

Оглавление

Список сокращений	8
Предисловие	10
1. Характеристика возбудителя дифтерии	14
2. Эпидемиология дифтерии	33
3. Основные свойства штаммов коринебактерий, циркулирующих на территории Ростова-на-Дону и Ростовской области	41
4. Состояние противодифтерийного антитоксического иммунитета у населения Ростова-на-Дону и Ростовской области	71
5. Состояние противодифтерийного иммунитета у детей с хронической патологией	84
6. Механизмы формирования иммунного ответа при дифтерийной инфекции	101
7. Клиника и лечение дифтерии у детей	114
8. Питательные среды, используемые для лабораторной диагностики дифтерии, и методы их контроля	132
9. Лабораторная диагностика дифтерии	149
10. Профилактика дифтерии	169
Заключение	219
Литература	225

Люди, как растения и животные,
просто редкие исключения в мире,
принадлежащем микробам.

Лауреат Нобелевской премии
Артур Кронберг

1

Характеристика возбудителя дифтерии

Дифтерия — острое инфекционное заболевание, вызываемое токсигенными штаммами *Corynebacterium diphtheriae*, передающееся воздушно-капельным путем, характеризующееся местным фибринозным воспалением преимущественно рото- и носоглотки, а также явлениями общей интоксикации и поражением сердечно-сосудистой, нервной и выделительной систем.

Возбудитель дифтерии *Corynebacterium diphtheriae* впервые описан Klebs в 1883 г. Позднее, в 1884 г., Loeffler выделил чистую культуру коринебактерий дифтерии.

Род *Corynebacterium* (класс *Actinobacteria*, порядок *Actinomycetales*) — гетерогенная группа коринеформных бактерий, включающая в себя 67 видов коринебактерий. Содержание G + C пар в ДНК коринебактерий — от 40 до 67 ммоль%. Клеточная стенка коринебактерий содержит мезодиаминопимелиновую кислоту, короткоцепочечные миколовые кислоты с 22–36 атомами углерода, арабинозу, галактозу, жирные кислоты, основными из которых являются пальмитиновая, стеариновая и олеиновая [126].

Значительное количество видов коринебактерий, преимущественно обитающих на слизистых оболочках или кожных покровах млекопитающих, часто встречается и во внешней среде. Не-

которые виды продуцируют экзотоксин и являются патогенными для человека и животных.

Типовым является вид *Corynebacterium diphtheriae*, который неодорожен по своим морфологическим, культуральным, биохимическим и антигенным свойствам и в соответствии с этим разделен на биотипы (*gravis*, *mitis*, *intermedius*, *mitis*, *var. belfanti*). Штаммы *C. diphtheriae*, независимо от их принадлежности к тому или иному биотипу, могут быть токсигенными, т. е. способными продуцировать дифтерийный экзотоксин, или нетоксигенными. Возбудителем дифтерии являются только токсигенные штаммы *C. diphtheriae*.

1.1. Морфологические и тинкториальные свойства

C. diphtheriae — прямые или слегка изогнутые тонкие грамположительные неподвижные, неспорообразующие, полиморфные палочки с заостренными или булавовидными концами, размером $0,3-0,8 \times 1,5-8,0$ мкм. Внутри клеток расположены зерна волютина, представляющие собой метакрохроматинные гранулы полиметафосфата. Зерна волютина у *C. diphtheriae* располагаются в булавовидных утолщениях на одном или обоих концах, реже — в середине. Другие виды коринебактерий также могут содержать зерна волютина с разнообразным расположением. Частота обнаружения волютиновых гранул зависит от культурального варианта, физиологического состояния клетки и содержания фосфатов в среде. Зерна выявляют путем окрашивания препаратов щелочным метиленовым синим по Леффлеру. Гранулы полиметафосфата воспринимают краситель более интенсивно, чем цитоплазма клетки, обуславливая метакромазию, присущую коринебактериям дифтерии. Зерна волютина обнаруживают также при использовании окраски по Нейссеру и люминесцентной микроскопии.

