сте­рильного вазелинового масла. Посевы инкубируют при 37 °С в течение 5 дней. Однако в значительном числе случаев результаты могут быть учтены уже через сутки.

Наряду с реакцией плазмокоагуляции, большое значение приобрела еще одна важная способность стафилококков, характеризующая их потенциальную патогенность, —дезоксирибонуклеазная активность. Многие исследователи сообщают о высокой корреля­ции этого признака с коагулазной активностью и токсигенностью изучаемых культур; отмечают, что стафилококки, выделенные из патологического мате­риала, как правило, обладают ДНК-азой. Коагула-зопозитивные штаммы, полученные от носителей, могут не иметь этого фермента, и обычно отсутствие дезоксирибонуклеазной активности сочетается с низ­кой биохимической способностью и атоксигенностью таких культур стафилококков.

По наблюдениям некоторых исследователей, сре­ди коагулазонегативных штаммов стафилококков, но обладавших другими признаками патогенности, вы­деленных в ряде случаев от больных с различными гнойными инфекциями, дезоксирибонуклеазную ак­тивность проявляли от 10 до 29% таких культур (И. И. Панышева и сотр., 1967; Franklin и соавт., 1966; Lierd и Golde, 1970).

В настоящее время этот тест может служить на­дежным дифференциальным признаком между пато­генными и непатогенными стафилококками и в то же время может помочь в дифференциации степени патогенности коагулазопозитивных штаммов и, без­условно, привлечет внимание к коагулазонегативным, но обладающим этим ферментом культурам ста­филококков и в ряде случаев позволит отнести по­следние к болезнетворным формам с большей уве­ренностью.

Методика определения дезоксирибонуклеазной активности не­сложна, в основу ее положен метод Джеффриса. Готовят впрок 2% МПА (рН—8,6), содержащий ДНК (2 мг/мл среды), разли­вают по флаконам и стерилизуют текучим паром в течение 30 мин. Перед разливом в чашки к среде добавляют CaCIa (0,8 мг/мл). На подсушенную среду засевают суточные культуры стафилокок­ков. После инкубации в течение 18—20 ч при 37°, на поверхность среды наливают IN раствор НС1 и через 7—10 мин учитывают зоны просветления, которые оценивают крестами (Н. Б. Морд­винова и соавт., 1967).

Нами предложен более экономичный метод для обнаружения ДНК-азы у микроорганизмов. Этот спо­соб, помимо уменьшения в 2 раза расхода ДНК на каждый опыт, позволяет использовать более деше­вую низкополимерную нуклеиновую кислоту, изго­товляемую Олайнским заводом химических реакти­вов. Предлагаемая методика широко апробирована на кафедре микробиологии ЛСГМИ и по качеству результатов не уступает общепринятой. Поэтому мы приводим ее подробное описание.

Для приготовления рабочего раствора ДНК, навеску нуклеи­новой кислоты из расчета 10 мг/мл помещают в дистиллирован­ную воду, добавляют 0,5 мл 0,2% (или 0,8%) раствора NaOH на каждые 10 мл воды. Для лучшего растворения ДНК смесь либо нагревают до кипения в водяной бане при постоянном перемеши­вании стеклянной палочкой, либо оставляют на ночь при 37 °С в термостате. К расплавленному и остуженному до 50 °С МПА добавляют рабочий раствор ДНК из расчета 1 мг/мл (на 9 мл МПА—1 мл раствора ДНК), перемешивают, разливают по10л(л в пробирки, стерилизуют текучим паром в течение 30 мин или в автоклаве при 0,5 атмосферы в течение 20 мин. Срок хранения— 1—2 мес.

