

МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

Под редакцией Лауреата Государственной премии СССР
доктора медицинских наук
профессора А. М. Королюка
и доктора медицинских наук
доцента В. Б. Сбойчакова

1999



ПРЕДИСЛОВИЕ

Четвертое издание учебного пособия к лабораторным занятиям по медицинской микробиологии для студентов медицинских ВУЗов написано авторским коллективом кафедр микробиологии Военно-медицинской академии и Санкт-Петербургской государственной педиатрической медицинской академии. Пособие издано в трех частях. В первую часть входят разделы "Основы техники бактериологических и иммунологических исследований" и "Частная бактериология".

Третье издание первой части учебного пособия вышло в 1983 г. За это время появились новые методы идентификации бактерий, расширился круг иммуномикробиологических методов.

Впервые представлены методы лабораторной диагностики таких актуальных инфекций, как легионеллез, болезнь Лайма и другие.

Авторами учтены последние достижения науки, при составлении пособия использованы современные инструктивно-методические материалы. Учебное пособие предназначено для самостоятельной подготовки студентов к лабораторным занятиям, но может быть полезно и для врачей-бактериологов санитарно-эпидемиологических и лечебных учреждений.

ОСНОВЫ ТЕХНИКИ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УСТРОЙСТВО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ И ПРАВИЛА РАБОТЫ В НЕЙ

Микробиологическая лаборатория в зависимости от ее профиля обеспечивается необходимым для работы количеством помещений: гардероб для персонала, препараторская, бактериологическая комната с боксами для работы с отдельными группами бактерий и вирусов, средоварочная, моечная, стерилизационная, виварий с отдельным содержанием здоровых и подопытных животных. Помещения лаборатории, в которых проводится работа с возбудителями заразных болезней, располагаются в отдельном здании или его изолированной части и имеют не менее двух входов.

Лабораторию оборудуют водопроводом, канализацией, центральным отоплением, обеспечивают электроэнергией, горячим водоснабжением и газифицируют. При отсутствии в населенном пункте водопровода и канализации устраивают местный водопровод, канализацию и очистные сооружения с устройствами для обеззараживания сточных вод.

В лаборатории устанавливают водопроводные раковины для мытья рук персонала и раковины для мытья посуды и инвентаря.

Все помещения лаборатории обеспечиваются естественным и искусственным освещением, отвечающим требованиям, предусмотренным строительными нормами и правилами. Рабочие столы в лаборатории размещаются так, чтобы свет падал сбоку, с левой стороны.

Помещения лаборатории оборудуют легко открываемыми фрамугами (форточками), которые в летнее время закрываются мелкоячеистыми сетками.

Стены в лабораторных помещениях облицовывают высотой в 1,5 м кафелем или красят масляной краской светлых тонов; в боксах и виварии стены и потолок красят масляной краской. Полы покрывают линолеумом, в боксах и виварии - гладкой плиткой.

Лабораторную мебель красят масляной или эмалевой краской светлых тонов, рабочие поверхности столов покрывают пластиком или другим материалом, не портящимся от применения дезинфектантов. Внутренние и наружные поверхности мебели должны быть без щелей и пазов, затрудняющих проведение дезинфекции.

Температура воздуха в лабораторных помещениях поддерживается в пределах 18-21°С, в районах с жарким климатом они оборудуются кондиционерами.

Помещения лаборатории должны быть непроницаемы для грызунов.

Каждый сотрудник лаборатории должен иметь закрепленное за ним рабочее место. Перед началом работы надевается спендежда, которая хранится в индивидуальных шкафчиках отдельно от верхней одежды. Тип защитного костюма и частота его смены определяются в зависимости от характера работы.

Выполняя микробиологические исследования, необходимо соблюдать следующие правила:

- с инфицированным материалом работают только с помощью инструментов (шпатель, петля, корнцанги и пр.);

- прикасаться руками к исследуемому материалу и конденсату в засеянных чашках запрещается;

- перед работой тщательно проверяют целостность стеклянной посуды, проходимость игл и надежность поршней шприцев;

- при посеве материала делают надпись на пробирках, чашках Петри, колбах, флаконах с названием номера анализа (культуры) и даты посева;

- в пробирки и чашки Петри материал высевают вблизи от огня горелки с обжиганием петли, шпателя, краев пробирки;

- во время работы все чашки с посевами помещают в кюветы или на подносы, пробирки - в штативы;

- растворы, содержащие патогенные микроорганизмы, набирают пипеткой с помощью резинового баллона;

- засасывать ртом и переливать растворы из сосуда в сосуд через край нельзя;

- по окончании работы запрещается оставлять на рабочих столах нефиксированные мазки, чашки Петри, пробирки и другую посуду с инфицированным материалом.

Доставлять инфицированный материал в лабораторию и переносить его из одной лаборатории в другую на территории учреждения

нужно в специально приспособленной посуде (металлических биксах, ящиках, баках).

В комнатах, предназначенных для обработки и посева инфекционного материала, нельзя проводить другие работы, выращивать цветы, держать домашних животных.

Принимать пищу, пить, курить, хранить продукты питания в помещениях, где работают с материалом, зараженным патогенными микроорганизмами или подозрительным на такое заражение, запрещается.

Центрифугирование инфекционного материала проводит специально обученный персонал. Если в процессе центрифугирования разбивается пробирка, содержащая инфекционный материал, центрифугу отключают от сети, дезинфицируют, а загрязненные места очищают.

Термостаты и термостатные комнаты, предназначенные для выращивания патогенных микроорганизмов, дезинфицируют не реже одного раза в месяц.

При хранении инфекционных материалов в холодильнике необходимо принимать меры, предупреждающие его инфицирование. Оттаивание холодильника, предусмотренное правилами эксплуатации, нужно совмещать с его дезинфекцией.

В процессе эксплуатации паровых стерилизаторов, помимо выполнения "Правил устройства и безопасности эксплуатации сосудов, работающих под давлением", необходимо соблюдать следующие требования:

- сдавать под расписку лицу, работающему на паровом стерилизаторе, опломбированные баки и другую посуду с инфекционным материалом, не открывать их до стерилизации;
- вести журнал стерилизации;
- при открывании крышки парового стерилизатора защищать руки от ожогов;
- обеззараживать в конце рабочего дня помещение стерилизационной.

До начала работы помещение лаборатории убирают влажным способом. Пыль с поверхности столов, приборов, оборудования, полокоников стирают чистой тряпкой, увлажненной дезинфицирующим раствором. Полы протирают тряпкой, смоченной 3% раствором хлорамина (карболовой кислоты).

В ходе работы и по ее окончании применяют следующие способы дезинфекции:

- использованные при лабораторных исследованиях предметные

стекла, пипетки, шпатели погружают на сутки в банки с дезинфицирующим раствором, затем моют и кипятят;

- отработанные чашки Петри и пробирки с посевами патогенных культур, посуду с использованным материалом, взятым от инфекционных больных, собирают в банки с крышками и стерилизуют паром под давлением;

- трупы зараженных животных помещают в сосуд с дезинфицирующим раствором и по окончании рабочего дня сжигают в специальных печах (крематориях) или автоклавируют в течение часа при температуре 120°C;

- поверхности рабочих столов обрабатывают дезинфицирующим раствором;

- помещения боксов дезинфицируют с помощью бактерицидных ламп и путем обтирания оборудования, стен и столов дезинфицирующим раствором, бактерицидные лампы включают только в отсутствие персонала;

- руки обмывают дезинфицирующим раствором с последующим мытьем с мылом.

Во время проведения дезинфекционных работ персонал лаборатории обязан надевать резиновые перчатки.

При перерыве в работе с инфекционным материалом, выходе из помещения лаборатории, бокса, а также по окончании работы, уборки рабочего места и помещений лаборатории сотрудники должны дезинфицировать руки и мыть их с мылом.

В лаборатории должна быть укомплектованная аптечка для экстренной профилактики и оказания медицинской помощи. В аптечке содержатся этиловый спирт, настойка йода, сухой марганцовокислый калий, перевязочные средства, сухие навески протаргола и азотнокислого серебра, которые можно растворять в мерном объеме дистиллированной воды для получения 1% раствора, а также необходимый набор антибиотиков с неизменным сроком годности.

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В связи с малыми размерами большинства патогенных микроорганизмов (не более 2-10 мкм) изучение их морфологии возможно только с помощью специальных оптических приборов, получивших название микроскопов (от лат. Micros - малый и Scoperein - рассматривать, наблюдать), дающих значительное увеличение и обладающих

высокой разрешающей способностью, то есть наименьшим расстоянием между двумя точками, дающими в поле зрения раздельное изображение.

Разрешающая способность человеческого глаза превышает 80 мкм. Размеры патогенных микроорганизмов меньше указанной величины, поэтому мы их не видим. Более того, микроорганизмы, расположенные друг к другу ближе 80 мкм, раздельно не воспринимаются. Современные микроскопы позволяют получать раздельное увеличенное изображение микроорганизмов и других объектов и структур, не доступных невооруженному человеческому глазу.

В настоящее время в практике микробиологических исследований используют несколько типов микроскопов (биологический, люминесцентный, исследовательский, электронный) и специальных методов микроскопии (темнопольный, фазово-контрастный).

Биологический микроскоп

Для микроскопических исследований применяют биологические микроскопы отечественных моделей: БИОЛАМ Р-11, БИОЛАМ Р-15, БИОЛАМ -17, БИОЛАМ С-11, БИОЛАМ П-1, БИОЛАМ И (микроскопы Р-рабочие, С-студенческие).

Современный биологический микроскоп - сложный оптический прибор, позволяющий изучать объекты в проходящем свете, в светлом и темном поле, а также в отраженном свете. Все эти микроскопы обеспечивают достаточно большое увеличение и высокую разрешающую способность (до 0,4 мкм).

Биологический микроскоп состоит из двух систем - механической и оптической.

1. Механическая система микроскопа: а) штатив; б) колонка; в) тубус (съёмный, наклонный - в современных моделях); г) подвижный предметный столик; д) макрометрический винт для грубой (ориентировочной) настройки на резкость; е) микрометрический винт, обеспечивающий тонкую фокусировку препарата; ж) револьвер для объективов.

2. Оптическая система микроскопа содержит две части: осветительную и наблюдательную. Осветительная часть состоит из зеркала и конденсора с присовой апертурной диафрагмой. Зеркало имеет две отражательные поверхности: плоскую и вогнутую. С помощью конденсора лучи, идущие от зеркала, фиксируются и направляются на препарат. Яркость освещения регулируется присовой диафрагмой.

Наблюдательную часть микроскопа составляют объектив и окуляр. В микроскопах с наклонным тубусом имеется специальная призма, направляющая лучи под углом 45° к вертикали.

Объективы микроскопа отличаются сложным устройством и состоят из нескольких отдельных линз: фронтальной (нижней) линзы, увеличивающей объект, и коррекционных, исправляющих недостатки оптического изображения. Обычно применяют *ахроматические* объективы, в которых устранена *хроматическая абберация* в отношении наиболее ярких цветов спектра (окрашивание изображения в различные цвета благодаря различной преломляемости лучей с различной длиной волны) и *сферическая абберация* (нечеткое изображение периферических частей рассматриваемого предмета). Ахроматические объективы дают отчетливое, почти бесцветное изображение, поэтому они особенно эффективны при микрофотографировании (в них достаточно устранен остаточный хроматизм и достигнута равномерность резкости и величины изображения в лучах с разной длиной волны). Подобную оптику имеет БИОЛАМ Р-17 (объективы-апохроматы 10х, 20х, 60х, 90х МИ).

Объективы разделяют на *сухие* и *иммерсионные* (от лат. *immersio* - погружение). Обычно биологические микроскопы оснащают двумя сухими объективами (8х и 40х) и одним иммерсионным (90х МИ), однако последние модели помимо указанных объективов оснащены более совершенной и разнообразной оптикой (апохроматы БИОЛАМ Р-17 планапохроматы БИОЛАМ И). Данные о каждом объективе обозначены на его оправе: 1) увеличение х8, х40, х90; 2) численная (нумерическая) аппаратура; 3) заводской номер объектива. Наряду с этими обозначениями иммерсионные объективы х90 (х100 БИОЛАМ И) имеют дополнительный буквенный индекс ОИ или МИ (объектив иммерсионный или микроскоп), а также черную маркировочную линию в нижней части объектива.

Фронтальная линза иммерсионного объектива имеет короткое фокусное расстояние - 1,5-3 мм. При микроскопии ее погружают в каплю предварительно нанесенного на препарат иммерсионного масла, показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла - 1,52. При этом устраняются неизбежные потери света при попадании в объектив (рис.1).

Окуляры состоят из двух линз: верхней - глазной и нижней - собирающей. На оправе окуляров обозначено увеличение: х5 (22 мм), х7

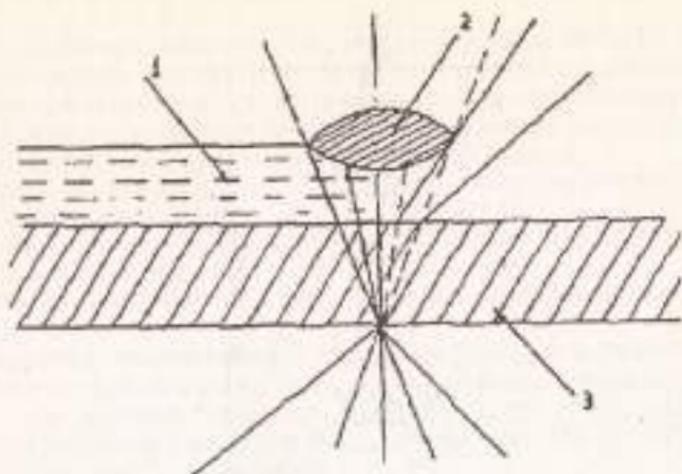


Рис. 1. Ход лучей в иммерсионной системе.

1 - иммерсионное масло $n=1,515$; 2 - фронтальная линза иммерсионного объектива; 3 - предметное стекло $n=1,52$

(18 мм), $\times 10$ (13 мм), $\times 15$ (11 мм). Окуляры подобны лупе и лишь увеличивают изображение, полученное объективом микроскопа. Порядок прохождения лучей света в микроскопе показан на рисунке 2.

Общее увеличение микроскопа определяют произведением увеличений объектива и окуляра. Например, увеличение микроскопа с иммерсионным объективом $\times 90$ и окуляром $\times 10$ составляет: $90 \times 10 = 900$ раз. Полезное увеличение микроскопа может достигать 2000 раз, в повседневной же практике обычно используют увеличение порядка 630-900 раз.

Для полного использования разрешающей способности микроскопа необходимо хорошо знать его устройство и прежде всего правильно осветить исследуемый объект. Освещение объектов может быть осуществлено естественным (дневным) или искусственным светом (БИОЛАМ Р-11, БИОЛАМ Р-15, БИОЛАМ Р-17, БИОЛАМ С-11), во многих моделях микроскопов предусмотрено исследование объектов только при искусственном свете, так как они оснащены встроенным осветителем, в котором источником света являются лампы КГМН 6-30 (БИОЛАМ П-1), КГМ 9-70 (БИОЛАМ И) и КГМ 6-20 (ЕС БИМАМ Р-11, ЕС БИМАМ Р-13, ЕС БИМАМ Р-31). При

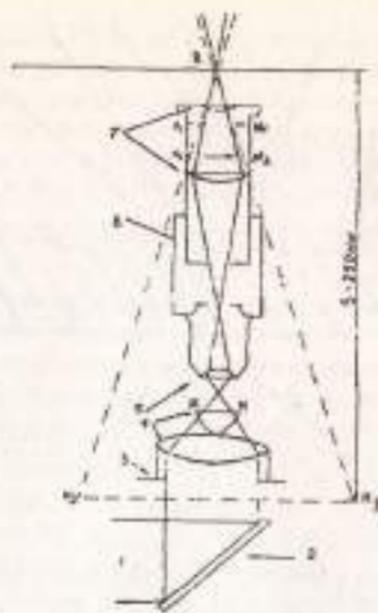


Рис. 2. Ход лучей в микроскопе.

1 - источник света; 2 - зеркало; 3 - диафрагма конденсора; 4 - линзы конденсора; 5 - фронтальная линза объектива; 6 - тубус; 7 - линзы окуляра; 8 - глаз наблюдателя; $MN-N_1M_1-N_2M_2$ - промежуточные изображения объекта; N_3M_3 - окончательное изображение объекта; S - расстояние от глаза наблюдателя до окончательного изображения.

повседневной работе целесообразно пропускать искусственный свет через матовый светофильтр конденсора.

При работе с микроскопами, у которых встроены источник света отсутствует, рекомендуется использовать следующие приемы в определенной последовательности.

1. Подготовить микроскоп для работы: зеркало с плоской поверхностью (вогнутое зеркало применяют очень редко, как правило при работе с объективами малых увеличений и без конденсора), конденсор поднять в верхнее положение до упора, диафрагму конденсора полностью открыть, поворотом револьвера включить сухой объектив (40 x 0,65), поставить матовый светофильтр.

2. Исследуемый препарат установить на предметном столике и закрепить специальными клеммами.

3. Повернуть зеркало таким образом, чтобы поле зрения микроскопа было освещено наиболее ярко.