В мазках коринебактерии дифтерии располагаются под углом, напоминая латинские буквы L, X, V, Y или растопыренные пальцы рук. В мазках, приготовленных из материала, взятого из зева, носа, отделяемого ран, *C. diphtheriae* могут иметь войлокообразный ха-

актер. Полиморфизм дифтерийных бактерий обусловлен прежде всего несбалансированным синтезом муреина, формирующего клеточную стенку, при культивировании на питательных средах с большим количеством сывороточных белков. В среде с оптимальным содержанием ингредиентов, отвечающим физиолого-химическим потребностям, они имеют однородную форму.

На морфологию дифтерийных палочек влияет возраст культуры, содержание в среде фосфатов, глицерина, железа. В результате действия этих факторов прекращается деление клеток, могут появляться «гигантские» клетки. Такое расположение более характерно для дифтерийных палочек, тогда как другие виды коринебактерий, являющиеся представителями нормальной микрофлоры, чаще располагаются в микропрепаратах в виде «частокола» из нескольких параллельно лежащих клеток. К такому угловому и полисадному расположению клеток приводит «щелкающее» (snapping) деление. При окраске по Граму клетки *C. diphtheriae* окрашиваются положительно, но иногда и отрицательно, что связывают с их чрезмерным обесцвечиванием спиртом [171].

1.2. Культуральные и биохимические свойства

Возбудитель дифтерии и другие представители рода *Corynebacterium* относятся к аэробам, факультативным и облигатным анаэробам. Они являются хемогетеротрофами, каталазоположительны, углеводный метаболизм смешанный — дыхательный и бродильный.

C. diphtheriae требовательны к условиям культивирования, хорошо растут при + 37 °C (pH 7,4–8,0) на питательных средах, обогащенных аминокислотами, пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, с добавлением лошадиной (или бычьей) сыворотки или гемолизированной крови. Для культивирования дифтерийных бактерий используют кровяной (5–10%) агар, сывороточный (10–15%) агар, свернутую сыворотку Леффлера или Ру, селективные среды с добавлением теллурита калия (кровяно-теллуритовый агар — КТА), среды Клауберга II и Тинсдейла—Садыковой, коринебакагар, допускается использование хинозольной среды Бучина.

По культуральным и биохимическим свойствам вид *C. diphtheriae* неоднороден. Андерсон и соавт. (1931) описали два основных биотипа данного вида — *gravis* и *mitis*, отличающиеся по культурально-биохимическим свойствам, а также промежуточный вариант — *intermedius*. В 1950-е гг. описан вариант биотипа *mitis C. diphtheriae mitis var. belfanti* [74].

На плотных питательных средах коринебактерии дифтерии образуют различные типы колоний: *C. diphtheriae gravis* растет преимущественно в R-форме, образуя колонии диаметром 1,5–2,0 мм, через 48 ч — с радиальной исчерченностью и неровными краями, напоминающие цветок маргаритки (рис. 1.1, см. также цветную вклейку I). Для *C. diphtheriae mitis* более характерна S-форма колоний (диаметр 0,5–1,0 мм, с ровными краями, выпуклой гладкой, поверхностью). *C. diphtheriae intermedius* образуют мелкие, слегка конусообразные, округлые колонии диаметром 0,5–1,0 мм. Культуральные свойства вида *C. diphtheriae mitis var. belfanti*, как и *C. diphtheriae intermedius*, сходны с биоваром *mitis*.