При постановке опыта столбики агара с ДНК растапливают, в водяной бане добавляют 0,1 мл официнального стерильного 10% р-ра СаСЬ, перемешивают и выливают на слой хорошо под­сушенного питательного агара в чашки Петри и вновь подсуши­вают. Суточную агаровую культуру засевают маленькими бляш­ками (диаметр равен 2—2,5 мм) или штампом-репликатором не более 20—25 бляшек, во избежание слияния зон деполимериза­ции ДНК. После 18—20-часовой инкубации поверхность агара за­ливают 5 мл IN раствора НС1 и через 3—5 мин учитывают зоны просветления. Реакции оценивают в крестах.

При этом следует учесть, что интенсивность зоны деполиме­ризации на плотной среде не всегда совпадает с количеством про­дукции этого фермента у исследуемых стафилококков в жидких средах.

Для обнаружения фибринолизина исполь­зуют несколько усовершенствованный метод Кристи с сотр.

Среда Кристи—Чепмена имеет следующий состав: мясной экстракт—0,45 г, пептон—0,75 г, хлористый натрий—1,2 г, агар—2,75 г, вода—130 мл, рН среды == 7,0. Стерилизуется в автоклаве и сохраняется впрок.

Перед опытом среду растапливают, остужают до 50 °С и до­бавляют 15—20% стерильной цитратной человеческой плазмы. Смесь прогревается в водяной бане при 65—70°С в течение 2— 5 мин до появления ясной мути, а затем разливается в чашки. Испытуемые культуры засевают «пятнами» по 15—20 на чашку. Посевы инкубируют при 37 °С. Учитывается образование зон про­светления вокруг колонии первоначально через 14 ч, затем через 24 и 48 ч, так как реакция у различных культур течет неодина­ково быстро и у ряда штаммов она развивается в более поздние сроки.

Фибринолитический тест мы считаем весьма при­годным для определения потенциальной болезнетворности стафилококков, но оцениваем только в комп­лексе с другими признаками активности.

Гиалуронидазная активность опреде­ляется по методу Мак-Клина в модификации М. Ш. Могилевского и Л. С. Коган (1949).

Раствор гиалуроната дающий в присутствии 2 N уксусной кислоты типичный сгусток, разливается по 0,5 мл в стерильные пробирки. Добавляется 0,5 мл суточной культуры стафилококка в пептонной воде. Контролями служат: гиалуропат + дистилли­рованная вода и гиалуропат + незасеянная среда. Смеси встря­хиваются и выдерживаются при 37 °С 15—20 мин. Затем в каж­дую пробирку добавляется по две капли 2 N раствора уксусной кислоты и встряхивается. В контролях должен образоваться сли­зистый комочек. В опыте при наличии гиалуронидазы он отсут­ствует, что свидетельствует о деполимеризации гиалуроновой кис­лоты микробным ферментом.

Для изучения токсигенности стафи­лококков удобно пользоваться методом, предло­женным Илеком и Леви (1950), позволяющим опре­делить типы гемолизинов.

С этой целью готовятся чашки с питательным агаром, содер­жащим 5% отмытых физиологическим раствором эритроцитов барана, кролика и человека.

На поверхность питательной среды по диаметру помещают стерильную полоску фильтровальной бумаги, смоченную альфа-антитоксической сывороткой. Отступив 1—2 мл от края полоски, перпендикулярно к ней засеивают штрихами исследуемые куль­туры. Посевы инкубируют при 37 °С в течение суток, после чего учитывают результаты.

Альфа-гемолиз проявляется в виде полного просветления среды вокруг штриха культуры и нейтрализуется альфа-антиток­сической сывороткой. Он выявляется на средах с кроличьими и бараньими эритроцитами

Бета-гемолиз на агаре с бараньей кровью дает частичное просветление, зона которого имеет буровато-пурпурный оттенок. Это «тепло-холодовый» токсин и лучше выявляется после до­полнительного суточного выдерживания чашек в холодильнике при температуре +4 °С по характерному послойному гемолизу бараньих эритроцитов и не централизуется альфа-антитоксиче­ской сывороткой. На кроличьих эритроцитах он не активен. Дельта-гемолизин определяется по узкой полоске гемолиза бараньих и кроличьих эритроцитов, не нейтрализуется альфа-антитоксической сывороткой. Однако образование дельта-гемоли-зина на этих чашках может быть замаскировано действием аль­фа-токсина и поэтому его следует проверять на средах с эритро­цитами человека или лошади. Таким образом, для определения всех 3 типов гемолизинов достаточно использовать эритроциты барана и человека или лошади.