4. Подняв или опуская тубус макрометрическим винтом, найти плоскость препарата и при необходимости рассмотреть его под малым увеличением.
5. Поворотом револьвера включить иммерсионную систему (объектив 90 x 1,25) и на препарат нанести каплю иммерсионного масла.
6. Под контролем глаза осторожно погрузить в масло.
7. Проверить освещенность поля зрения и наклоном зеркала улучшить освещенность препарата.
8. Вращением макрометрического винта произвести грубую фокусировку изучаемого препарата.
9. Детали исследуемого объекта рассмотреть, вращая микрометрический винт.
10. Яркость освещения объекта отрегулировать только диафрагмой конденсора (не рекомендуют с этой целью менять положение конденсора). При смене препаратов операции с первой по пятую повторяют. При работе со специальными осветителями (типа ОИ-32, ОИ-35 и др.) нужно поступать следующим образом.
 1. Микроскоп подготовить к работе обычным порядком. Зеркало взять с плоской поверхностью.
 2. Осветитель установить перед микроскопом с помощью соединительной планки, прилагаемой к осветителю, или, если ее нет, на расстоянии 20 см от зеркала.
 3. Световой поток направить на зеркало, для чего корпус осветителя необходимо наклонить.
 4. Закрыв диафрагму осветителя и перемещая патрон лампы вдоль оси, добиться четкого изображения ее нити на закрытой диафрагме конденсора.
 5. На предметный столик микроскопа установить и укрепить клеммами препарат.
 6. Открыв диафрагму конденсора и осветителя при малом или среднем увеличении (объективы x8 или x40), найти оптическую плоскость препарата.
 7. Закрыв диафрагму осветителя и слегка передвигая зеркало, установить изображение диафрагмы осветителя в центр поля зрения микроскопа.
 8. Перемещая конденсор микроскопа по вертикали, получить наиболее четкое изображение границ диафрагмы осветителя. После этого конденсор не подлежит передвижению. Освещение препарата можно уменьшить при помощи диафрагмы конденсора.
 9. Под контролем глаза раскрыть диафрагму осветителя, пока свет не зальет почти полностью поле зрения микроскопа. Дальнейшее раскрытие диафрагмы осветителя не улучшает освещения исследуемого объекта.
 10. На препарат нанести каплю масла, на тубусе установить иммерсионный объектив, отрегулировать освещение исследуемого объекта и приступить к микроскопии.

Точное исполнение изложенных приемов настройки освещения (по Келеру) является необходимым условием при специальных по-

следованиях (микрофотографии, установке фазово-контрастного устройства и т.д.).

Иммерсионный микроскоп содержат в чистоте и предохраняют от механических повреждений. При соблюдении этих требований микроскоп может безотказно работать более продолжительное время. После работы с объектива обязательно удаляют иммерсионное масло.

Дополнительные приспособления к биологическому микроскопу

Дополнительные приспособления позволяют максимально использовать все возможности биологического микроскопа, облегчают условия работы и значительно расширяют диапазон его применения. В микробиологии наиболее часто применяются следующие приспособления.

1. Темнопольные конденсоры: кардионд-конденсор и парабононд-конденсор.

2. Фазово-контрастные приспособления: КФ-4 и другие модели.

3. Бинокулярная насадка: АУ-12 и другие модели. Приближают микроскоп к условиям естественного зрения. Многие модели микроскопов имеют собственные бинокуляры: БИОЛАМ Р-15, БИОЛАМ Р-17, БИОЛАМ П-1.

4. Осветители: ОИ-32, ОИ-35 и другие модели. Источники искусственного света обеспечивают оптимальное и стабильное освещение, интенсивность света в них регулируют реостатом.

5. Микрометры: окуляр-микрометр и объект-микрометр. Используют для измерения микроскопических объектов.

6. Нагревательный столик. Устанавливают вместо предметного и таким образом обеспечивают постоянную температуру 37°C. Применяют для длительного наблюдения за живыми микроорганизмами.

7. Рисовальный столик. Используют для высококачественной зарисовки препарата. С его помощью можно одновременно видеть изображение объекта и бумаги, расположенной на столе вблизи микроскопа, и обводить на бумаге контуры объекта.

8. Оптические светофильтры: цветные, нейтральные, тепловые. Устанавливают между источником света и микроскопом, применяют при микрофотографии и специальных методах микроскопии.

9. Микрофотонасадки: МФН-11, МФН-12 и другие модели. Используют для фотографирования микроскопических объектов.

10. Микрокиноустановки. Предназначены для центрифужной (пре-

рышной) микросъемки в сочетании с фазово-контрастной микроскопией. Позволяют изучать динамику роста и размножения микроорганизмов, влияние на них разных факторов и многие другие вопросы.

Микроскоп с конденсором темного поля

Метод микроскопии в темном поле впервые был предложен австрийскими учеными Р. Зигмонди и Р. Зидентопфом в 1903 г. Этот метод позволяет обнаружить ультрамикроскопические частицы, которые по своим размерам во много раз меньше предела разрешения биологического микроскопа. Непосредственно определить форму и истинные размеры частиц с помощью указанного метода не удастся, т.к. в результате выраженных явлений дифракции света их изображение в микроскопе будет представляться в виде дифракционных дисков.

В микробиологии конденсор темного поля нашел применение для повышения контрастности изображения, что имеет большое значение для изучения подвижности бактерий, которые в живом состоянии слабоконтрастны и не видны в обычном микроскопе.

Микроскопия в темном поле основана на явлениях дифракции света при сильном боковом освещении взвешенных в жидкости мельчайших частиц (эффект Тиндаля - свечение пылинок в воздухе темного помещения, в которое солнечный луч проникает через небольшую щель).

Для создания темного поля в биологическом микроскопе применяют: 1) щелевой метод; 2) затемнение в объективе; 3) специальные конденсоры - параболоид-конденсор или кардионд-конденсор, которыми заменяют конденсор в биологическом микроскопе.

Параболоид-конденсор имеет в центре затемнение, задерживающее центральные лучи света, и внутреннюю вогнутую зеркальную поверхность для отражения краевых лучей. В кардионд-конденсоре лучи сначала отражаются от выпуклой зеркальной поверхности, затем от вогнутой. Краевые лучи, выходящие из темнопольного конденсора, проходят в косом направлении и не попадают в объектив, поэтому поле зрения микроскопа остается темным. В объектив попадают лучи, отраженные от объекта, в связи с чем в поле зрения можно наблюдать характерное изображение на темном поле зрения ярко светятся микробные клетки и другие частицы, находящиеся в препарате.

В качестве источников света для микроскопа с конденсором темного поля используют сильные осветители (ОИ-32, ОИ-35). Настройку освещения и установку препарата ("раздавленная капля") произ-

водят, руководствуясь изложенными выше правилами работы с биологическим микроскопом. Рекомендуется употреблять сухие объективы и предметные стекла толщиной 0,8-1,2 мм. Работа с темнопольным конденсором осуществляется в определенной последовательности.

1. После настройки освещения и установки препарата заменяют обычный конденсор темнопольным.
2. На верхнюю линзу опущенного конденсора наносят каплю жидкости (кедровое масло, дистиллированная вода), поднимают его вверх до тех пор, пока эта капля не коснется предметного стекла и не распространится по нему.
3. Вращением макрометрического и микрометрического винтов производят фокусировку изучаемого препарата, при этом в поле зрения должно появиться светлое кольцо с темным пятном посредине.
4. Поднимают конденсор до появления светлого пятна (если форма светлого пятна или кольца неправильная, значит капля иммерсионной жидкости мала).
5. Винтами конденсора выводят пятно в центр поля зрения и приступают к исследованию.

При работе с иммерсионными объективами необходимо для уменьшения апертуры объектива внутрь него вложить специальную диафрагму, имеющуюся в наборе конденсора темного поля. При смене объективов конденсор дополнительно настраивают винтами.

Фазово-контрастный микроскоп

Метод фазового контраста, разработанный голландским физиком Ф.Цернике в 1935 г., позволяет наблюдать слабоконтрастные биологические объекты (микроорганизмы, растительные клетки) в неокрашенном состоянии, получая при этом контрастное их изображение. В отличие от микроскопа с конденсором темного поля, выявляющего лишь контуры объекта, метод фазового контраста позволяет увидеть элементы внутренней структуры рассматриваемого прозрачного объекта.

Известно, что качество микроскопии во многом определяется контрастностью объектов, которые в зависимости от светопоглощения подразделяются на "амплитудные" и "фазовые".

Амплитудные объекты характеризуются различным светопоглощением, поэтому они изменяют амплитуду (интенсивность) проходящего через них света. К амплитудным объектам относятся все окрашенные препараты, которые изображаются с большим или меньшим контрастом.

Фазовые объекты имеют одинаковое светопоглощение на разных участках, но отличаются по оптической плотности. При прохождении света через такие объекты амплитуда его не меняется, а изменяется фаза колебания, что не фиксируется глазом. К фазовым объектам относятся живые неокрашенные микроорганизмы, изображение которых в обычном микроскопе отличаются малой контрастностью.

Фазово-контрастный микроскоп дает возможность преобразовывать фазовые изменения световых волн, проходящих через объект, в амплитудные, в результате чего даже прозрачные микроорганизмы становятся видимыми. Прозрачные биологические объекты при фазово-контрастной микроскопии характеризуются достаточно высокой контрастностью - в зависимости от фазовой пластинки они могут давать темные изображения на более светлом поле (явление положительного фазового контраста) или же светлые изображения на темном поле (явление отрицательного фазового контраста). Тип прибора обычно указан в его паспорте.

Для фазово-контрастной микроскопии используют обычный микроскоп и дополнительное фазово-контрастное приспособление КФ-4, в комплект которого входят следующие предметы:

1. Объективы с фазовым кольцами, изменяющие фазу и уменьшающие амплитуду световой волны. На их оправе обозначен дополнительный индекс "Ф" - Ф x 10, Ф x 20, Ф x 40, Ф x 90.
2. Фазовый конденсор с револьвером кольцевых диафрагм для каждого объектива. Индексом "О" обозначено отверстие с присовой диафрагмой для наблюдения препарата обычным методом.
3. Вспомогательный микроскоп малого увеличения, которым заменяют окуляр при наблюдении за настройкой освещения.

При фазово-контрастной микроскопии используют осветители типов ОИ-32 или ОИ-35.

Для исследования методом фазового контраста готовят влажные препараты типа "раздавленная капля". Желательно для этой цели отбирать тонкие стекла. Для длительного наблюдения покровное стекло по краям закрепляют пакелином.

Последовательность работы с фазово-контрастным устройством следующая.

1. Заменяют конденсор микроскопа специальным фазово-контрастным конденсором и устанавливают его таким образом, чтобы при подъеме фронтальная линза находилась на уровне предметного столика. Револьвером включают кольцевую диафрагму "О".
2. Обычные объективы заменяют фазовыми.
3. Помещают препарат на предметный столик микроскопа.
4. Макрометрическим винтом добиваются точной фокусировки на плоскость исследуемого препарата.

5. Установить освещение по правилам Келера, которые изложены выше, после чего в положении осветительной лампы, зеркала и конденсора никаких изменений не допускается.
6. Вместо окуляра вставляют вспомогательный микроскоп. Перемещая окуляр вспомогательного микроскопа внутри тубуса, получают четкое изображение фазового кольца. В этом положении окуляр фиксируют винтом.
7. Вращая револьвер конденсора, включают нужную кольцевую диафрагму, в результате чего в окуляре помимо фазового темно-серого кольца объектива появится изображение светлого кольца диафрагмы конденсора.
8. Вращая центрировочные винты, совмещают светлое кольцо конденсора с темным кольцом объектива.
9. Вспомогательный микроскоп заменяют окуляром.
10. При исследовании объекта используют желто-зеленый светофильтр, который входит в комплект фазово-контрастного устройства.

При правильной установке освещения изображение объектов в препарате должно получиться очень контрастным. При смене объективов или препарата необходимо проверить совмещенность кольцевой диафрагмы конденсора с фазовым кольцом объектива.

Люминесцентный микроскоп

Фотолюминесценцией называют свечение объектов, возникающее в результате поглощенной ими лучистой энергии. Вследствие некоторых причин свет люминесценции обладает большей длиной волны, чем поглощенный (правило Стокса). Поэтому люминесценцию выгодно возбуждать либо ультрафиолетовыми лучами (30-400 нм), либо синие-фиолетовыми. В обоих случаях возникает люминесценция в цветовой гамме всего или большей части видимого спектра, что дает цветное изображение.

Объект, не дающий явления люминесценции, окрашивают специальными красителями - флюорохромами, после чего нефлюоресцирующие компоненты препарата начинают проявлять явления флюоресценции. Из синтетических флюорохромов наилучшие результаты дают акридин, оранжевый, корифосфин, примулин, родамин, ФИТЦ (флюоресцентоттонозант), которые обычно применяют в виде слабых водных растворов. Этот вид люминесценции носит название наведенной (вторичной) в отличие от первичной - собственной флюоресценции, нередко проявляемой витаминами, многими пигментами, некоторыми жировыми веществами и антибиотиками, встречающимися в живых организмах, некоторыми продуктами нормального и патологического обмена.

Люминесцентная микроскопия по сравнению с обычными методами обладает рядом преимуществ: цветное изображение, высокая степень контрастности светящихся объектов на темном поле, возможность исследования как прозрачных, так и непрозрачных живых объектов, различных жизненных процессов в динамике их развития, обнаружение и установление локализации отдельных микробов и вирусов.

В настоящее время отечественная промышленность выпускает несколько моделей люминесцентных микроскопов, обеспечивающих исследование объектов путем их освещения в проходящем или отраженном свете в стационарных и полевых условиях: ЛЮАМ Р-8, МЛД -2 и ряд моделей для специальных исследований (универсальный исследовательский биологический микроскоп МБИ-15-2). Кроме микроскопа с смонтированным в него осветителем, работающим на ртутно-кварцевой лампе (ДРШ 250-3, ДРШ 100-2 и другие модели) в комплект прибора входят набор объективов, окуляров и светофильтров, электропульт для питания ртутно-кварцевой лампы, а также специальная переходная втулка фототубуса и втулка фотокамер для установки микрофотоаппаратуры (МФН-11 или МФН-12) либо фотоаппаратура "Зенит" без объектива. Светофильтры, имеющиеся в наборе микроскопа, предназначены для выделения из общего излучения источника света строго определенных участков спектра.

В медицинской микробиологии применяют два метода люминесцентной микроскопии: флуорохромирования и флуоресцирующих агентов. Метод флуорохромирования почти не отличается от общеизвестных методов окрашивания анилиновыми красителями, хотя и требует меньше времени (доли минуты). В бактериологии этот метод применяется для диагностики таких инфекционных форм, как туберкулез, дифтерия, гонорея, возвратный тиф и др. Кроме перечисленных отечественная промышленность выпускает микроскопы других типов и приспособлений к ним. Из них следует назвать ультрафиолетовый, поляризационный, интерференционный, аналитический и стереоскопический микроскопы. Последнее слово микроскопической техники - микроскопы биологические нового поколения единой системы "ЕС" с широкопольной оптикой повышенного контраста изображения со встроенным осветителем (лампа КТМ-6-20) и блоком питания. Эти микроскопы (ЕС БИММ Р-11, ЕС БИММ Р-13, ЕС БИММ Р-31) оснащены бинокулярным, столом с координатным перемещением и предназначены для наблюдения объектов в проходящем свете в светлом поле.

Электронный микроскоп

Электронная микроскопия делает возможным исследование объектов, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности светового микроскопа (0,2 мкм), и находит применение для изучения вирусов, бактериофагов, тонкого строения клеток микроорганизмов и других субмикроскопических объектов, а также макромолекулярных структур.

Приготовление препаратов для исследования микроорганизмов в электронном микроскопе имеет ряд особенностей (максимальная очистка исследуемого материала от примесей; малая толщина биологического объекта, не более 0,1 мкм; препараты готовят на специальных пленках-подложках, т.к. стекло непроницаемо для электронов; для предохранения объекта от разрушения потоком электронов препарат исследуют в течение минимального времени).

Различают прямые и косвенные методы приготовления препаратов. При прямых методах исследуемый материал наносят на ультратонкую пленку-подложку, предварительно помещенную на опорную металлическую сеточку, содержащую до 100 ячеек в 1 мм. Используют органические или неорганические пленки-подложки из коллодия, формвара, углерода, кварца и др. При электронной микроскопии эти пленки не должны обнаруживать собственной структуры и при этом быть достаточно прочными, чтобы выдержать облучение электронами. В биологических исследованиях применяют коллоидные пленки толщиной в рядка 10-20 нм.

Широкое распространение получил метод выращивания различных микроорганизмов непосредственно на коллоидных пленках, находящихся на поверхности питательной среды, и серийного их исследования в электронном микроскопе.

При косвенном методе на объект наносят тонкий слой какого-либо вещества (коллодий, кварц, углерод, разнообразные пластмассы) и делают отпечаток-реплику структуры его поверхности. Приготовленный таким образом препарат изучают в электронном микроскопе.

Повышение контрастности изображения объектов достигается несколькими методами.

Метод оттенения. На исследуемый объект наносят тонкий слой металла (хром, золото, уран и др.). Оттенение препаратов проводят на специальных установках вакуумного распыления. При отенении тяжелыми металлами удается значительно повысить контрастность

изображения и получить представление о третьем его измерении.