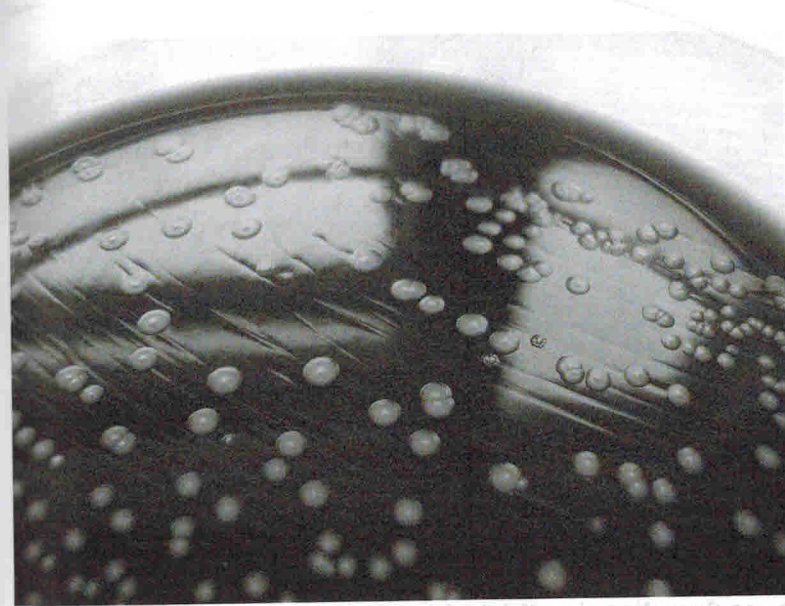


Рис. 1.1. *Corynebacterium diphtheriae gravis tox⁺* на кровяном агаре

При выделении *C. diphtheriae* из клинического материала для ингибирования роста сопутствующей микрофлоры в основном используют среды, содержащие теллурит калия. Подавляющее большинство штаммов возбудителя дифтерии резистентно к относительно высоким концентрациям теллурита калия, способно за счет продукции теллуритредуктазы восстанавливать теллурит калия до металлического теллура и накапливать его внутри клеток, что придает дифтерийным колониям серо-черную или черную окраску.

Наиболее четко все биотипы *C. diphtheriae* выявляются на среде КТА и коринебакагаге (рис. 1.2–1.5).

На жидких питательных средах R-формы коринебактерий дифтерии (биотип *gravis*) растут, образуя пленку на поверхности или крошкообразный осадок, S-формы (биотип *mitis*) дают равномерное помутнение и мелкозернистый осадок.

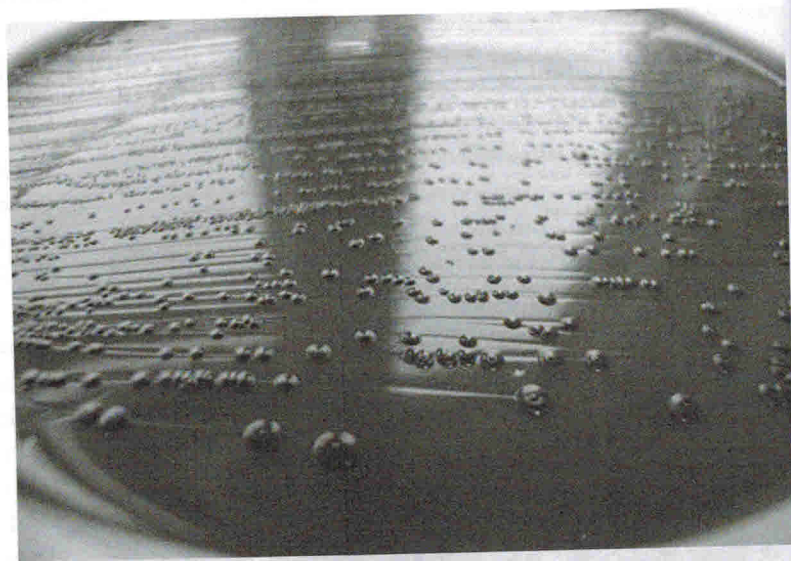


Рис. 1.2. *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+* на кровяном теллуритовом агаре

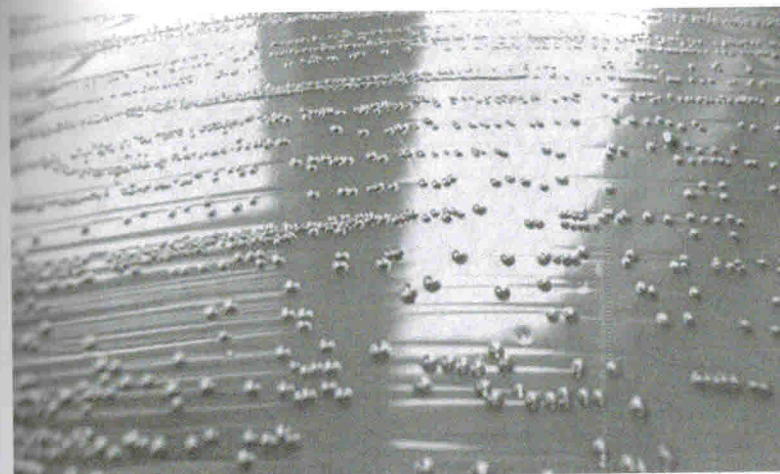


Рис. 1.3. *Corynebacterium diphtheriae mitis tox-* на кровяном теллуритовом агаре