Для определения вирулентности ста­филококков существуют несколько различных методов заражения белых мышей.

Наиболее простым является введение 0,1 мл суточной бульон­ной культуры испытуемого стафилококка в хвостовую вену. Учет гибели животных осуществляется в течение 10 суток, регистри­руют наличие абсцессов в почках.

Удобно пользоваться способом Badenski и сотр. (1958), Су­точная бульонная культура центрифугируется при 3000 об/мин — 30 мин. Полученный осадок ресуспендируется в половинном объ­еме декантата и в количестве 0,05 мл вводится 6 мышам позади глазного яблока в окологлазничную клетчатку. Культуру, вызы­вающую гибель половины и более зараженных мышей в течение 6 дней, считают вирулентной.

При этих методах заражения вирулентной куль­турой у животных развивается общин септический процесс с преимущественным поражением почек. Основная гибель мышеи происходит на 3—5-й день после заражения.

Другие способы заражения белых мышей (внутрибрюшинный и интраназальный) требуют в десятки

раз большей заражающей дозы, максимум гибели мышей приходится на 1—2-е сутки, что характери­зует преимущественно токсический компонент про­цесса (С. А. Анатолий, И. И. Антоновская, 1967).

В то же время ряд исследователей отдают пред­почтение более простому технически внутрибрюшинному способу заражения мышей, который одновре­менно позволяет изучать клеточные и гуморальные механизмы развития инфекции.

Сопоставление вирулентности стафилококков для белых мышей с отдельными факторами их патогенности показало, что вирулентность штаммов, по дан­ным большого числа исследователей, коррелирует с уровнем альфа-гемотоксина. Что касается других признаков патогенности и их корреляции с вирулент­ностью, то получены разноречивые сведения. Так, по данным С. А. Анатолия (1969), вирулентность штам­мов коррелировала с продукцией бета-гемолизина, летального фактора, лецитовителлазы, гиалуронидазы и коагулазы. А. К. Акатов (1968) не отмечает кор­реляции вирулентности с коагулазной, лециговител-лазной, фибринолитической активностью, не установ­лена корреляция с дельта-токсигенностью.

Для сравнения вирулентности стафилококковых культур можно использовать их способность вызы­вать дермонекротическую реакцию у кроликов.

Готовят 4-миллиардную взвесь суточной агаровой культуры стафилококка в физиологическом растворе, а из полученной гу­стоты делают разведения, чтобы получить 2- и 1-миллиардные взвеси. Из каждого разведения в объеме 0,1 мл, что составляет 100, 200, 400 миллионов микробных тел, вводят кролику в вы­стриженную или депилированную накануне кожу. На одном кро­лике можно одновременно поставить до 8 внутрикожных проб. Ежедневно отмечают проявления дермонекротической реакции, а окончательно на 4-е сутки. За минимальную дермонекротиче­скую дозу принимают то наименьшее количество культуры, кото­рое дает некроз на 4-е сутки (Г. В. Выгодчиков, 1963).

**Список использованной литературы**

1. 1.     А.М.Смирнова, А.А.Трояшкин, Е.М.Падерина: микробиология и профилактика стафилококковых инфекций – «Медицина», 1977.
2. 2.     Стафилококковые инфекции: российский сб. науч. тр. – С.-П., 1991.
3. 3.     А.М.Смирнова: вопросы иммунологии и микробиологии стафилококковых и стрептококковых инфекций – Ленинград, 1975.
4. 4.     Лекция по теме.

5. Методическая разработка кафедры.