Метод позитивного контрастирования. Препарат обрабатывают химическими веществами, которые специфически соединяются с определенными структурами объекта. Так, например, уранилацетат обнаруживает нуклеиновые кислоты и нуклеопротеиды, осмий - липиды; белки выявляются при обработке солями свинца, фосфорно-молибденовой и фосфорно-вольфрамовой кислотами. В результате обработки эти структуры становятся менее проницаемыми для электронов и на экране микроскопа выглядят темными на светлом фоне поля.

Метод негативного контрастирования. Контрастное вещество (например фосфорно-вольфрамовая кислота при нейтральном значении pH) при обработке препарата не проникает внутрь, а покрывает его поверхность снаружи. Создается эффект негативного контраста - на темном фоне фосфорно-вольфрамовой кислоты, которая задерживает электронные лучи, выявляются светлые структуры более проницаемого для электронов биологического объекта.

Наиболее полные сведения о внутренней организации микроорганизмов можно получить, применяя метод ультратонких срезов.

Исследуемый объект фиксируют, затем обезживают в спиртах восходящей концентрации и заливают в полимеризующиеся пластмассы (например метакрилаты). После полимеризации из блоков с помощью специальных ультрамикротомов готовят ультратонкие срезы толщиной 15-30 нм, контрастируют их и исследуют.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ОКРАШЕННОМ СОСТОЯНИИ

Окрашенные тела микроорганизмов резко отличаются от общего фона препарата, что позволяет установить: а) ориентировочно состав микробного пейзажа изучаемого объекта; б) степень чистоты выделяемой культуры; в) некоторые морфологические особенности микроорганизмов (форма, размеры, наличие спор, жгутиков, капсул).

Приготовление окрашенного препарата состоит из нескольких последовательных операций: подготовки мазка, высушивания, фиксации, окраски. Для этого используют совершенно чистые обезжиренные стекла. Наиболее простой способ обезжиривания состоит в натирании предметного стекла кусочком сухого мыла, а затем протирании чистой марлей. Капля воды, нанесенная на хорошо подготовленную поверхность, легко расплывается.

полнительной окраски фуксином они примут красный цвет. Слишком кратковременное действие спирта не позволит выявить грамотрицательные бактерии.

Окраска кислотоустойчивых бактерий

Кислотоустойчивые микроорганизмы обладают выраженной устойчивостью к неорганическим кислотам, спиртам и щелочам. Это связано с наличием в клеточной стенке и цитоплазме сравнительно большого количества липидов (воскоподобных веществ). Бактерии этой группы очень плохо окрашиваются обычными красками, поэтому применяют концентрированные растворы красок с подогревом. При последующей кратковременной обработке кислотой тела микробных клеток, воспринявшие краску, не обесцвечиваются. Это позволяет отличить кислотоустойчивые бактерии от не обладающих этим свойством. Их окрашивают по методу Циля - Нельсена, разработанному с учетом всех указанных особенностей.

Окраска по методу Циля - Нельсена

Методика: 1) нанести несколько капель карболового фуксина на фиксированный мазок, покрытый фильтровальной бумагой, и подогреть до появления паров (3-5 мин); 2) бумагу снять, мазок охладить и обесцветить 5% серной кислотой или 3% солянокислым спиртом (2-4 с); 3) тщательно промыть водой; 4) окрасить деффлеровской синькой (3-5 мин); 5) промыть водой и высушить.

Кислотоустойчивые бактерии в результате такой окраски становятся рубиново-красными, а остальные - синими.

Окраска спор *spore*

Некоторые виды бактерий образуют внутриклеточные (эндогенные) споры. В отличие от вегетативной клетки они обладают меньшим количеством свободной воды, а также высоким содержанием липидов и кальция.

Зрелая спора с трудом поддается окрашиванию из-за малой проницаемости оболочки. При окраске по Граму спорообразующей культуры краска воспринимается только вегетативной частью микробной клетки, а спора остается бесцветной. Проницаемость ее оболочки резко увеличивается после обработки горячей соляной кислотой или при использовании концентрированного раствора краски с по-

догревом. Восприняв краску, споры при последующей обработке кислотой не обесцвечиваются, в то время как вегетативные клетки немедленно отдают краску.

Окраска спор по методу Ожешко

Методика: 1) нанести несколько капель 0,5% соляной кислоты на нефиксированный мазок и нагреть до появления паров (2-3 мин); 2) слить кислоту, промыть водой, высушить; 3) зафиксировать в пламени; 4) окрасить по методу Циля - Нельсена (при этом споры окрашиваются в красный цвет, а вегетативные формы - в синий). Часто для окраски спор используют только метод Циля - Нельсена.

Окраска включения волютина

Волютин - производное нуклеиновой кислоты - играет роль запасного питательного вещества. Среди включений запасного характера - жиры, гликоген, волютин, который занимает особое место. На основании его присутствия и особого расположения в клетке ставят предварительный диагноз методом бактериоскопии при подозрении на дифтерию. Наиболее демонстративные результаты удается получить при окраске зерен волютина по методу Нейссера.

Методика: 1) окрасить мазок уксуснокислой синькой Нейссера (2-3 мин); 2) промыть; 3) окрасить раствором Люголя (30 с); 4) слить раствор Люголя и окрасить везувином (1 мин); 5) промыть препарат и высушить.

Цитоплазма клетки, имеющая кислую реакцию, воспринимает щелочной краситель везувин и приобретает желтый цвет. Зерна волютина, прочно фиксировавшие ацетат цинка, - темно-синие, почти черные.

Обнаружение капсул у бактерий

Некоторые микробы обладают способностью откладывать на поверхности своего тела мощный слизистый слой вокруг клеточной стенки, его называют капсулой. В состав капсул входят, главным образом, полисахариды (пневмококк), но у некоторых они содержат и полипептиды (сибиреязвенная палочка). Капсулы имеют консистенцию геля, поэтому при микроскопии живых бактерий они видны очень плохо. Для их обнаружения применяют негативную окраску. Все перечисленные методы относятся к позитивным, т.к. при их не-

пользовании окрашиваются микробные клетки. При негативных способах краситель заполняет пространство вокруг бактерий, в результате чего они выглядят светлыми частицами на темном фоне.

Обнаружение капсул по методу Бурри

Методика: 1) смешать на предметном стекле немного капсульной культуры и каплю разведенной (1:9) туши; приготовить тонкий мазок; 2) высушить на воздухе и бактериоскопировать. На темном фоне хорошо видны бесцветные капсулы.

Модификация по Бурри - Гинсу включает создание фона краской конторот, последующую фиксацию в 5% растворе НСГ и дополнительную окраску водным фуксином. В результате - общий фон темного цвета, капсулы - бесцветные, а тела бактерий - красные.

Окраска по Романовскому - Гимзе

Относится к сложным методам и применяется чаще всего для мазков-отпечатков из органов или мазков крови после фиксации в жидком фиксаторе. Позволяет выявить ядерные элементы бактериальных клеток и гранулы волютина. Для окраски берут каплю готовой краски на 1 мл воды, которая должна быть подщелочена до pH 7,2.

Методика: 1) поместить препарат (мазком винт) в чашку Петри, подложив под край стекла спички или кусочки предметных стекол; 2) подлить краску сбоку так, чтобы она без пузырей подтекла под мазок (красить 1-24 ч); 3) промыть водой (pH 7,2) и высушить. Протоплазма молодых клеток окрашивается в сине-фиолетовый цвет, ядерные элементы - в красно-фиолетовый.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЖИВОМ СОСТОЯНИИ

В живом состоянии микроорганизмы исследуют с целью выявления их формы, подвижности или определения прижизненной внутренней структуры. Изучают нативные и окрашенные препараты, используя методы "раздавленной" или "висячей" капли.

Прижизненная (витальная) окраска. Взвесь микроорганизмов вносят в каплю 0,001% раствора метиленового синего или нейтрального красного. Затем готовят препарат "раздавленная" или "висячая" капля и микроскопируют его.

Приготовление препарата "раздавленная" капли. На центр обезжиренного предметного стекла наносят каплю жидкой бульонной культуры. Если культура выращивалась на плотной питательной среде, то на стекло наносят каплю стерильного изотонического раствора натрия хлорида, затем петлей прикасаются к культуре и приставшие к ней бактерии размещают в приготовленной капле. Можно заранее приготовить взвесь микроорганизмов в изотоническом растворе и взять каплю из нее. На исследуемый материал накладывают покровное стекло так, чтобы не было пузырьков воздуха. Каплю надо брать такой величины, чтобы она заполняла все пространство между покровным и предметным стеклами и не выступала за края покровного. Препарат можно рассматривать как с сухими системами, так и с иммерсионной. Микроскопируют, используя объективы 40х или 90х. Очень хорошие результаты получают, применяя темнопольное или фазово-контрастное устройство. Препараты быстро высыхают, поэтому, если их приходится рассматривать не тотчас, а спустя некоторое время, их помещают во влажную камеру (чашку Петри), на дно которой подложено 2-3 влажных кружка фильтровальной бумаги, покрытых двумя сухими. Во избежание высыхания препарата и вызываемого конвекцией турбулентного движения жидкости подобные препараты можно герметизировать. Для этой цели следует пользоваться парафиновым маслом, смесью равных частей парафина и вазелина или лаком для ногтей.

В центре влажного препарата быстро возникает недостаточность кислорода. В сущности именно это помогло Пастеру открыть анаэробный обмен: наблюдая за препаратом, он заметил, что облигатные анаэробы сохраняли подвижность только в центре, но не по краям.

Подвижные микроорганизмы иногда могут адсорбироваться на стекле; в таких случаях подвижность легче наблюдать в "висячей" капле.

Приготовление препарата "висячая" капли. Препарат готовят на покровном стекле, в центр которого наносят одну каплю бактериальной взвеси. Затем предметное стекло с лункой, края которой предварительно смазывают вазелином, прижимают к покровному стеклу так, чтобы капля находилась в центре лунки, в результате чего стекла склеиваются. Быстрым движением переворачивают препарат покровным стеклом вверх. Получается герметически закрытая камера, в которой капля долго не высыхает. В правильно приготовленном препарате капля свободно висит над лункой, не касаясь ее

дна или края. Микроскопируют со стороны покровного стекла, причем вначале следует найти край на малом увеличении и при суженной диафрагме, используя сухой объектив 8х, затем на большем и продолжить наблюдение (рис.3).



Рис. 3. Препарат висячей капли.

При изучении подвижности микроорганизмов необходимо отличать истинную подвижность от броуновского движения, которое является следствием ударов о бактерии движущихся в растворе молекул и выявляется в виде колебаний. Многие подвижные микроорганизмы движутся очень быстро, что затрудняет точное наблюдение. Добавляя к суспензии микроорганизмов метилцеллюлозу, можно уменьшить скорость их движения и создать условия, при которых движение жгутиков становится видимым.

Недостатком метода является наличие ряда оптических дефектов, связанных с кривизной лунки, что препятствует получению высококачественных микрофотографий, а также невозможность использования темнопольного и фазово-контрастного устройств из-за большой толщины предметных стекол с лунками.

Приготовление красок

Фуксин готовят в виде концентрированного раствора Циля. Раствор обладает большой стойкостью при хранении. Его применяют при сложных методах окраски (окраска спор, кислотоустойчивых бактерий). Для простого окрашивания используют фуксин Пфейффера (фуксин Циля, разведенный в 10 раз дистиллированной водой). Он нестойк и готовят его для работы на один день.

Карболовый фуксин Циля

Фуксина основного	1 г
Спирта 96%	10 мл
Кислоты карболовой кристаллической	5 г
Воды дистиллированной	100 мл

Растереть в ступке фуксин с карболовой кислотой, спирт добавлять постепенно, а затем небольшими порциями влить дистиллированную воду.

Метиленовая сине по Леффлеру

Насыщенного спиртового раствора метиленового синего	30 мл
Воды дистиллированной	100 мл
1% водного раствора КОН	1 мл

Реактивы для окраски по Граму

1. Карболовый генцианинолет:

генцианинолета	1 г
кислоты карболовой	2 г
спирта 96%	10 мл
воды дистиллированной	100 мл

Растереть в ступке генцианинолет с карболовой кислотой, добавляя в начале спирт, а потом воду. Раствор выдержать сутки, профильтровать и использовать для окраски.

2. Раствор Люголя:

калия йодистого	2 г
йода кристаллического	1 г
воды дистиллированной	300 мл

В небольшом объеме дистиллированной воды растворить йодистый калий, а затем кристаллический йод, после этого довести объем до 300 мл.

3. Спирт 96%

4. Водный фуксин Пфрейффера

Реактивы для окраски по методу Нейссера

1. Уксуснокислая сывка Нейссера:

метиленового синего	0,1 г
---------------------	-------

	спирта 96%	2 мл
	уксусной кислоты крепкой	5 мл
	воды дистиллированной	100 мл
2. Везувин:		
	везувина	2 г
	воды дистиллированной	300 мл

Прокипятить приготовленный раствор и, охладив, профильтровать.

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ

Общие требования к питательным средам

Питательные среды предназначены для накопления, выделения, изучения и сохранения микроорганизмов. По своей сущности питательные среды являются искусственной средой обитания микробов, поэтому при их составлении учитывают как потребности микроорганизмов в веществах, необходимых для жизни, так и физико-химические условия, в которых микроорганизмы могут осуществлять обмен между клеткой и средой.

Для обеспечения разнообразных типов метаболизма микроорганизмов питательные среды должны соответствовать следующим требованиям.

1. Содержать все элементы, из которых строится клетка: макроэлементы (углерод, азот, кислород, сера, фосфор, калий, кальций, магний, железо) и микроэлементы (марганец, молибден, цинк, медь, кобальт, никель, ванадий, хлор, натрий, кремний, и др.). Все элементы должны находиться в удобоусвояемых конкретным микроорганизмом соединениях. Источником углерода могут быть разнообразные органические соединения: углеводы, многоатомные спирты, органические кислоты, аминокислоты, белки и др. Источником азота служат аммонийные соединения, аминокислоты, пептиды, белки. Источником остальных макроэлементов являются неорганические соединения - соли фосфорной и других кислот. Микроэлементы поступают в питательную среду с органическими субстратами, солями и водой. Витамины (особенно группы B) и другие факторы роста вносят в среду в составе органических субстратов или в виде чистых веществ.

2. Иметь достаточную влажность (не менее 20% воды).

3. Концентрация солей в среде должна обеспечивать изотонно, то есть соответствовать концентрации солей в микробной клетке (для большинства микроорганизмов - 0,5%; галофильных - 3%).

4. Концентрация водородных ионов (рН) среды должна быть оптимальной для выращиваемого микроорганизма (диапазон рН 4,5-8,5).
5. Окислительно-восстановительный потенциал (Еh) среды должен соответствовать потребностям микроорганизма: для анаэробов - 0,120-0,060 В, для аэробов - более 0,080 В.
6. Питательная среда должна быть стерильной.

Типы питательных сред

По составу питательные среды могут быть синтетическими и натуральными. Питательные среды являются синтетическими, если содержат только химически чистые соединения в установленных дозировках, т.е. состав их полностью известен. Достоинством таких сред являются стандартность и воспроизводимость. Однако только для немногих патогенных бактерий имеются синтетические среды. Их применяют главным образом для экспериментального изучения метаболизма микробов.

Для практических исследований широко используют натуральные среды. Натуральные (естественные) питательные среды состоят из продуктов животного и растительного происхождения и имеют неопределенный химический состав.

Различают питательные среды общего назначения (универсальные) и специальные питательные среды. Питательные среды общего назначения пригодны для выращивания многих видов микроорганизмов и применения в качестве основы для приготовления специальных питательных сред. К ним относятся, например, мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, бульон Хоттингера, агар Хоттингера и другие. Специальные питательные среды предназначены для избирательного культивирования определенных видов микроорганизмов, изучения их свойств и хранения.

Различают следующие виды специальных сред: селективные (избирательные), дифференциально-диагностические, консервирующие. Избирательность питательной среды для определенных видов микробов достигается путем создания оптимальных для них условий (рН, Еh, концентрация солей, состав питательных веществ), т.е. положительной селекцией, или путем добавления в среду веществ, угнетающих другие микробы (желчь, азид натрия, теллурит калия, антибиотики и др.), т.е. отрицательной селекцией. Дифференцирующие свойства питательной среды создаются внесением субстрата, к которому определяется отношение микроба (например, сахаров, аминокислот

и др.), соответствующих индикаторов (например, рН-индикаторов бромтимолблау, фуксин; Еh-индикаторов).

По консистенции питательные среды могут быть жидкими, полужидкими (0,2-0,7% агара) и плотными (1,5-2% агара). Сухие питательные среды, выпускаемые промышленностью, представляют собой форму консервации сред.