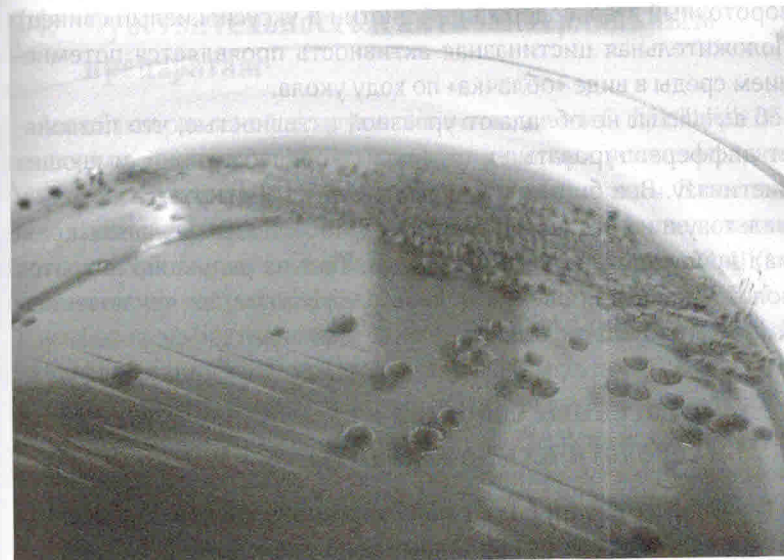


Рис. 1.4. *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+* на коринебакагаге

Чтоб увеличить микробов
количество — всегда и везде экономь
электричество.

Памятка на биотехнологическом
производстве

Питательные среды, используемые для лабораторной диагностики дифтерии, и методы их контроля

8

8.1. Питательные среды

Одним из важнейших условий успешной и своевременной диагностики дифтерии является использование стандартных питательных сред. Питательные среды должны обеспечивать активный рост и размножение коринебактерий дифтерии, сохранение их культуральных, морфологических, биохимических свойств, способности к продукции ДТ и ингибирование сопутствующей микрофлоры.

Для культивирования коринебактерий дифтерии используют высококачественные питательные среды, содержащие достаточное количество аминного азота (1,5–1,8 г/л). Сбалансированность питательных веществ в средах определяет высокие буферные свойства и стабилизацию оптимума pH 7,4–7,6 для *C. diphtheriae* в процессе выращивания, создает оптимальные физико-химические условия для нормальной жизнедеятельности клеток.

Возбудитель дифтерии является гетеротрофом, не культивируется на простых питательных средах, т. к. не продуцирует экзопротеазы — ферменты, способные расщеплять белки окружающей среды. В состав питательных сред, используемых для культивирования коринебактерий, должны входить пептоны,

аминокислоты, органические источники энергии, минеральные вещества, источники ионов Ca^{++} , Mg^{++} , Cu^{++} , Fe^{++} , Zn^{++} , витамины, кровь или сыворотка. Последние два компонента содержат правращающую молочную кислоту, пимелиновую и никотиновую кислоты, которые являются факторами роста для возбудителя дифтерии. К факторам роста также относят олеиновую кислоту и ее производные [186]. В качестве основ для приготовления питательных сред используют ферментативные гидролизаты белков, дрожжей.

Для культивирования *C. diphtheriae* разработаны питательные среды, в состав которых входят заменители крови. Такими средами являются желточно-солевой агар [63], коринебакагар, в состав которого входит стимулятор роста гемофильных бактерий (СРГМ). J.H. Mueller [186] предложена синтетическая безбелковая органическая среда, содержащая 8 различных аминокислот, органические источники энергии, углерода, источники ионов двухвалентных металлов и витамины.

С целью выделения коринебактерий из исследуемого материала используют питательные среды элективно-селективного ряда, учитывая наличие сопутствующей микрофлоры в образцах.

8.1.1. Транспортные среды и среды накопления

В качестве транспортных сред рекомендуют использовать полужидкие питательные агары (0,1%), приготовленные на основе перевара Хоттингера или коммерческого питательного бульона (pH — 7,6). Перед употреблением к 4,0 мл 0,1% агаровой основы добавляют до 0,5–1,0 мл сыворотки крупного рогатого скота и 0,05 мл 2% раствора теллурита калия в качестве селективного компонента [80].

С целью обнаружения ДТ в РПГА или ИФА разработаны жидкие среды накопления на основе бульона Мартена, содержащие сыворотку крупного рогатого скота и теллурит калия [110], описаны и питательные среды на основе сред 199 или «Игла» [52].

Допускается хранение транспортных и сред накопления до 10 дней при 4 °С.

8.1.2. Среда для первичного посева исследуемого материала и культивирования изолятов

В настоящее время для выделения коринебактерий из исследуемого материала применяют преимущественно такие электроно-селективные среды, как цистеин-теллуриновая сывороточная среда Тинсдейла—Садыковой, среда Клауберга II, кровяной теллуриновый агар, коринебакагар, принципиальный состав которых предполагает наличие трех основных компонентов: питательной основы, крови или ее аналогов как факторов роста, которые могут быть включены в основу, и теллурита калия в качестве селективной добавки. Использование теллуриновых сред для выделения коринебактерий дифтерии впервые в СССР было внедрено в практическое здравоохранение заслуженным деятелем науки РФ, профессором Н.Н. Костюковой [76].

По-прежнему допускается использование с этой же целью хиннозольной среды Бучина, хотя показатели ее ростовых и ингибирующих свойств ниже, чем у вышеперечисленных.

Для отсева колоний и накопления чистой культуры коринебактерий используют сывороточную агаровую среду, содержащую 10 % сыворотки крупного рогатого скота или крови лошади [110].

В качестве основ для приготовления сред, предназначенных для выделения и культивирования возбудителя дифтерии, предложены различные варианты сухих коммерческих питательных агаров [64]: сухой питательный агар (СПА) («Микрorgen», Махачкала), сухой питательный агар Д (дрожжевой), сухой питательный агар КД (кормовые дрожжи), агар на основе гидролизата рыбной муки (ГРМ-агар), агар Гивентала—Ведьминой (АГВ) (ФБУН ГНЦПМБ, Оболенск), основу кровяного агара Columbiaagar («Prodanisa», Испания), Bloodagar («HiMedia», Индия), Noyleagar («Oxoid», США) и др. В качестве основ можно также рекомендовать сухой рыбный бульон, перевар Хоттингера с содержанием аминного азота 1,5–1,8 г/л; препарат «Аминопептид», представляющий собой ферментативный гидролизат крови животных, содержащий полноценный набор аминокислот и пептидов; питательную основу [56] из непищевого сырья — гомогенатов ткани толстого кишечника крупного рогатого скота.

II состав среды Клауберга II входит агаровая основа, содержащая аминокислоты, глицериновая смесь, «лаковая кровь» и теллуриды калия.

С целью приготовления кровяных теллуриновых сред в агаровые основы (pH — 7,6) добавляют *extemporae* кровь (на 100 мл питательной агаровой основы 7 мл гемолизированной крови) и теллуриды калия (2 мл 2% раствора теллурита калия) или используют кровяную теллуриновую смесь. Лучше всего использовать дефибринированную кровь животных: крупного рогатого скота, овец, свиней, лошадей, кроликов, допускается использование крови человека (цитратной или консервированной), эритроцитарной массы и кровяных сгустков, из которых готовят специальные кровяные смеси. Перед внесением в основу дефибринированную кровь обычно гемолизуют, получая так называемую «лаковую» кровь.

Теллуриды калия включены в питательные среды в качестве ингибитора сопутствующей микрофлоры, т. к. он в определенных концентрациях не препятствует росту подавляющего большинства штаммов коринебактерий дифтерии. *C. diphtheriae* формирует на средах, содержащих теллуриды калия, колонии темно-серого или черного цвета, т. к. за счет продукции теллуридредуктазы происходит восстановление металлического теллура и его накопление в клетках бактерий (см. рис. 1.1, 1.2).

Питательные среды разливают по чашкам Петри слоем 3–4 мм. Они должны быть использованы в течение 3 сут, при условии хранения при температуре 4 °С.