Для обеспечения микрообъемной технологии биохимической идентификации микроорганизмов выпускаются коммерческие микро-тест-системы. Они представлены двумя группами, различающимися особенностями содержания субстрата реакции: 1 - в питательной среде; 2 - в шаблоне-носителе. Тест-системы первой группы содержат в микрообъемных лунках полистироловых пластины дегидрированные питательные среды, стабилизированные поливиниловым спиртом, например, API-20E, Enterotest 1 и 2, отечественные ПБДЕ и ММТЕ 1 и Е 2. Тест-системы второй группы имеют субстрат и индикатор в бумажном или полимерном шаблоне-носителе, например, Micro-ID, Minitек. Разработаны также тест-системы на основе жидких дифференциальных сред, которые можно изготавливать непосредственно в лабораториях. По результатам биохимических тестов устанавливается вид микроорганизма с помощью таблиц идентификации, аналитического каталога кодов или приборов автоматизированных микробиологических систем биохимической идентификации микроорганизмов. Ввиду ускорения исследования и высокой экономичности микрообъемные тест-системы имеют широкое применение в работе лабораторий.

Приготовление питательных сред

Компоненты питательных сред. Для натуральных питательных сред используют животные, растительные и микробные продукты: мясо, рыбную муку, молоко, яйца, кровь, картофель, дрожжи и др. Из них готовят полуфабрикаты: настои и экстракты (мясная вода, дрожжевой экстракт), ферментативные и кислотные гидролизаты (пептон, перевар Хоттингера, перевар казеина и др.). Настои и экстракты являются источником факторов роста; гидролизаты - источником аминокислот и других органических питательных веществ. Минеральные соли вносят в следующих соотношениях: NaCl - 5,0 г/л; KH_2PO_4 - 0,2-0,5 г/л; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,1-0,2 г/л; остальные соли - 0,001 г/л. Для специальных сред используют: сахара (глюкозу, лактозу - 0,5-1,0%); многоатомные спирты (маннит, инозит и др. - 0,5-1,0%); аминокислоты -

0,5-1,0%; витамины - 0,001 мг/л; кровь - 5-10%; сыворотку крови - 10-30%; молоко и др. Из индикаторов pH чаще применяют индикатор Андреде (0,5 г кислого фуксина; раствора 1N NaOH - 17 мл; дистиллированной воды - 100 мл) или индикатор Кларка (1,5% спиртового раствора фенолового красного, метиленового красного, бромтимолового синего и др.). В качестве уплотнителя питательных сред используют агар-агар или желатин. Агар-агар - полисахарид, получаемый из морских водорослей, - способен образовывать в воде гель, плавящийся при 80-86°C и застывающий при 40-45°C; не расплывается большинством видов микроорганизмов. Желатин - белок, получаемый из кожи и костей; желатиновый гель плавится при 32-34°C, застывает при 26-28°C (т.е. при температуре инкубации 37°C находится в жидком состоянии); расплывается многими видами микроорганизмов. По этому желатин применяют редко.

Этапы приготовления питательных сред. Согласно рецептам питательной среды в дистиллированную воду вносят необходимые компоненты и растворяют при нагревании. При разведении белковых гидролизатов концентрация аммиачного азота должна оставлять 1,0-1,2 г/л, общего - 2,5-3,0 г/л; pH среды определяют с помощью индикаторных бумажек или электропотенциометров (с учетом того, что после стерилизации pH среды снизится на 0,2). Фильтруют жидкие и желатиновые среды через фильтровальную бумагу; среды с агаром (в горячем состоянии) - через ватно-марлевый фильтр. При необходимости осветляют питательную среду обработкой белком куриного яйца, сывороткой или осаждением. Разливают среду в колбы, флаконы, пробирки. Используют чистую нестерильную посуду, если среда подлежит стерилизации при 120°C, или стерильную посуду, если среда требует стерилизации текучим паром (100°C), или при 112°C. Закрывают посуду со средой ватно-марлевыми пробками с бумажными колпачками. В зависимости от состава среды стерилизуют различными способами. Агаровые среды, не содержащие углеводов и нативного белка, а также синтетические среды стерилизуют в автоклаве при 115-120°C в течение 15-20 мин. Среда, содержащие углеводы, молоко, желатин, стерилизуют текучим паром при 100°C дробно или в автоклаве при 112°C в течение 15 мин. Среда, содержащие нативный белок, мочевицу, стерилизуют фильтрованием или добавляют стерильные компоненты (кровь, сыворотку и др.) в стерильную основу среды. Готовые стерильные питательные среды подвергают контролю на стерильность путем выдерживания в термостате при 37°C в течение 1-3 сут.

В полевых условиях проще готовить питательные среды из сухих (консервированных) питательных сред. Навеску сухой среды, указанную на этикетке, вносят в дистиллированную или водопроводную воду и кипятят до полного растворения порошка. Затем разливают среду в стерильные колбы, пробирки и стерилизуют. Некоторые среды (например, Эндо, Плоскирева, Левина) можно использовать без стерилизации.

Техника приготовления некоторых полуфабрикатов и питательных сред общего назначения

Мясной настой (мясная вода). Для приготовления настоя употребляют свежее говяжье мясо. Мышцы отделяют от костей, освобождают от жира и соединительной ткани, измельчают в мясорубке, заливают водой из расчета 2 л воды на 1 кг мясного фарша и оставляют на 18-20 ч при температуре 8-10°C. Затем настой вместе с мясом нагревают до кипения и кипятят в течение 30 мин. Удаляют всплывающий на поверхность жир, доливают дистиллированной водой до первоначального объема, отделяют настой от фарша через сито или марлю, фильтруют через ватный фильтр. Настой, не стерилизуя, употребляют для приготовления бульона или для хранения разливают в бутылки и стерилизуют при 120°C в течение 30 мин. В мясном настое содержится азота общего - 2,00 г/л, азота аммиачного - 0,6 г/л.

Гидролизат (перевар) по Хотгингеру. Мясо (1 кг) нарезают кусочками примерно по 1-2 см³, опускают небольшими порциями в кастрюлю с двойным количеством (по отношению к мясу) кипящей воды, кипятят 15-20 мин, пока мясо не станет серым, затем извлекают из жидкости шумовкой и пропускают через мясорубку, в оставшейся жидкости устанавливают pH-8,0, опускают в нее фарш и охлаждают в кастрюле до 40°C, после чего добавляют поджелудочную железу (очищенную от жира, соединительной ткани и дважды пропущенную через мясорубку) в количестве 10% к взятой жидкости (на 1 л жидкости 100 г железы) или сухой панкреатин в количестве 0,5% и выше в зависимости от его активности. Хорошо размешивают, после чего снова подщелачивают через 30 мин (отсутствие сдвига реакции в кислую сторону указывает на недоброкачество фермента). После установления pH смесь переливают в бутылку с плотной резиновой пробкой с таким расчетом, чтобы 1/3 бутылки оставалась свободной. Добавляют 1-3% хлороформа (в холодное время года меньше, чем в теплое), закрывают бутылку пробкой и несколько раз встряхивают, после

чего на минуту вынимают пробку для освобождения от избытка паров хлороформа. Через 1-2 ч после добавления фермента опять проверяют реакцию и устанавливают рН - 7,4-7,6. Смесь оставляют на 10-16 дней при комнатной температуре или 7-10 дней при 37°C. Первые 3-4 дня переваривания ежедневно проверяют и исправляют реакцию, а также встряхивают перевар не менее 3 раз в сутки. В дальнейшем проверку проводить нецелесообразно, а встряхивать можно реже. За 1-2 дня до окончания переваривания прекращают встряхивание, чтобы перевар отстоялся. Окончание переваривания характеризуется следующими признаками: на дне бутылки собирается пылевидный осадок, жидкость над осадком просветляется и принимает соломенно-желтый цвет, реакция на триптофан с бромной водой положительная (максимальное содержание триптофана 2,00-3,00 г/л), в гидролизате содержится 11,00-12,00 г/л азота, 7,00-9,00 г/л аммиачного азота. По окончании гидролиза перевар фильтруют через полотноый или бумажный фильтр, разливают в бутылки, колбы и стерилизуют при 120°C в течение 30 мин для хранения впрок.

Мясо-пептонный бульон. К мясному настою добавляют 1% пептона, 0,5% химически чистого натрия хлорида. Смесь кипятят при постоянном помешивании 15-20 мин, устанавливают рН - 7,2-7,4, фильтруют через бумажный фильтр, разливают в колбы и пробирки, стерилизуют при 120°C в течение 20 мин. Содержание аммиачного азота в готовой среде 1,2 г/л.

Бульон Хоттингера. К 100-200 мл перевара Хоттингера добавляют 800-900 мл дистиллированной воды (в зависимости от концентрации аммиачного азота в переваре), прибавляют 5 г хлористого натрия, 0,2 г однозамещенного фосфорнокислого натрия. Устанавливают рН - 7,4-7,6. Разливают в колбы или пробирки. Стерилизуют при 120°C в течение 20 мин. Содержание аммиачного азота в готовой среде - 1,00-1,20 г/л.

Мясо-пептонный агар. К 1 л мясо-пептонного бульона прибавляют 15-25 г (1,5-2,5%) мелко нарезанного агар-агара. Кипятят, перемешивая, до полного растворения агара. Устанавливают рН - 7,4-7,6. Фильтруют, разливают в колбы или пробирки, стерилизуют при 120°C в течение 20 мин.

Агар Хоттингера. К 1 л бульона Хоттингера прибавляют 15-25 г (1,5-2,5%) мелко нарезанного агар-агара. Кипятят, перемешивая, до полного растворения агара. Устанавливают рН - 7,4-7,6. Фильтруют, разливают в колбы или пробирки, стерилизуют при 120°C в течение 20 мин.

Контроль питательных сред по биологическим и физико-химическим показателям

Бактериологическому контролю подлежат все серии питательных сред промышленного производства и все партии сред, приготовленных в лаборатории. В качестве тест-культур используют типовые или местные штаммы бактерий, типичные по всем признакам, в гладкой форме. Тест-культуры хранят в лиофилизированном состоянии или в столбике полужидкого питательного агара, высевают перед использованием на питательный агар и для получения необходимых посевных доз разводят десятикратно стерильным 0,85% раствором натрия хлорида необходимую взвесь культуры концентрации 1 млрд бактерий в 1 мл. Определяют следующие биологические показатели питательной среды: чувствительность (ростовую), ингибирующие свойства, дифференцирующие свойства, скорость роста бактерий на среде, воспроизводимость.

Чувствительность питательной среды определяют по минимальному количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) бактерий, обеспечивающих появление роста колоний на среде, или по другому варианту - максимальному десятикратному разведению культуры из исходной концентрации 10 ед. мутности (по оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича), обеспечивающему появление роста бактерий на всех засеянных чашках Петри. Ингибирующие свойства среды оценивают как степень подавления прочей микрофлоры по величине посевной дозы в КОЕ, полностью подавляемой на среде, или по отношению количества выросших колоний бактерий к расчетному количеству посеянных бактерий. Дифференцирующие свойства сред изучают путем посева испытуемых видов бактерий в смеси с ассоциантами с последующим определением четкости дифференциации колоний искомым бактериям от ассоциантов. Специфичность дифференцирующего свойства среды выявляют по отсутствию этого свойства у прочих видов бактерий, кроме искомым. Скорость роста бактерий на среде устанавливают по минимальному времени инкубации посевов (в часах), в течение которого обеспечивается четкий, видимый невооруженным глазом, рост культуры (для селективных сред) или формирование колоний с типичными дифференциальными признаками. Воспроизводимость биологических показателей сред оценивают по частоте одинаковых результатов (в %) при повторных использованиях сред с теми же штаммами бактерий. Контроль различных питательных сред по биологическим показателям проводят по конкретным методикам и нормативам руководствуясь официальными документами.

Физико-химический контроль питательных сред в практике лабораторий осуществляют по показателям рН, гН, содержанию аммиачного азота. Прочие показатели изучают обычно при промышленном производстве питательных сред. Для определения рН и гН сред используют рН - метры, индикаторные бумажки, а также различные химические индикаторы рН и гН вносимые в питательные среды. Содержание аммиачного азота изучают методом рН-метрического формолового титрования питательных сред по ГОСТу.

МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ

Стерилизация (от лат. Sterilis - бесплодный) - освобождение от всего живого, полное уничтожение в материалах всех микроорганизмов и их спор.

Стерилизация широко используется в медицине, фармакологии и на производстве. Изменения в службах охраны здоровья, в типах медицинской продукции, требующих стерилизации, влекут за собой изменения в технике осуществления стерилизации. Методы стерилизации описаны ниже.

Физические методы стерилизации

Прокаливанием на пламени горелки или спиртовки стерилизуют металлические инструменты, бактериологические петли, иглы, пинцеты, предметные стекла.

Кипячение применяют для стерилизации хирургических инструментов, игл, резиновых трубок. Кипячение в течение 30 мин в специальных аппаратах-стерилизаторах не обеспечивает стерильности объекта, если он был заражен спорами некоторых бактерий.

Стерилизация сухим жаром применяется для обеспложивания стеклянной посуды, пробирок, колб, чашек Петри и пипеток. Для этой цели используют сухожаровые шкафы (печи Пастера), в которых необходимый эффект достигается при температуре 160°C в течение 2 ч или при температуре выше 170°C в течение 40 мин.

Принципиальные преимущества сухого жара заключаются в том, что при его применении не происходит коррозии металлов и инструментов, не повреждаются стеклянные поверхности; он пригоден для стерилизации порошков и не содержащих воды летучих вязких веществ. К недостаткам данного метода относятся медленная передача тепла и продолжительные периоды стерилизации; при исполь-

зовании сухого жара более высокие температуры (выше 170°C) могут неблагоприятно действовать на некоторые металлы, а также вызывать обугливание и возгорание ватных пробок и бумаги. Кроме того, если нет циркуляции воздуха, может происходить образование слоев воздуха с разными температурами.

При обработке сухим жаром микроорганизмы погибают в результате окисления внутриклеточных компонентов. Споры бактерий более устойчивы к сухому жару, чем вегетативные клетки.

Стерилизации паром под давлением - один из наиболее эффективных методов, основанный на сильном гидролизующем действии насыщенного пара. Паром под давлением стерилизуют различные питательные среды (кроме содержащих нативные белки), жидкости, приборы, резиновые предметы, стеклянную посуду с резиновыми пробками. Для этой цели применяют паровые стерилизаторы (автоклавы). Большинство паровых стерилизаторов относится к гравитационным: пар движется в них сверху вниз под действием разности плотностей пара и воздуха. В таких стерилизаторах существуют проблемы проникновения влаги, перегрева, удаления воздуха, а также отрицательные последствия, вызываемые воздействием тепла и (или) влаги. Весьма важны правильное приготовление стерилизуемых образцов и надлежащая загрузка.

Правила работы с паровыми стерилизаторами следующие.

1. Перед началом стерилизации проверить исправность манометров, упругость резиновой прокладки, герметичность крепления крышки стерилизационной камеры.

2. Наполнить котелок водой через воронку до уровня отметки на кожухе водомерной трубки и закрыть верхний край водоуказательной колонки.

3. Загрузить материалы в стерилизационную камеру и плотно закрыть крышку стерилизатора.

4. Закрыть спускной кран и выключить нагревательную систему.

5. После достижения давления пара в котле $2,0 \pm 0,2$ кгс/см² открыть спускной кран, а затем вентиль патрубка, соединяющего котелок со стерилизационной камерой. Появление из крана непрерывной струи пара считать началом продувки (вытеснение воздуха из стерилизационной камеры), которая должна продолжаться не менее 30 мин.

6. Закрыть спускной кран и довести давление в стерилизационной камере до нужного уровня, учитывая соотношение показания манометра и температуры кипения воды (табл. 1).

7. Окончив стерилизацию, выключить электрический подогрев и закрыть кран на патрубке.

8. Открыть спускной кран и постепенно выпустить пар из стерилизационной камеры в сосуд с водой.

9. После снижения давления в стерилизационной камере до 0 открыть крышку стерилизатора и приступить к ее разгрузке; при открытии крышки ранее указанного срока стерилизуемая жидкость вскипает и может вытолкнуть пробки из сосудов вследствие быстрого падения давления.

Таблица 1

Соотношение показаний манометра
и температуры кипения воды

Показания манометра, кгс/см ²	Температура кипения воды, °С	Показания манометра, кгс/см ²	Температура кипения воды, °С
0	100	0,7	116
0,2	105	0,8	117
0,4	110	1	121
0,5	112	1,5	127
0,6	114	2	134

Питательные среды, перевязочные материалы и белье стерилизуют при 1 кгс/см в течение 15-20 мин, питательные среды с углеводами - при 0,5 кгс/см в течение 15 мин, а патогенный материал обеззараживают при 1,5-2 кгс/см.

Контроль режима стерилизации осуществляется с помощью химических термотестов и искусственных биотестов.

Химические термотесты представляют собой вещества, изменяющие свой цвет или физическое состояние при стерилизации, в частности, имеющие различную температуру плавления (табл. 2).

Запаянные ампулы с порошком, смешанным с краской, помещают в стерилизационную камеру. При достижении в камере определенной температуры порошок плавится, образуя сплав, окрашенный в цвет добавленной краски.

Бактериологический контроль режима стерилизации заключается в том, что в стерилизационную камеру помещают искусственные

Показатели температуры плавления порошков-индикаторов *

Название химического вещества-индикатора	Температура плавления °С	Название химического вещества-индикатора	Температура плавления °С
Бензоэфир	110	Резорцин жидкий	118
Анилин	115	Бесцветная пилота	121
Серный цвет	115		

*На 100 г порошка индикатора прибавляют 0,01 сафранина, 0,005 г фуксина или метиленовой сини.