Отдельного описания заслуживает коринебакагар, разработанный сотрудниками отдела питательных сред ФБУН ГНЦ ПМБ Оболенска и широко используемый в последние годы в практике российских бактериологических лабораторий. Коринебакагар выгодно отличается высокими ростовыми и ингибирующими показателями в сочетании с простотой приготовления в лабораторных условиях, исключающей необходимость внесения *extemporae* кровяных добавок. Данная среда содержит в качестве заместителя крови стимулятор роста гемофильных микроорганизмов (СРГМ) в количестве 10,0 г/л, получаемый путем ферментативного гидролиза суспензии черного альбумина с последующей

сушкой методом распыления. Введение в состав среды СРГМ позволило получить питательную среду, биологические свойства которой находятся на уровне кровяного теллуритового агара и среды Клауберга II.

С целью улучшения биологических показателей коринебакагара предусмотрено введение в состав среды панкреатического гидролизата рыбной муки (20,0 г/л) в качестве источника азота и глюкозы (0,5 г/л), а также уменьшение содержания агара (до 11,0 г/л) и теллурита калия (12,5 мл/л 2% раствора), поскольку высокие прочность студня среды и концентрация теллурита калия снижают ростовые свойства среды.

Качество данной питательной среды проконтролировано с использованием тест-штаммов *C. diphtheriae gravis* 3649, *C. diphtheriae mitis* 143, *C. xerosis* 1911, *S. aureus* FDA 209-P (ATCC 6538-P), *S. pyogenes* Dick 1 в регламентированном порядке.

Разработанная питательная среда — коринебакагар — обеспечивает питательные потребности тест-штаммов *C. diphtheriae*, а 2% раствор теллурита калия в количестве 12,5 л/л полностью ингибирует рост *S. aureus* FDA 209-P (ATCC 6538-P) и *S. pyogenes* Dick 1 из разведений 10^{-4} . Среда не только обладает высокой ростовой чувствительностью (10^{-7}) в отношении всех испытуемых штаммов дифтерийных бактерий, но и позволяет сократить сроки культивирования. Множественный рост характерных колоний на ней появлялся уже через 20–24 ч, т. е. ранее традиционного срока культивирования на подобных средах. При выращивании дифтерийных бактерий на кровяной теллуритовой среде единичные колонии возбудителя появляются не ранее, чем через 20–24 ч, а достаточное их количество, необходимое для дальнейшего проведения бактериологической диагностики, нередко вырастает через 48 ч (см. рис. 1.4, 1.5, цветная вклейка).

При проведении Государственных испытаний в ГИСК им. Л.А. Тарасевича использовано 85 штаммов из коллекции ГИСК им. Л.А. Тарасевича, из них 54 токсигенных и нетоксигенных штаммов различных видов и биоваров коринебактерий. Результаты испытаний продемонстрировали, что в 90,3 % случаев на коринебакагаре число колоний возбудителя дифтерии и их величина сравнимы или

превосходили таковые на контрольной среде (Клауберга II). При этом выросшие микроорганизмы полностью сохраняли типичные для коринебактерий культуральные, морфологические, токсигенные и биохимические свойства. Испытания среды с применением коллекционных, а в последующем и свежевыделенных из клинического материала штаммов подтвердили возможность использования коринебакагара в медицинских целях.

Тем не менее разработка новых питательных сред, обеспечивающих оптимальные условия для выделения и накопления дифтерийных бактерий при минимальном их содержании в анализе, остается актуальной проблемой лабораторной диагностики дифтерии. В связи с этим нами разработана двухфазная питательная среда для культивирования *C. diphtheriae* с улучшенными ростовыми свойствами и не требующая добавления крови [135].

В качестве основы для роста микроорганизмов в состав плотной фазы питательной среды введены панкреатический гидролизат рыбной муки, СРГМ, дрожжевой экстракт; жидкой фазы — дрожжевой экстракт и сыворотка крови крупного рогатого скота. В качестве источника энергии и в жидкую, и в плотную фазу добавлена глюкоза. Все компоненты разводились в дистиллированной воде. Для получения плотной фазы использован агар микробиологический, жидкой фазы — пептон ферментативный. В качестве ингибитора роста сопутствующей микрофлоры использован теллурит калия.