биотесты - пробирки с полосками марли, фильтровальной бумаги или шелковишками, зараженными микроорганизмами с известной устойчивостью к температурным воздействиям. Готовят их следующим образом (Сироко И.А., 1978). На чашки с питательным агаром засевают 3-4 различных штамма споровых палочек из группы *Sh. entericus*, выдерживающих кипячение в течение 2 ч. Посевы ставят в термостат на 48 ч, после чего их выдерживают при комнатной температуре в течение 5 сут. Затем культуры смывают с поверхности агара водой с помощью шпателя, сливают в колбочку со стерильными бусами и энергично встряхивают в течение 2-3 мин. Полученную взвесь микробов фильтруют через рыхлый ватный фильтр для удаления крупных частиц и разводят по стандарту до концентрации 2 млрд. микробных клеток в 1 мл.

Кусочки марли или бельевой ветоши площадью около 1 см² пропитывают микробной взвесью и раскладывают на дно пробирок, закрытых ватно-марлевыми пробками. Пробирки необходимо на несколько часов поставить в умеренно теплое место (термостат, батарея центрального отопления) для того, чтобы биотесты проросли. После этого их можно хранить в лаборатории в течение года.

Зарубежные фирмы (American Sterilizer Co и др.) поставляют биотесты, представляющие собой полоски с нанесенными на них спорами одного или двух видов бактерий, со спорами известной численности, со спорами и определенным количеством культуральной среды, суспензиями спор и т.д.

Биотесты закладывают в центральную часть каждого бикса или

мешка, содержащих белье, перевязочный и другой материал, подлежащий стерилизации. После вскрытия бикса или мешка (во время работы) биотесты направляют в лабораторию.

В лаборатории в пробирку с биотестом заливают 5-10 мл сахарного бульона и посевы инкубируют в течение 48 ч при 37°C.

При наличии визуального роста готовят мазки или высевы на мясо-пептонный агар для идентификации культуры.

Стерилизация текучим паром (дробная стерилизация) - это обеспложивание объектов, разрушающихся при температуре выше 100°C (питательные среды с аммиачными солями, молоко, желатин, картофель, некоторые углеводы). Обеспложивание проводят в паровом стерилизаторе при открытом спускном крае и незавинченной крышке или в аппарате Коха по 15-30 мин в течение 3 дней подряд. При первой стерилизации погибают вегетативные формы микробов, некоторые споры при этом сохраняются и прорастают в вегетативные особи в процессе хранения питательных сред при комнатной температуре. Последующая стерилизация обеспечивает достаточно надежное обеспложивание объекта.

Типидализация - это стерилизация материалов, легко разрушающихся при высокой температуре (сыворотки, витамины); стерильность достигается повторным прогреванием объекта при температуре 60°C по часу ежедневно в течение 5-6 дней подряд.

Пастеризация - это обеспложивание многих пищевых продуктов (молоко, пиво, соки), при этом достигается только частичная стерильность; споры микроорганизмов не уничтожаются. Обеспложивание проводят при 65-80°C в течение 10-60 мин.

Стерилизацию ультрафиолетовыми лучами применяют для обеспложивания воздуха в микробиологических лабораториях, боксах, операционных. Ее проводят бактерицидными лампами различной мощности (БУВ-15, БУВ-30 и др.) с длиной волны излучения 253-265 нм.

Механические методы стерилизации

Фильтрование применяют в тех случаях, когда повышенная температура может резко повлиять на качество стерилизуемых материалов (питательные среды, сыворотки, антибиотики), а также для очистки бактериальных токсинов, фагов и различных продуктов жизнедеятельности бактерий. Как окончательный процесс он менее надежен, чем стерилизация паром, из-за большой вероятности прохождения микроорганизмов через фильтры.

Фильтры задерживают микроорганизмы благодаря поровой структуре их материала. Существуют два основных типа фильтров - глубинные и мембранные.

Глубинные фильтры состоят из волокистных или гранулированных материалов, которые спрессованы, свиты или связаны в лабиринт проточных каналов. Частицы задерживаются в них в результате адсорбции и механического захвата в материале фильтра. Фильтры Шамберлана изготавливают из каолина с примесью песка и кварца. Они имеют вид свечей с различными размерами пор и обозначаются L_1 , L_2 , L_3 и т.д. Следует запомнить, что фильтры L_3 - L_{11} бактерий не пропускают. Для фильтра Беркефельда используют инфузорию землю. Размеры пор в порядке увеличения обозначаются буквами W, N, V.

Мембранные фильтры имеют непрерывную структуру, получают их из нитроцеллюлозы, и захват ими частиц определяется в основном размером пор. В зависимости от размера последних мембранные фильтры обозначают номерами 1-5 (диаметры пор 350-1200 нм).

Фильтрацию материалов производят под вакуумом, который создают вакуумным или водоструйным насосами. Фильтры Шамберлана и Беркефельда соединяют с вакуумной колбой Бульена резиновыми трубками и перед фильтрацией стерилизуют в паровом стерилизаторе при 120°C. Мембранные фильтры после предварительной стерилизации кипячением вставляют в аппарат Зейтца, состоящий из асбестовой пластинки, смонтированной в металлическую воронку, которую, через резиновую пробку присоединяют к колбе Бульена.

Методы дезинфекции

Дезинфекция (от лат. *infestia* - инфекция и франц. отрицательной приставки *des*), в отличие от стерилизации, означает уничтожение во внешней среде только возбудителей инфекционных заболеваний. В зависимости от характера действующего агента различают физический и химический способы дезинфекции.

Физический метод сводится к механической очистке объектов (орошение, мытье, чистка, вытряхивание и выколачивание, влажная уборка, вентиляция помещений). Он не позволяет достигнуть полного обеззараживания обрабатываемых объектов. Однако физические способы дезинфекции приводят к значительному уменьшению числа патогенных микроорганизмов во внешней среде.

В микробиологической практике широкое применение нашли

способы химической дезинфекции (рук и рабочего места, обработанного патологического материала, градуированных и пастеровских пипеток, стеклянных шпателей, стекол). Вещества, предназначенные для дезинфекции, должны обладать рядом свойств: 1) хорошо растворяться в воде; 2) в короткие сроки проявлять бактерицидное действие; 3) не утрачивать обеззараживающих свойств при наличии органических примесей в среде, подлежащей обработке; 4) не оказывать токсического действия на людей и животных; 5) не портить обеззараживаемые объекты; 6) достаточно долго сохранять бактерицидные свойства при хранении в сухом виде или растворе, а также при контакте с обеззараживаемыми объектами; 7) быть дешевыми и удобными при транспортировке. Их подразделяют на несколько групп: галогены и хлорсодержащие вещества (0,25-10% осветленные растворы хлорной извести; 0,1-15% водные растворы дигидрохлората натрия - ДТСК; 1-20 % водные растворы хлорамина), окислители (1-10% растворы перекиси водорода), фенолы и их производные (3-5 % растворы лизола, карболовой кислоты или фенола), соли тяжелых металлов (меркуролят натрия, сулема), соединения, применяемые в газообразном состоянии (40% водный раствор формальдегида, окись этилена, бромистый метил).

Дезинфицирующее вещество, его концентрацию, а также продолжительность срока дезинфекции определяют в зависимости от конкретных условий. В основном учитывают устойчивость обеззараживаемых микробов, степень предполагаемого загрязнения, состав и консистенцию материала, в котором они находятся. В процессе обеззараживания необходимо обеспечить возможность наилучшего перемешивания, чтобы создать наиболее тесный контакт дезинфицирующего вещества с обеззараживаемым материалом.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

В природе микроорганизмы существуют в смешанной популяции. Для изучения свойств микроорганизмов, определения их систематического положения необходимо прежде всего изолировать отдельные виды микробов и вырастить их в виде так называемых "чистых культур", а затем идентифицировать, т.е. установить соответствие выделенных микроорганизмов видам, описанным в специальных определителях.

Под понятием "чистая культура" подразумевается масса клеток, состоящая из микроорганизмов, принадлежащих одному виду и полученных как потомство одной клетки (см. схему 1).

Штамм - культура бактерий одного вида, выделенная из разных источников в разное время.

Вид - совокупность микроорганизмов, имеющих единое происхождение и генотип, сходных по морфологическим и биологическим свойствам.

Культивировать микроорганизмы можно лишь при создании определенных условий для их жизнедеятельности. Искусственные условия, которые исключили бы загрязнение культуры другими видами, можно создать в пробирке, колбе или чашке Петри.

Вся посуда и питательные среды должны быть простерилизованы и после посева инокулята (микробного материала, используемого для посева) защищены от загрязнения извне, что достигается с помощью пробок или металлических колпачков и крышек.

Посев инокулята

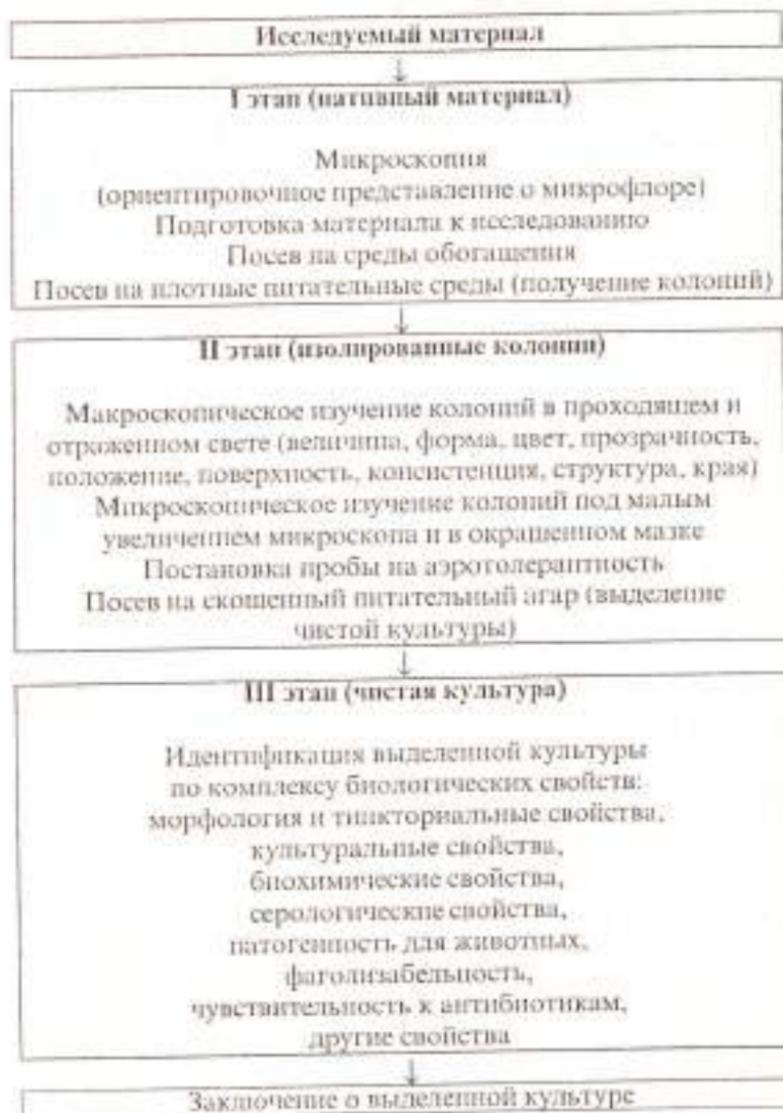
Посев инокулята является первым этапом исследования. В практической работе для получения "чистых культур" микроорганизмов используют одну из модификаций метода высева на чашки со средой. Эти методы основаны на том, что отдельные микроорганизмы иммобилизуются на поверхности или в глубине питательной среды, в которую добавлен агар или какое-нибудь другое гелеобразующее вещество.

1. Посев петлей: посевной материал втирают петлей в поверхность среды у края чашки, избыток снимают, проколов петлей агар, а оставшийся материал рассеивают параллельными штрихами по стерильной поверхности среды. Это наиболее распространенный способ посева, его техника показана на рисунке 4.

2. Посев шпателем: материал наносят на поверхность среды петлей или пипеткой, а затем стеклянным или металлическим шпателем тщательно втирают его по всей поверхности агара. При этом левой рукой придерживают слегка приоткрытую крышку и одновременно вращают чашку. После посева металлический шпатель прокалывают в пламени горелки, а стеклянный помещают в дезинфицирующий раствор.

3. Посев тампоном: тампон с исследуемым материалом вносят в чашку и круговыми движениями втирают его содержимое в поверхность среды, одновременно вращая тампон и чашку.

Выделение и идентификация чистых культур аэробных и анаэробных бактерий



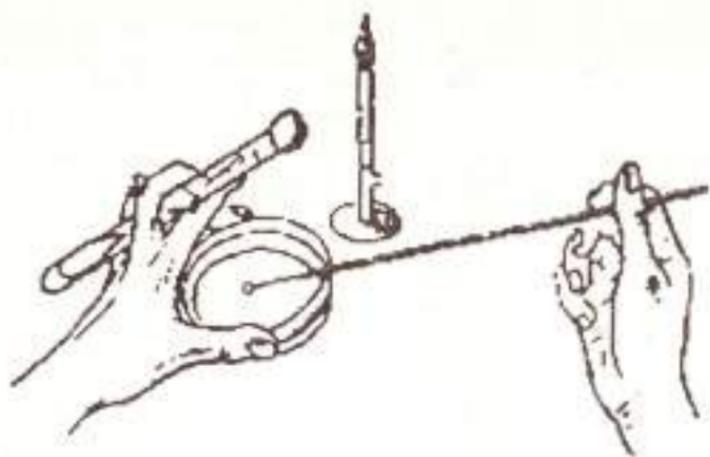


Рис. 4. Посев на плотную питательную среду в чашки Петри.

4. Посев на секторы: дно чашки расчерчивают на секторы, посев производят зигзагообразными движениями от края чашки к центру так, чтобы штрихи с одного не переходили на другой.

5. Посев газоном: 1 мл исследуемого материала (жидкая бульонная культура или взвесь микробов в физиологическом растворе) наносит пипеткой на поверхность среды и тщательно распределяют жидкость по всей ее поверхности. Избыток материала отсасывают пипеткой и вместе с ней помещают в дезинфицирующий раствор.

После посева чашки закрывают и переворачивают их вверх дном. Надписи на чашках делают со стороны дна, а на пробирках - в верхней части.

При посеве инокулируют из пробирки в пробирку обе пробирки (с посевным материалом и со средой) держат слегка наклонно в левой руке между большим и указательным пальцами так, чтобы края пробирок были на одном уровне. Бактериальную петлю держат как пишущее перо. Петлю вертикально прокалывают в пламени горелки. Пробки из пробирок вынимают правой рукой, зажимая их между мизинцем и ладонью. Вылущив пробки, края пробирок обжигают в пламени горелок. Прокаленную петлю вводят через пламя горелки в пробирку с посевным материалом, охлаждают и небольшое количество посевного материала осторожно переносят в пробирку со средой.

При посеве на жидкую среду петлю слегка погружают в жидкость и растирают посевной материал на стенке пробирки, после чего смывают его средой.

Для посева жидкого материала можно использовать стерильные пипетки (пастеровские или градуированные).

При посеве на скошенный агар материал наносят штрихообразными движениями снизу вверх, начиная с конденсационной воды, а если агар или желатин разлит в пробирку столбиком, то посев производят уколом, прокалывая петлей с посевным материалом столбик до дна.

После посева петлю извлекают из пробирки, пробирку закрывают, предварительно проведя ее края через пламя горелки. Петлю прокалывают.

При выделении чистых культур аэробов можно использовать не только методы, основанные на механическом разобщении бактерий, но и методы, основанные на различиях бактерий по биологическим свойствам. Так, например, некоторые подвижные бактерии могут быстро распространяться по слегка влажной поверхности питательной среды, благодаря этому можно очистить их от неподвижных видов микробов.

Иногда при выделении микроорганизмов из природных популяций полезно включить в среду вещества, избирательно подавляющие рост тех или иных микробов. Например, добавление полиеновых антибиотиков (нистатина) в среду используется для очистки бактериальных культур, сильно загрязненных грибами.

Посевы инкубируются в термостате 18-24 ч. В течение этого времени из отдельных микробных клеток формируются изолированные колонии.

Колония - это совокупность микробных клеток одного вида, сформировавшаяся в результате деления одной микробной клетки в условиях культивирования на плотной питательной среде при оптимальной температуре.

Изучение изолированных колоний и отивка чистых культур

Изучение изолированных колоний составляет второй этап исследования. Строение колоний является важным культуральным признаком при определении вида микроорганизмов, т.к. каждому виду микробов при росте на определенной плотной питательной среде присуща типичная форма колонии.

Колонии изучают невооруженным глазом в проходящем и отра-

желтом свете и с помощью лампы или под микроскопом при малом увеличении.

В проходящем свете колонии рассматривают со стороны дна чашки. Отмечают величину колоний (крупные - от 4-5 мм в диаметре и более; средние - 2-4 мм; мелкие - 1-2 мм и карликовые - меньше 1 мм), их форму (правильная, круглая, неправильная, плоская, сферическая) и прозрачность.

В отраженном свете, рассматривая колонии со стороны крышки, определяют цвет (бесцветная, окрашенная), характер поверхности (гладкая, бугристая, блестящая, матовая), расположение колоний на поверхности среды (выпуклое, плоское, вдавленное).

При изучении колоний под микроскопом чашку помещают на предметный столик дном вверх. Обращают внимание на характер краев колоний (ровные, фестончатые, зубчатые), структуру (гомогенная, зернистая, однородная или различная в центре и по периферии).

Важно определить тип колонии. Различают два основных типа колоний бактериальной культуры:

а) колонии гладкие - S-тип (от англ. smooth - гладкий), характеризующийся круглой и выпуклой формой, гладкой поверхностью, влажной консистенцией;

б) колонии шероховатые - R-тип (от англ. rough - шероховатый), характеризующийся шероховатой поверхностью, неправильными краями, сухой консистенцией. Образуются из гладких S-форм в результате мутации.

Помимо этих двух основных типов колоний существует так называемый слизистый M-тип (от лат. mucus - слизистый), характеризующийся тягучей слизистой консистенцией; образуется в процессе диссоциации бактериальных культур.

Часть изученной колонии берут для приготовления мазка, который окрашивают и микроскопируют. Если при микроскопии подтверждается однородность состава колонии, то оставшуюся ее часть отивают на скошенный агар для накопления чистой культуры.

Изучение биохимических свойств выделенных микроорганизмов

Биохимические свойства выделенных микроорганизмов изучают на третьем этапе. Культуру микроорганизмов, выросшую на скошенном агаре, проверяют на чистоту путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму. При микроскопии обращают внимание на форму

микроба, величину, расположение клетки. Специальными окрасками выявляют споры, капсулы, включения и жгутики.

Для идентификации культур, т.е. установления вида и типа бактерий, помимо морфологических и культуральных признаков изучают биохимические, антигенные и другие свойства.

Определение протеолитических свойств микробов. Действие протеолитических ферментов, т.е. способность микроорганизмов расщеплять белки, изучают на средах с желатином, молоком, сывороткой, пептоном. При посеве уколом в столбик желатиновой среды микробы, разлагающие желатин, разжижают среду. Действие микроорганизмов, разлагающих казеин (молочный белок), проявляется в пептонизации (прозрачении) молока, которое приобретает вид молочной сыворотки.

В процессе ферментации пептонов микроорганизмами образуются индол (C_8H_7N), сероводород (H_2S), аммиак (NH_3) и другие соединения.

Для обнаружения сероводорода в пробирку с МПБ, после посева исследуемой культуры, помещают под пробку узкую полоску фильтровальной бумаги, пропитанной раствором уксуснокислого свинца: уксуснокислого свинца - $Pb(CH_3COO)_2$ - 30 г; двууглекислого натрия - $NaHCO_3$ - 1 г; дистиллированной воды - 100 мл. При наличии сероводорода индикаторная бумага чернеет вследствие образования сернистого свинца (PbS).

Для выявления индола используют индикаторную бумажку, пропитанную горячим насыщенным раствором пикариновой кислоты ($C_{12}H_9O_2$). В присутствии индола бумага становится красной. Определение индола можно провести и с помощью реактива Эрлиха, который состоит из парадиметилглицобензальдегида (5 г), очищенной концентрированной фосфорной кислоты (H_3PO_4) (10 мл) и 96% этилового спирта (50 мл). К 48-часовой бульонной культуре прибавляют 1-2 мл серного эфира, основательно встряхивают и затем прибавляют по стенке пробирки 4-5 капель реактива Эрлиха. Через 1-2 мин появляется ярко-малиновое кольцо в нижней части эфирного слоя, которое свидетельствует о наличии индола.

Аммиак определяют при помощи увлажненной красной лакмусовой бумажки. В присутствии аммиака бумажка синее.

Определение сахаролитических свойств микробов. Способность микроорганизмов разлагать сахара и многоатомные спирты с образованием кислоты, а иногда и газа изучают на средах Гисса. В состав этих сред входят пептонная вода, углевод (моносахариды - глюкоза,

ксидоза, арабиноза; полисахариды - крахмал, гликоген), многоатомные спирты (глицерин, маннит, сорбит, инозит) и индикатор. Под действием образующейся при разложении углевода кислоты индикатор изменяет окраску среды. Газообразование определяется по наличию пузырьков газа в толщине полужидких сред или, если среда жидкая, в поглавке (стеклянная трубочка, верхний конец которой запаян).

Сахаролитические свойства изучают и на таких средах, как Эндо, Левина, Плоскирева. В состав этих сред входит молочный сахар - лактоза, и если микроорганизмы расщепляют его до кислоты, то цвет колонии изменяется соответственно индикатору, находящемуся в среде.

Определение ферментов микробов. Биохимическая активность микроорганизмов обусловлена их ферментативной деятельностью. Ферменты микроорганизмов являются биологическими катализаторами, определяющими метаболические процессы, протекающие в микробных клетках. Разные виды микроорганизмов нередко отличаются по набору ферментов, которые они способны синтезировать.

Плазмокoагулаза - выявляется в пробирочном опыте по определению скорости свертывания испытуемым микробом цитратной кровяной или человеческой плазмы.

Гемолитин - вызывает лизис эритроцитов. Определяется при посеве испытуемых микробов на кровяной агар. Вокруг колонии наблюдается зона просветления среды.

Лецитиназа - разрушает лецитинвителлин яичного желтка. Обнаруживается при посеве испытуемых микробов на желточно-солевой агар (ЖСА) по образованию вокруг колоний зона помутнения с радужным венчиком.

Гиалуронидаза - расщепляет гиалуроновую кислоту, входящую в состав соединительной ткани. В пробирку с испытуемой культурой внести гиалуроновую кислоту и после 30-минутной экспозиции при 37°C добавить 2 капли крепкой уксусной кислоты. При наличии фермента гиалуроновая кислота утрачивает способность образовывать сгусток.

Фибринолизин - растворяет фибрин плазмы крови, добавленной к питательной среде.

Методики постановки опытов по определению ферментов у патогенных микроорганизмов описаны в соответствующих разделах частной микробиологии.

Особенности культивирования облигатно-анаэробных бактерий

Облигатными анаэробами называют микроорганизмы, обладающие ферментативным метаболизмом и не растущие на поверхности аэрируемой питательной среды.

В зависимости от отношения к свободному кислороду облигатные анаэробы делят на умеренные и строгие. Большинство значимых для медицинской микробиологии анаэробов (клостридии, бактероиды, фузобактерии, пептококки и др.) относятся к категории умеренных. Они толерантны к кислороду в течение нескольких десятков минут и не растут при его концентрации в среде более 3%. Строгие анаэробы (метанобактерии и др.) чрезвычайно чувствительны к токсическому действию кислорода и не растут при его содержании в среде более 0,5%.

Биологические особенности облигатных анаэробов обуславливают необходимость применения специальных методов культивирования, отличающихся от используемых при работе с аэробными и факультативно-анаэробными микроорганизмами.

Важным условием, которое необходимо соблюдать на всех этапах выделения и идентификации анаэробов, является защита этих микроорганизмов от токсического действия молекулярного кислорода. Время между взятием материала и его посевом на питательные среды должно быть максимально коротким. Для защиты содержащихся в патологическом материале облигатных анаэробов от воздействия атмосферного кислорода используют специальные транспортные среды.

Анаэробные бактерии можно культивировать только на специальных бескислородных питательных средах с низким окислительно-восстановительным потенциалом (-10 - 150 мВ). Для контроля за степенью насыщения этих сред кислородом используют специальные редокс-индикаторы (метиленовый синий, резазурин), восстановленные формы которых бесцветны. При возрастании окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) метиленовый синий окрашивает среды в синий, а резазурин - в розовый цвет, что указывает на непригодность таких питательных сред для культивирования облигатных анаэробов.

Для сохранения низкого ОВП питательные среды должны быть агаризованы. Добавление даже 0,05% агара повышает их вязкость и уменьшает ее аэрацию. Для получения роста облигатно-анаэробных бактерий плотные питательные среды должны быть свежепри-

готовленными (не позднее двух часов после приготовления) или пре-
редуцированными (выдержаны в анаэробате не менее суток). Для
успешного выращивания анаэробов требуется внесение большого
количества посевного материала. Это связано с тем, что в больших
концентрациях облигатные анаэробы способны быстрее уменьшать
ОВР среды и тем самым создавать благоприятные условия для свое-
го роста.

Анаэробный тип дыхания во много раз менее продуктивный, чем
аэробный, поэтому питательные среды для анаэробов должны быть
значительно богаче питательными субстратами и витаминами. В ка-
честве питательной основы они содержат различные экстракты и без-
зольные гидролизаты (сердечно-мозговой и печеночный настои, дрож-
жевой и соевый экстракты, пептон, триптон, гидролитический пере-
вар казеина и др.), факторы роста (гемин, метионин, тини-80, сукин-
нат натрия и др.), цельную или лигированную кровь. Для выделения
различных анаэробов из смеси культур к питательным средам
добавляют желчь, азид натрия, антибиотики, налидиксовую кислоту,
малахитовый зеленый и другие ингредиенты. В практических лабора-
ториях для выделения анаэробов из патологического материала чаще
всего используют среду для контроля стерильности (СКС), среду Кит-
та - Тирощи, анаэробный кровяной агар (на основе эритроцит-агара
или агара Д), среду Вильсона-Блера и некоторые другие с соответст-
вующими добавками.

Методы создания анаэробных условий

Необходимым условием культивирования анаэробных бактерий
является создание анаэробных условий, что достигается с помощью
физических, химических, биологических и смешанных методов.

Физические методы

1. Для удаления растворенного в питательных средах кислорода
производят их регенерацию путем кипячения в течение 15-20 мин на
водяной бане с последующим быстрым охлаждением до 45-50°C.

После посева для предотвращения проникновения кислорода в
жидкую питательную среду ее поверхность заливают стерильным
вазелиновым маслом или парафином.

2. Посев содержащего анаэробы патологического материала в вы-
сокий столбик плотной или полужидкой питательной среды, кото-
рая разливается в пробирки в объеме 10-12 мл. Кислород воздуха

диффундирует обычно на расстояние 1,5-2,0 см от поверхности, а в глубине создаются благоприятные условия для роста облигатных анаэробов.

3. Эвакуационно-заместительный метод заключается в удалении воздуха из герметически закрытых сосудов (анаэроостатов, анаэробных боксов) с помощью вакуумного насоса с последующей заменой его инертным газом (азот, аргон, гелий) или бескислородной газовой смесью, состоящей из 80% азота, 10% двуокиси углерода и 10% водорода. В ряде случаев используют природный (магистральный) газ. Для поглощения остатков кислорода из газовой смеси используют палладиевый катализатор. Для поглощения водяных паров на дно анаэроостата помещают 5-6 г хлористого кальция, 10-12 г силикагеля или 20-30 г хлористого натрия.

Химические методы

1. Применение щелочных растворов пирогаллола для поглощения кислорода в замкнутой воздушной среде. Для поглощения кислорода из 220 мл воздуха применяют смесь, состоящую из 1 мл 20% раствора пирогаллола и 1 мл насыщенного раствора карбоната натрия Na_2CO_3 .

2. Для поглощения кислорода из замкнутого пространства можно применить гидросульфит натрия. Для связывания кислорода в 1 л объема берут 100 мл свеженриготовленного 20% раствора $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ и 16 мл 50% КОН. Эти реагенты связывают кислород быстрее, чем пирогаллол.

3. Для связывания остатков кислорода в предназначенных для роста анаэробов питательных средах используют вещества-редуценты, к которым относятся тиогликолевая кислота или тиогликолат натрия (0,01-0,02%), аскорбиновая кислота (0,1%), различные сахара (0,1-3%), цистин и цистенин (0,03-0,05%), муравьинокислый натрий (0,25-0,75%) и др.

4. Применение газогенерирующих систем для создания анаэробных условий в замкнутой воздушной среде (микроанаэроостатах, эксканаторах, прозрачных газонепроницаемых пластиковых пакетах).

Для образования водорода и двуокиси углерода, необходимых для роста облигатных анаэробов, используют специальные таблетки, которые активируются добавлением воды. Водород, генерируемый таблетками боргидрида натрия, связывает кислород воздуха в присутствии палладиевого катализатора с образованием воды. Углекислый газ вырабатывается при взаимодействии лимонной кисло-

ты с бикарбонатом натрия. Этот метод особенно удобен при работе в военно-полевых условиях.

Биологические методы

1. Совместное выращивание анаэробов и аэробов (метод Форгера). При этом на одну половину чашки Петри с плотной питательной средой засевают исследуемый материал, а на другую - культуру аэробного или факультативно-анаэробного микроорганизма, способного энергично поглощать кислород. После посева чашку закрывают крышкой, края которой для герметизации заливают парафином или заклеивают пластилином. В качестве активного поглотителя кислорода из замкнутого пространства часто используют культуру "чудесной палочки" (*Serratia marcescens*), которая является своеобразным индикатором качества анаэробноза. При недостаточной герметизации чашки этот микроорганизм образует ярко-красный пигмент, а при сохранении строго анаэробных условий вырастают бесцветные или бледно-розовые колонии.

2. Помещение в питательную среду кусочков печени, головного мозга, почек и других внутренних органов. При этом тканевые клетки активно поглощают и адсорбируют на себе кислород, в результате чего в среде создаются анаэробные условия. Примером питательной среды, сконструированной по этому принципу, является содержащая кусочки печени среда Китта - Тараши. К тому же в печеночной ткани содержится большое количество веществ с SH-группой (цистеин, глутатон и др.), обладающих сильным редуцирующим действием.

3. Культуры некоторых облигатных анаэробов можно поддерживать путем пассажа на лабораторных животных, однако в настоящее время этот метод используется достаточно редко.

В большинстве практических лабораторий используют смешанные методы создания анаэробных условий. Для работы с наиболее чувствительными к молекулярному кислороду анаэробами используют строгую анаэробную технику (метод Хангейта). Принцип метода заключается в использовании лишенных кислорода питательных сред, воздух над которыми удаляется и замещается бескислородным газом.

Для предотвращения попадания кислорода сосуды с питательными средами закрываются резиновыми пробками. Во время инокуляции анаэробноз поддерживается за счет постоянного омывания сред потоком бескислородного газа.

Методы выделения чистых культур облигатных анаэробов

1. Метод Шефслера. Исследуемый материал рассеивают петри-хамми по поверхности плотной питательной среды, помещают в анаэробные условия и выдерживают в термостате при 37°C в течение 24-72 ч. Изолированные колонии анаэробов пересеивают в среду для контроля стерильности (СКС) или среду Китта - Тароцци.

2. Метод Вейнберга. Несколько капель исследуемого материала вносят в пробирку с 4-5 мл изотонического раствора хлористого натрия, перемешивают запятым капилляром и переносят в пробирку с охлажденным до 45-50°C сахарным агаром, разлитым высоким столбиком. После перемешивания этим же капилляром последовательно засевают еще две пробирки с сахарным агаром и быстро охлаждают под струей холодной воды. Выросшие через 24-72 ч в глубине агара изолированные колонии анаэробов засевают в среду Китта - Тароцци или СКС.

3. Метод Вейона - Виньяля. Готовят разведения исследуемого материала в пробирках с сахарным агаром как указано выше. Из каждой пробирки разведенный материал насыивают в пастеровские пипетки, после чего запаивают их концы. После получения микробного роста пипетку надпиливают в соответствующем месте, разламывают с соблюдением правил стерильности и переносят изолированную колонию в среду Китта - Тароцци или СКС.

4. Метод Перетца. Готовят разведения исследуемого материала как указано выше. Содержимое пробирки с соответствующим разведением выливают в стерильную чашку Петри, на дне которой на двух стеклянных или деревянных палочках лежит стеклянная пластинка размером 6х6 см. Среду заливают сбоку таким образом, чтобы она заполнила пространство между пластинкой и дном чашки Петри. При появлении микробного роста стеклянную пластинку удаляют, а изолированную колонию засевают в пробирку со средой Китта - Тароцци или СКС для получения чистой культуры.

Наиболее простой и удобной разновидностью метода Перетца является метод "перевернутых чашек". При этом каждое разведение исследуемого материала в пробирке с сахарным агаром заливают в крышку чашки Петри и закрывают ее стерильным допышком чашки, избегая образования пузырей воздуха. Щель между краями крышки и дном чашки Петри заливают расплавленным парафином. Термостатируют при 37°C до появления изолированных колоний анаэробов.

Питательные среды и идентификации анаэробов

1. Анаэробный кровяной агар. Готовят на основе эритроцит-агара. В качестве добавок используют среду 199 (10%), гемин (10 мкг/мл), твин-80 (0,1%), менадион (10 мкг/мл), цитратную кровь (5%) и некоторые другие. После приготовления и стерилизации разливают в чашки Петри. Для посева используют свежеразлитые (не позднее 1,5-2 ч после приготовления) или прeredуцированные (не менее суток выдержанные в анаэробных условиях) среды.

2. Анаэробный кровяной агар с селективными добавками. Для подавления роста факультативно-анаэробных бактерий в питательную среду добавляют один из следующих антимикробных препаратов: неомисин или канамицин (75-80 мкг/мл), гентамицин (50 мкг/мл), палициксовую кислоту (40 мкг/мл). Вместо этих добавок на поверхность засеваемой питательной среды можно накладывать по 2-4 диска с канамицином (по 1000 мкг в диске).