Контроль качества питательной среды осуществлялся с помощью тест-штаммов (*C. diphtheriae gravis tox⁺*, ВН, серотип 2, штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), полученных из Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича (ГИСК) Роспотребнадзора ГУ и штамма *C. diphtheriae gravis tox⁺*, выделенного от больного дифтерией.

В соответствии с методическими указаниями [111] определялись чувствительность среды, показатель прорастания и скорость роста дифтерийных бактерий.

В качестве контрольной среды использовался кровяной теллуритовый агар.

Проверку чувствительности питательной среды производили путем посева 0,1 мл микробной взвеси тест-штаммов из разведений 10^{-7} (1000 м. к./мл) и 10^{-8} (100 м. к./мл) в жидкую фазу питательной среды для культивирования дифтерийных бактерий в трех повторностях.

Установлено, что разработанная двухфазная питательная среда полностью обеспечивала питательные потребности *C. diphtheriae*. Добавленный в среду 2% раствор теллурита калия (13 мл/л) ингибировал рост микробов-ассоциантов, содержащихся в анализе.

Использование жидкой фазы при первичном посеве дифтерийных бактерий способствовало их интенсивному размножению и обильному накоплению в течение первых 4 ч культивирования.

Анализ результатов сравнительного изучения ростовых свойств разработанной и контрольной питательных сред, полученных при проведении лабораторных испытаний, свидетельствует о том, что разработанная питательная среда обладает достоверно более высокой чувствительностью в отношении всех испытуемых штаммов, чем контрольная (показатели чувствительности соответственно 10 КОЕ, разведение 10^{-8} и 100 КОЕ, разведение 10^{-7} ; показатели прорастания — 254–270 и 38–39 %). Отчетливо видимые колонии дифтерийных бактерий на агаровой части предлагаемой двухфазной среды появлялись через 13,5–14 ч от момента посева (рис. 8.1 а, б, см. также цветную вклейку III).

По всей видимости, двухфазность питательной среды и введение дополнительных стимуляторов роста повышают показатели ростовых свойств питательной среды за счет сокращения логарифмической фазы роста дифтерийных бактерий в процессе культивирования.

Представленные показатели ростовых свойств двухфазной питательной среды свидетельствуют о том, что использование этой среды при проведении бактериологических исследований может способствовать повышению эффективности диагностики дифтерии.

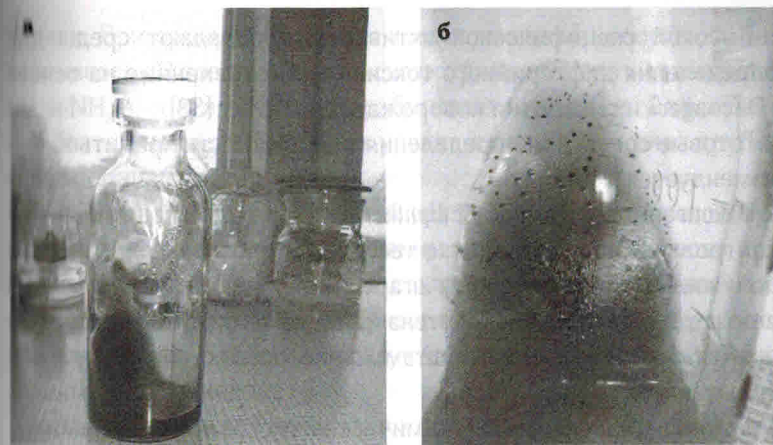


Рис. 8.1. Двухфазная питательная среда для культивирования дифтерийных бактерий:

а — флакон со средой; б — рост *Corynebacterium diphtheriae gravis tox+* на поверхности плотной фазы среды

8.1.3. Среда для определения токсигенных и биохимических свойств

Для определения токсигенных свойств коринебактерий дифтерии используют коммерческую сухую питательную среду для определения токсина дифтерийного микроба (ОТДМ) или коринетоксагара, в которые добавляют 20 % сыворотки крупного рогатого скота или крови лошади [110]. При приготовлении среды для определения токсигенности строго придерживаются прописи, прилагаемой к сухой коммерческой среде. Питательный агар расплавляют в водяной бане при 90 °С, вынимают из бани, охлаждают до 50 °С и добавляют к 10 мл питательного агара 2 мл сыворотки крупного рогатого скота или лошади, перемешивают и выливают в стерильную чашку Петри.