3. Желточный агар. В питательную среду на основе эритроцит-агара добавляют гемин (10 мкг/мл), глюкозу (0,2%), суспензию яичного желтка (20%) и некоторые другие ингредиенты. Разливают в чашки Петри, используют для обнаружения лецитовителлазной и липазной активности анаэробных бактерий. При наличии фермента лецитиназы (продуцированной альфа-токсином *C. perfringens*) вокруг выросших на чашке колоний микроорганизмов образуются зоны помутнения (преципитата), а при наличии липазы - зоны радужной блестящей опалесценции, видимой при косом освещении.

4. Среда для контроля стерильности (СКС). Коммерческая питательная среда. Используется как транспортная и как среда накопления. Может применяться с селективными добавками (см. выше). Разливают в пробирки "высоким столбиком". Для обогащения питательной среды дополнительными факторами роста используют среду 199 (10%), гемин (10 мкг/мл), твин-80 (0,1%), менадион (10 мкг/мл) и некоторые другие.

5. Среда для исследования крови на бактерицино. Готовится на основе обогащенной СКС. Разливают во флаконы по 100-200 мл. Посев крови производят в объеме 5-10 мл непосредственно "у постели больного".

6. Среда Китта - Тароци. Готовят на основе бульона Хоттингера с добавлением кусочков печени или мяса и разливают по пробиркам. Используют в качестве среды накопления. После посева патологического материала для прекращения диффузии кислорода воз-

духа поверхность питательной среды заливают небольшим слоем вазелинового масла или расплавленного парафина.

7. Среда Вильсона - Блера. Готовится на основе сахарного агара с добавлением сернисто-кислого натрия (1%) и хлорного железа (0,08%), разливается по пробиркам "высоким столбиком". Используется для ускоренной диагностики газовой гангрены. При наличии в исследуемом материале *C. perfringens* через 4-6 ч инкубации при температуре 42°C среда чернеет и в ней появляются множественные разрывы агара.

8. Лакмусовое молоко. Готовят на основе свежего снятого молока с добавлением лакмусовой настойки, разливают в пробирки "высоким столбиком". Используют для ускоренной диагностики газовой гангрены. При наличии в исследуемом материале *C. perfringens* через 2-4 ч инкубации при температуре 42°C в среде появляются кирпично-красный, пронизанный пузырьками газа творожистый осадок казеина и прозрачная сыворотка.

9. Сахарный агар. Готовят на основе эритро-агара с добавлением 1% глюкозы. Разливают в пробирки по 10-15 мл. Используют для выделения анаэробов по методам Вейнберга, Вейона - Виньяля, Перетца.

10. Среды для определения сахаролитических свойств анаэробов. Содержат 0,5% мясо-пептонного агара, 1% непатуемых углеводов и индикатор pH. Разливают в пробирки "высоким столбиком", не требуется добавления вазелинового масла.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ, УСТОЙЧИВОСТИ И ТОЛЕРАНТНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К АНТИБИОТИКАМ И ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

Антибиотики - это продуцируемые живыми организмами вещества, способные избирательно убивать микроорганизмы или подавлять их рост и размножение. В промышленных масштабах антибиотики получают путем биосинтеза микроорганизмами-продуцентами и полусинтетически, модифицируя химическим путем молекулы природных антибиотиков. Знание химического строения природных антибиотиков позволяет получать некоторые из них, например хлорамфеникол (левомицетин), путем химического синтеза. Антибактериальную активность антибиотиков выражают в единицах действия (ЕД). Для большинства антибиотиков 1 ЕД соответствует 1 мкг химически чистого препарата. Исключение составляют пенициллины (1 ЕД=0,6 мкг), нистатины (1 ЕД=0,333 мкг), для которых сохранены единицы действия, установленные на эталонных тест-микробах до получения химически чистых препаратов этих антибиотиков.

Каждый антибиотик имеет определенный антимикробный спектр действия, соответствующий числу чувствительных к нему видов микроорганизмов. Условно различают антибиотики широкого и узкого спектра действия. Различия в диапазоне спектра определяются особенностями механизма действия антибиотиков. По типу подавляющего действия антибиотики распределяются на бактериостатические (подавляют рост и размножение микробов) и бактерицидные (вызывают гибель микроорганизмов). Только антибиотики бактерицидной группы убивают микроорганизмы в организме человека.

В современный период широкого и интенсивного применения антибиотиков резко возросла циркуляция микроорганизмов с приобретенной антибиотикорезистентностью. Формирование приобретенной антибиотикоустойчивости происходит путем селекции антибиотиками спонтанных антибиотикоустойчивых мутантов бактерий, а также путем распространения R-плазмид среди популяций микроорганизмов. В отличие от хромосомных генов антибиотикорезистентности, плазмидные гены контролируют преимущественно множественную устойчивость к антибиотикам, реализуемую путем синтеза ферментов, разрушающих антибиотики. Циркуляция антибиотикорезистентных

микроорганизмов в современный период столь широка, что только точное определение чувствительности к антибиотикам каждого конкретного возбудителя инфекции может обеспечить правильный выбор препарата для химиотерапии.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам и другим химиопрепаратам определяют двумя группами методов: диско-диффузионным (метод диффузии в агар с применением бумажных дисков с антибиотиками) и методом разведений антибиотика в плотной или жидкой питательной среде. Выбор метода зависит от цели исследования и возможностей лаборатории. Диско-диффузионный метод следует рассматривать как качественный. Благодаря простоте исполнения он является основным для практических лабораторий. Методы разведения - более точные количественные способы исследования. Их применяют в особо важных практических случаях и научно-исследовательской работе.

Исследованию на чувствительность к антибиотикам должен подвергаться возбудитель инфекции в чистой культуре. Для обеспечения этого требования необходимо соблюдать следующие правила взятия материала на исследование. Материал должен быть получен до начала антибактериальной терапии или после введения антибактериального препарата через такой срок, который необходим для его элиминации из организма. Материал для посева следует брать непосредственно из очага инфекции с соблюдением правил асептики (стерильными инструментами в стерильную посуду). Если взятие материала непосредственно из очага инфекции невозможно, но он соприкасается с внешней средой, можно провести исследование соответствующего отделяемого (мочи, мокроты и др.). Материал засевают на соответствующий набор питательных сред, необходимых для выделения чистых культур различных видов микроорганизмов. В смешанной культуре определять чувствительность к антибиотикам не следует, так как можно получить ложные результаты вследствие микробного антагонизма и разной скорости роста микроорганизмов. Если выяснить истинного возбудителя инфекции не удается или патологический процесс вызван микробной ассоциацией, отдельно исследуют чувствительность к антибиотикам всех членов ассоциации, выделенных в чистой культуре.

Исследование чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам проводят стандартными унифицированными методами, регламентированными официальными инструкциями.

Критерии оценки чувствительности, устойчивости и толерантности микроорганизмов к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам

Используемые в медицине понятия чувствительности и устойчивости микроорганизмов к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам основаны на клинической точке зрения. В соответствии с этим подходом критерием чувствительности микроба является концентрация антибиотика (химиопрепарата) в организме человека (в очаге инфекции) в ЕД/мл или мкг/мл, достигаемая при терапевтических дозировках препарата. С этим критерием сравнивают минимальную ингибирующую рост микроорганизма концентрацию антибиотика (МИК в ЕД/мл или мкг/мл), определяемую при выращивании микроба на питательной среде с антибиотиком. Если МИК антибиотика для микроорганизма *in vitro* меньше или равна концентрации этого антибиотика в организме человека, то этот микроорганизм чувствителен к антибиотику; при противоположном соотношении микроорганизм устойчив к антибиотику.

В соответствии с инструкцией по унифицированным методам в клинической практике микроорганизмы распределяют на ряд групп по степени чувствительности к антибиотикам:

1 группа - "чувствительные" микроорганизмы, когда обычно применяемые дозы антибиотика достаточны для достижения лечебного эффекта;

2 группа - "среднечувствительные" микроорганизмы, когда только повышенные (максимально переносимые) дозы антибиотика могут обеспечить лечебный эффект;

3 группа - "умеренно устойчивые" микроорганизмы, когда лечебный эффект может быть достигнут только при возможности концентрации препарата в очаге или введении непосредственно в очаг инфекции;

4 группа - "устойчивые" микроорганизмы, когда нельзя рассчитывать на лечебный эффект.

В медицинской практике обычно определяют три группы микроорганизмов по чувствительности к антибиотикам: "чувствительные", "среднечувствительные" и "устойчивые". Конкретные критерии их определения методом серийных разведений антибиотиков представлены в табл.3. Диско-диффузионным методом определяют указанные группы чувствительности микроорганизмов, исходя из различных диаметров задержки роста бактерий вокруг дисков с антибио-

Группы микроорганизмов по степени чувствительности к антибиотикам (МИК в мкг/мл или ЕД/мл)*

Антибиотик	Группы микроорганизмов			
	чувствительные	среднечувствительные	умеренно устойчивые	устойчивые
Пенициллин G	0,25	16	128	≥ 128
Пенициллин V	0,25	4	128	≥ 128
Метициллин	2	-	-	-
Ампициллин	0,25	16	128	≥ 128
Карбенциллин	-	16	128	≥ 128
Цефалоспорины	2	16	128	≥ 128
Стрептомицин	4	-	128	≥ 128
Канамицин	4	-	128	≥ 128
Неомицин	4	-	128	≥ 128
Гентамицин	0,5	4	64	≥ 64
Левомецетил	1	8	-	≥ 64
Тетрациклины	1	4	64	≥ 64
Эритромицин	1	4	64	≥ 64
Линкомицин	1	4	64	≥ 64

* По унифицированным методам определения чувствительности микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам.

типами конкретно для различных антибиотиков в соответствии с табл. 4.

В некоторых случаях при длительной химиотерапии инфекций, вызываемых грамположительными бактериями (стрептококками, энтерококками и др.), наблюдается отсутствие синирующего действия бактерицидных антибиотиков (пенициллины и др.) на фоне выделения бактерий чувствительных к используемому антибиотику по минимальной ингибирующей рост концентрации. Это проявление толерантности (терпимости) бактерий к антибиотику. Толерантность бактерий к антибиотику - это утрата ими чувствительности к бактерицидному действию антибиотика при сохранении чувствительности к бактериостатическому действию антибиотика. Условно критерием толерантности микроорганизма к антибиотику считают превышение минимальной бактерицидной концентрации (МБК) анти-

Оценка результатов определения чувствительности бактерий к антибиотикам диско-диффузионным методом

Антибиотик	Диаметр зон задержки роста бактерий, мм					
	для сред № 1 и № 2			для сред АТВ		
	устойчивые	средне-устойчивые	чувствительные	устойчивые	средне-устойчивые	чувствительные
Бензилпенициллин для стружечной для других бактерий	≤ 20 ≤ 11	21-28 12-21	≥ 29 ≥ 10	≤ 20 ≤ 10	21-28 11-10	≥ 29 ≥ 17
Ампициллин для стружечной для структуроустойчивых бактерий и энтерококков	≤ 20 ≤ 9	21-28 10-13	≥ 29 ≥ 14	≤ 20 ≤ 9	21-28 10-13	≥ 29 ≥ 14
Карбенициллин для жидкой и сред для синтетической питательной	≤ 14 ≤ 13	15-18 14-16	≥ 19 ≥ 17	≤ 14 ≤ 11	15-18 12-14	≥ 19 ≥ 13
Метилгаликсил	≤ 13	14-17	≥ 18	≤ 13	14-18	≥ 19
Оксациллин	≤ 19	20-23	≥ 24	≤ 15	16-19	≥ 20
Цифран	≤ 11	12-16	≥ 17	-	-	-
Цифалекс	≤ 11	12-16	≥ 17	≤ 14	15-18	≥ 19
Стратифорин	≤ 13	14-16	≥ 17	≤ 16	17-19	≥ 20
Ванкомицин	≤ 14	15-18	≥ 19	≤ 14	15-18	≥ 19
Новалин	≤ 13	14-17	≥ 18	≤ 12	13-16	≥ 17
Гипоцилин	≤ 13	-	≥ 14	≤ 15	-	≥ 16
Саломон	≤ 13	-	≥ 14	-	-	-
Тетрациклин	≤ 13	16-19	≥ 20	≤ 16	17-21	≥ 22
Доксициклин	≤ 12	13-19	≥ 20	-	-	-
Эритромицин	≤ 14	15-18	≥ 19	≤ 17	18-21	≥ 22
Оксалин	≤ 12	13-17	≥ 18	≤ 16	17-20	≥ 21
Линколин	≤ 19	20-23	≥ 24	≤ 18	20-21	≥ 24
Аксидин	≤ 14	15-18	≥ 19	≤ 12	13-15	≥ 16
Рифамицин	≤ 9	10-12	≥ 13	≤ 12	13-15	≥ 16
Фузидат	≤ 12	13-19	≥ 20	-	-	-
Полимиксин	≤ 8	9-12	≥ 13	≤ 11	12-14	≥ 15
Ристомин	≤ 9	10-11	≥ 12	≤ 9	10-11	≥ 12

биотика его минимальной ингибирующей рост концентрации (МИК) в 32 раза и более.

Определение чувствительности бактерий к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам диско-диффузионным методом

Для исследования необходимо использовать стандартные питательные среды: отечественные среды АГВ, № 1, № 2; зарубежные - агар Mueller-Hinton 2. Сухая питательная среда АГВ для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам используется в соответствии с наставлением по применению. Среды № 1 и № 2 изготавливают в лаборатории по их прописи: среда № 1 - бульон Хоттингера (120-140% аммиачного азота) - 1 л, агар-агар 15 г, натрия фосфат двузамещенный 3 г, рН-7,2-7,4; среда № 2 - мясо-пептонный бульон (1:2) 1 л, агар-агар 15 г, натрия фосфат двузамещенный 3 г, рН после стерилизации 7,2-7,4. Для гемофильных бактерий, не растущих на указанных средах, дополнительно добавляют 5% дефибринированной или гемолитизированной крови. Агар Mueller-Hinton 2 может применяться и для определения чувствительности к сульфаниламидам. Чашки Петри с питательной средой перед употреблением подсушивают в течение 30-40 мин.

Стандартные диски с антибиотиками промышленного производства используются только до истечения срока их годности. После вскрытия флакон с дисками можно хранить в течение недели в рефрижераторе при 10°C.

На поверхность подсушенной питательной среды в чашке Петри наносят 1 мл исследуемой культуры (18-20- часовая бульонная культура или стомиллионная суспензия из агаровой культуры), равномерно распределяют путем покачивания чашки и удаляют избыток пипеткой. В экстренных случаях для получения ориентировочных данных допускается непосредственный посев клинического материала. Плотные субстраты (мокрота, гной, кал и др.) должны быть предварительно гомогенизованы (растерты), мочу и экссудат засевают из осадка после центрифугирования. Материал наносят на чашку ватным тампоном. После выделения чистой культуры исследование повторяют уже с ней. После посева чашки подсушивают при комнатной температуре 10-15 мин. Диски с антибиотиками накладывают пинцетом на равном расстоянии друг от друга и на 2 см от края чашки (на 1 чашку не более 6 дисков). При возможности используют для наложения дисков специальное устройство - диспен-

сер. Чашки сразу ставят в термостат вверх дном и инкубируют при 35-37°C в течение 18-20 ч.

Для учета результатов чашки помещают вверх дном на темную матовую поверхность и освещают настольной лампой под углом 45°. Допускается учет в проходящем свете. С помощью линейки измеряют диаметры зон задержки роста вокруг дисков, включая диаметр дисков, с точностью до 1 мм. Не следует обращать внимание на очень мелкие колонии в пределах зоны торможения роста. При нерезко очерченных краях зон или зонах с двойными контурами следует измерить диаметр зоны по наиболее четкому контуру. При наличии больших колоний по периферии зоны граница ее определяется по внутреннему краю этих колоний. Если крупные колонии распределены по всей зоне, то следует проверить культуру на чистоту и испытания повторить.

Оценку результатов проводят по таблице 4 в соответствии с используемой средой и видами бактерий.

Для контроля точности и воспроизводимости результатов, а также качества питательных сред, дисков и методики проводят испытание чувствительности к антибиотикам эталонных штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Исследование остается достоверным, если диаметры зон задержки роста эталонных штаммов соответствуют таблице 5.

Определение чувствительности бактерий к антибиотикам методом серийных разведений антибиотика в питательной среде

Метод разведения антибиотиков в бульоне. Для исследования используют бульоны Хоттшигера или мясо-пептоновый с содержанием 1,2-1,4 г/л аммиачного азота, pH 7,2-7,4. Можно использовать специальные среды, например бульон Мартена для дифтерийных микробов, жидкую среду Сабуро для грибов и др. Для испытания чувствительности бактерий к сульфаниламидным препаратам применяют особые синтетические среды. Для приготовления основных растворов антибиотиков их порошок взвешивают и растворяют в стерильной дистиллированной воде так, чтобы получить определенную удобную концентрацию, например 2000 мкг/мл (ED/мл). Некоторые антибиотики предварительно растворяют в этаноле, диметилсульфоксиде, а затем разводят стерильной дистиллированной водой. Основные растворы антибиотиков пригодны к использованию при хранении в холодильнике в течение недели.