Показана [64] возможность применения в лабораторной практике сред для определения токсигенности, приготовленных на основе колумбийского агара (Columbiaagar, «Bovin Serum Adult» и Columbiaagar, «Newborn Calf»). Результаты определения токсигенности коринебактерий дифтерии при использовании коринетоксагара и колумбийского агара идентичны.

Высокой специфической активностью обладают среды для определения дифтерийного токсина, приготовленные на основе «Difcoagar» и сыворотки новорожденных телят [33].

Готовые среды для определения токсигенности хранить не рекомендуется [110].

Токсигенные штаммы *C. diphtheriae*, используемые в качестве контрольных при постановке теста на токсигенность, хранят на полужидком сывороточном агаре. Полужидкий сывороточный агар готовят на бульоне Мартена или другом питательном бульоне. Культуры контрольных штаммов пересевают один раз в месяц, хранят в холодильнике.

Одним из ключевых биохимических тестов для фенотипической идентификации коринебактерий является определение цистиназной активности. Среда Пизу содержит нормальную сыворотку, L-цистин и уксусно-кислый свинец [79]. При воздействии цистиназы на L-цистин выделяется сероводород, который вступает в реакцию с уксусно-кислым свинцом, в результате образуется сернистый свинец PbS — соединение темно-коричневого цвета, дающее почернение среды по ходу укола и коричневое «облачко» в конце его. Процесс ферментации цистина наиболее активно происходит в анаэробных условиях, именно поэтому положительная реакция в виде «облачка» по ходу укола в основном проявляется в глубине среды [76].

В лабораторных условиях среду Пизу готовят на основе 1,5% мартеновского агара или на основе коммерческой среды АГВ, строго соблюдая все режимы, предусмотренные инструкцией. Лучшей основой при приготовлении среды для определения токсигенности и пробы Пизу остается мартеновский пептон [110].

В настоящее время с этой целью в основном используют коммерческую среду Пизу, в состав которой входит висмут цитрат вместо уксусно-кислого свинца. Положительные результаты на готовых к употреблению коммерческих средах могут выявляться через 6–8 ч [114].

Уреазную активность коринебактерий определяют в 2 вариантах: по методу Заксе и путем посева на бульон с мочевиной и индикатором. Проба Заксе позволяет определять уреазу в течение

10 мин. При продукции уреазы исследуемым микроорганизмом изменяется pH среды, т. к. происходит расщепление мочевины до CO_2 и NH_3 и, соответственно, срабатывает индикатор. Дифтерийные бактерии не продуцируют уреазу, в отличие от ряда других видов коринебактерий.

Для определения способности разлагать углеводы используют среды ряда Гисса, приготовленные на 1% пептонной воде, содержащие 1 % сахаров (глюкоза, сахароза, мальтоза) или по 0,5 % растворимого крахмала, декстрина, а также индикатор Андрее. При разложении углевода образуется кислота, в результате чего индикатор pH изменяет цвет.

Тесты на уреазу и нитратредуктазу позволяют дифференцировать *C. diphtheriae* и *C. ulcerans*. Для постановки теста на нитратредуктазу используют МПБ или бульон Хоттингера, свободные от нитритов, и содержащие 0,1 % нитрата калия. Исследуемый штамм культивируют на данной среде, а затем определяют нитратредуктазу, добавляя реактив Грисса. Если происходит образование нитритов, среда окрашивается в красный цвет [110]. Тест на нитратредуктазу позволяет также дифференцировать биотипы *C. diphtheriae mitis* и *C. diphtheriae mitis* var. *belfanti*.

8.2. Методы лабораторного контроля питательных сред

Необходимым условием проведения бактериологического исследования на дифтерию является постоянный контроль качества питательных сред.

В практических и научно-исследовательских лабораториях контроль качества питательных сред должен включать оценку физико-химических свойств и специфической активности по биологическим показателям.

Набор показателей для определения специфической активности каждой среды определяется ее назначением. Специфическая активность питательных сред, используемых для бактериологической диагностики дифтерии, оценивается по показателям стабильности основных биологических свойств микроорганизмов