Допустимые пределы диаметров зон задержки роста эталонных штаммов при контроле воспроизводимости и точности результатов диско-диффузионного метода

Активитивик	Диаметр зон задержки роста бактерий, мм					
	Диаметры зон задержки роста на средах № 1 и № 2, мм			Диаметры зон задержки роста на среде АТВ, мм		
	Штамм АТСС 25923	Е. coli АТСС 25922	P. aeruginosa АТСС 27853	Штамм АТСС 25923	Е. coli АТСС 25922	P. aeruginosa АТСС 27853
Гонимондроллин	—	—	—	29–38	—	—
Аксипролин	24–35	13–20	—	30–36	14–20	—
Нарфендроллин (25 мг)	—	—	—	32–38	19–25	—
Нарфендроллин (100 мг)	—	21–26	20–24	35–42	23–29	18–24
Метилрлин	—	—	—	22–30	—	—
Оксацилин	27–32	—	—	24–34	—	—
Петростин	24–37	15–22	—	30–40	15–20	—
Сурфенорин	17–25	14–22	—	20–25	14–19	—
Пеницилин	19–27	18–24	—	20–27	13–17	—
Пеницилин	19–27	18–24	—	20–27	13–17	—
Ганацилин	20–27	18–26	—	20–27	15–19	—
Гентоцилин	20–28	20–27	16–24	22–32	21–30	16–26
Глоциллин	20–29	19–26	—	22–31	17–26	—
Азитроцилин	23–31	—	—	22–31	8–15	—
Оксалиндицин	20–29	—	—	22–29	—	—
Амоксицилин	24–32	—	—	24–32	—	—
Амоксицилин	21–27	23–28	—	19–25	19–27	—
Рифампицин	—	—	—	26–34	7–11	—
Политетрацилин	—	12–17	—	—	16–20	15–20
Пенициллин	14–18	—	—	12–16	—	—

Разведения антибиотиков готовят путем разбавления основного раствора антибиотика бульоном в диапазоне, определенном критериями антибиотикоустойчивости. Например, для двукратных разведений антибиотика в диапазоне от 0,25 до 128 ЕД/мл используют 11 пробирок, в которые, кроме первой пробирки, вносят по 1 мл бульона. В первую пробирку вносят 2 мл раствора антибиотика с концентрацией 256 ЕД/мл, полученного путем предварительного разведения 2 мл основного раствора антибиотика 2000 ЕД/мл в 13,62 мл бульона. Затем отдельными пипетками переносят по 1 мл раствора антибиотика из первой пробирки в каждую последующую. Из предпоследней пробирки 1 мл смеси удаляют, в последней пробирке антибиотик не добавляют (контроль). Испытуемые микроорганизмы, суточную бульонную или агаровую культуру разводят бульоном до 10^7 - 10^8 микробных тел в 1 мл и вносят по 1 мл во все пробирки с разведениями антибиотика и в контрольную. Следовательно, концентрация антибиотика в пробирках уменьшается в 2 раза. Посевы инкубируют при 37°C до появления роста в контроле. Отмечают первую пробирку с задержкой роста микробов. Концентрация антибиотика в этой пробирке является минимальной ингибирующей рост для испытуемого штамма микроба (МИК в ЕД/мл или мкг/мл).

Метод разведений антибиотиков в питательном агаре. Для исследования используют агар Хоттингера или мясо-пептонный агар с содержанием 1,2-1,4 г/л аммиачного азота, 1-2% агара, рН 7,2-7,4. При необходимости в агар добавляют 5% дефибрированной крови. На среде агар Mueller - Hinton 2 можно испытывать чувствительность к антибиотикам и сульфаниламидам. Для определения чувствительности к сульфаниламидам следует применить особые синтетические среды. Питательный агар расплавляют и разливают в стерильные колбы по числу изучаемых концентраций антибиотика, например, в диапазоне от 0,25 до 128 ЕД/мл используют 11 колб (одна колба для контроля без антибиотика). В первую колбу вносят 37,44 мл МПА, в остальные - по 20 мл. Затем в первую колбу добавляют 2,56 мл основного раствора антибиотика с концентрацией 2000 ЕД/мл. Концентрация препарата в колбе будет 128 ЕД/мл. Переносят мерным стерильным цилиндром последовательно из первой колбы во вторую и так далее по 20 мл МПА с антибиотиком и получают ряд двукратных разведений. В последнюю колбу антибиотик не добавляют (контроль). Содержимое каждой колбы быстро выливают в чашку Петри. Чашки с застывшим МПА с антибиотиком используют сразу. Испытуемые микроорганизмы, суточные буль-

опные или агаровые культуры, разводят бульоном до концентрации 10^7 микробных тел в 1 мл. Культуру засевают петлей или штампом-репликатором. На каждую чашку наносят по секторам или квадратам 12-24 испытуемых штамма. Посевы инкубируют при 37°C 18-24 ч и более до появления роста в контроле (без антибиотика). Для каждого штамма отмечают первую чашку с полной видимой задержкой роста микробов. Концентрация антибиотика в питательном агаре этой чашки является минимальной ингибирующей рост концентрацией для испытуемого штамма микроорганизма (МИК в ЕД/мл или мкг/мл).

Определение толерантности бактерий к антибиотикам

Первым этапом исследования является определение минимальной ингибирующей рост концентрации (МИК) используемого антибиотика с бактерицидным механизмом действия (например, бензилпенициллина) в отношении испытуемого штамма бактерий. Исследование проводят методом серийных разведений. После учета МИК антибиотика приступают ко второму этапу - определению минимальной бактерицидной концентрации антибиотика (МБК). Для этого из всех пробирок с антибиотиком, в которых отсутствует визуально рост бактерий, делают высев по 0,1 мл на отдельные чашки с питательной средой (агар Хоттингера, МПА или 5% кровяной агар) и инкубируют при $35-37^{\circ}\text{C}$ 18-24 ч. Определяют минимальную бактерицидную концентрацию антибиотика (МБК) по первой пробирке с антибиотиком, высев из которой не дал роста колоний бактерий. Для выявления толерантности бактерий к антибиотику сопоставляют его МИК и МБК. Испытуемый штамм бактерий считается толерантным к антибиотику если это соотношение ≥ 32 .

Ускоренные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам

В практике лабораторий ускоренное определение чувствительности микроорганизмов к антибиотикам и другим химиотерапевтическим препаратам осуществляется некоторыми зарубежными автоматизированными системами микробиологических исследований (MS-2, Quantum 2, Sceptor и др.). В кюветах панели содержатся дегидрированные субстраты или диски с антибиотиками. Каждый антибиотик в кювете представлен в одной концентрации, соответствующей критерию принадлежности бактерий к группе "чувствительных" к ан-

тибиотику. Одновременно тестируется 20 и более антибиотиков. После внесения взвеси испытуемых бактерий посеивы инкубируют при 35-37°C в течение 4-5 ч. Результаты регистрируют спектрофотометрически или кондуктометрически сразу при появлении размножения бактерий в контроле без антибиотика.

Для ускоренного определения чувствительности или устойчивости бактерий к бета-лактамам антибиотикам широко используются различные методы выявления бета-лактамазной активности бактерий. Представим один из методов определения бета-лактамазы бактерий (Сиволодский Е.П., 1980). На фильтровальную бумагу (2x2 см) в чашке Петри наносят одну каплю 2% раствора водорастворимого крахмала. После ее впитывания наносят петлей в центр бумаги агаровую культуру испытуемых бактерий (например стафилококков) и растирают в виде бляшки диаметром 3-4 мм. На поверхность бляшки наносят одну каплю (0,05 мл) рабочего йодного раствора бензилпенициллина. После экспозиции 10 мин при комнатной температуре учитывают результаты реакции. Наличие бета-лактамазы на темно-синем фоне четкая зона полного просветления вокруг бляшек бактерий. Отсутствие бета-лактамазы на темно-синем фоне нет зоны просветления вокруг бляшки, края бляшки нечеткие, сливаются с фоном. Наличие бета-лактамазы указывает на устойчивость бактерий к антибиотику.

Реактивы на бета-лактамазу: реактив №1 - 0,005-молярный раствор йода (йод -1,27 мг/мл, калия йодид -15 мг/мл; 1/15 -молярный фосфатный буфер pH 6,5 до необходимого объема); реактив №2 - 2% раствор водорастворимого крахмала; реактив №3 - рабочий йодный раствор бензилпенициллина (во флакон, содержащий 500 000 ЕД бензилпенициллина, вносят 10 мл реактива №1), годен в течение 2 ч.

ПРИМЕНЕНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Биологическими называются методы исследований, проводимых на лабораторных животных. Они дополняют и углубляют данные микробиологических анализов. Целью этих исследований является выделение микроорганизмов из исходного материала, в том числе и загрязненного другими микроорганизмами, а также в тех случаях, когда возбудитель не может быть обнаружен методом посева, на-

пример при вирусных и риккетсиозных заболеваниях. На лабораторных животных определяют вирулентность и токсигенность микроорганизмов, воспроизводят характерную клиническую картину (столбняк), изучают вопросы иммунитета, эффективность биологических и антибактериальных препаратов, получают иммунные сыворотки.

Экспериментальное заражение животных

В микробиологической практике для заражения чаще всего используют белых мышей, морских свинок и кроликов. Некоторые специальные исследования проводят на кошках, мелком и крупном рогатом скоте, крысах и птицах.

При выборе лабораторного животного необходимо учитывать степень его восприимчивости к изучаемому возбудителю. Так, например, морские свинки восприимчивы к туберкулезу, дифтерии, чуме, сибирской язве; мыши - к туляремии, чуме, ботулизму, столбняку, газовой гангрене и т.д. Каждое лабораторное животное, взятое в опыт, маркируют. Дух кроликов и морских свинок применяют металлические пластинки, на которых выгравирован номер. Эти пластинки перед употреблением стерилизуют кипячением или в 80% этиловом спирте и затем прикрепляют с помощью шплов к наружной поверхности ушной раковины. Мышей и крыс метят, окрашивая их шерсть различными красками (водный раствор пикриновой кислоты, спиртовые растворы бриллиантового зеленого, фуксина, хризондина и др.). Метить животных надо по определенной схеме красками разных цветов, обозначающими разные числа. Фуксином обозначают единицы, а пикриновой кислотой - десятки. Например, окраска фуксином левой передней лапы соответствует первому номеру; левого бока - второму; левой задней лапы - третьему; головы - четвертому; спины - пятому и т.д. Так, если желтым цветом покрасить левый бок, а красным - голову, то это будет двадцать четвертый номер.

Инструменты, используемые при заражении животных, стерилизуют кипячением в течение 30 мин.

Животных перед опытом необходимо зафиксировать и обязательно обезболить. Для обезболивания чаще всего применяют эфирный наркоз. Для этого морских свинок и мышей помещают на короткое время в закрытую стеклянную банку, на дно которой кладут кусочек ваты, смоченный эфиром. Животным более крупных видов накладывают на мордочку маску с эфиром.

При введении материала в вену кролика или взятии крови животное помещают в специальный деревянный ящик, в передней стенке которого имеется регулируемое отверстие для головы. Можно также заплеленать кролика в полотно, предварительно подогнув лапы к животу.

При введении материала морским свинкам фиксацию осуществляет помощник. Он правой рукой удерживает задние лапки, а левой фиксирует грудь.

Мышей фиксируют различными способами. Помощник берет правой рукой мышь за хвост, а левой захватывает кожу головы. Для внутривенного введения помощник держит мышь за кожу затылка и у основания хвоста, а экспериментатор берет в руки хвост и вводит материал в хвостовую вену.

Внутрибрюшинное, подкожное и другие манипуляции с мышами может осуществлять и один человек. Для этого надо захватить указательным и большим пальцами левой руки кожу на затылке, а хвост и левую заднюю лапку удерживать между ладонью и IV, V пальцами. Правой рукой делают инъекцию (рис. 5).

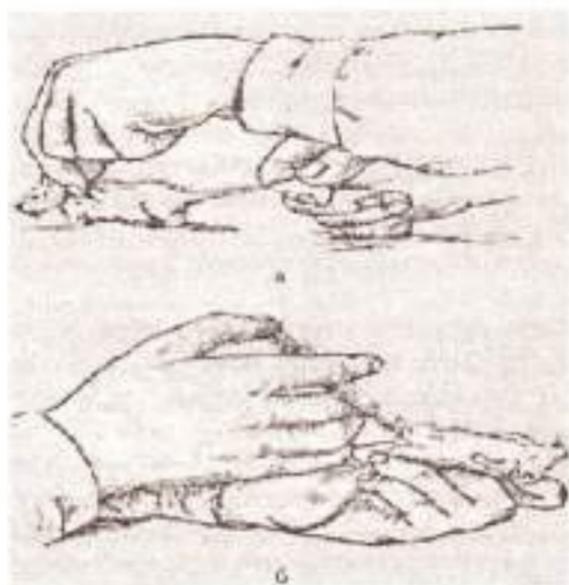


Рис. 5. Фиксация мыши при работе без помощника (а, б).

Способы введения исследуемого материала животным могут быть следующими: подкожный, внутрикожный, накожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, пероральный (через рот), интраназальный (через нос), интрацеребральный (в мозг) и др.

Подкожный способ введения. Кроликам материал вводят под кожу спины или другой части тела, морским свинкам - под кожу живота или бока, мышам и крысам - под кожу спины или затылка.

Для подкожного введения кожу в месте введения предварительно освобождают ножницами от волос и смазывают дезинфицирующим раствором, затем захватывают двумя пальцами руки и у основания образовавшейся складки вкалывают иглу шприца, медленно вводят ее до половины, чуть отклоняя в сторону, чтобы не вылился вводимый материал. Затем складку кожи отпускают накладывают на иглу вату, смоченную спиртом или йодной настойкой, и быстро вынимают иглу.

Внутрикожный способ введения. Инъекцию делают тонкой иглой (№18-20). Удобно использовать туберкулиновый шприц. Кожу, освобожденную от шерсти, растягивают большим и указательным пальцами; иглу вводят под острым углом срезом вверх. Правильно введенная игла просвечивает сквозь эпидермис. Исследуемый материал вводят медленно (обычно в объеме 0,1 мл); на месте введения образуется пузырек с поверхностью, напоминающей лимонную корочку.

Внутримышечное введение. Кроликам и морским свинкам материал вводят чаще всего в мышцу задней лапы, птицам - в мышцы груди.

Внутрибрюшинное введение. Животное удерживают в вертикальном положении головой вниз, чтобы внутренние органы переместились к диафрагме. Иглу вводят в нижнюю часть живота. Для инъекций применяют короткие иглы. Момент проникновения иглы в брюшную полость воспринимается как "провал". Предельные дозы введения: мышам - 1; свинкам - 5; кроликам - 10 мл.

Внутривенное введение. Кроликам материал вводят в красную вену уха, мышам - в вену хвоста, морским свинкам - в сердце, птицам (курам, голубям) - в вену, расположенную на внутренней поверхности крыла, которая хорошо видна после выщипывания перьев. Участок кожи, вокруг расположения вены для лучшего ее наполнения следует предварительно протереть ватой, смоченной кислотом или теплой водой. Нельзя допускать попадания пузырьков воздуха в шприц, т.к. это может стать причиной газовой эмболии.

Введение через рот. Исследуемый материал примешивают к кор-

му либо вводят через гибкий резиновый катетер или зонд. Есть и другие способы, когда материал вводят в пищевод с помощью шприца с иглой, имеющей на конце оливку, или закапыванием в рот, причем каждую следующую каплю вводят только после того, как животное проглотило предыдущую.

Введение через нос. Животному дают легкий наркоз, при этом инфекционный материал глубоко проникает в легкие. При глубоком наркозе дыхание поверхностное, материал плохо втягивается. Предельные дозы: для мышей - 0,03-0,05; крыс - 0,05-0,1; свинок и кроликов - до 2 мл.

Введение в мозг. Мелким животным (крысам и мышам) материал вводят туберкулиновым шприцем с тонкой иглой, ограниченной металлической муфтой, на глубину 1,5 - 2 мм в количестве 0,01 - 0,02 мл. Мышь удерживают рукой так, чтобы большим и указательным пальцами можно было оттягивать кожу головы к затылку, а мизинцем и безымянным пальцами фиксировать хвост. Место инъекции смазывают йодом, укол делают на уровне средней трети линии, соединяющей внутренний угол глаза с основанием уха. Материал вводят медленно, чтобы не вызвать резкого повышения внутричерепного давления. Предельная доза для морских свинок - 0,1 мл; кроликов - 0,3 мл; более крупных животных - 0,5-0,8 мл.

Вскрытие лабораторных животных и взятие материала для бактериологического исследования

Павшие или заболевшие животные должны быть вскрыты. Больных свинок и мышей усыпляют с помощью эфирного наркоза. Кроликов умерщвляют путем введения 5 см³ воздуха в ушную вену. Вскрытие делают на специальном столе, соблюдая правила асептики. Перед работой надевают халат и резиновые перчатки. На столе должны быть: доска мягкого дерева, два скальпеля, два пинцета (хирургический и анатомический), ножницы прямые и купферовские, бактериологическая петля, банка с ватой, стекла предметные, горелка, стакан со спиртом и ватой на дне для инструментов, 2% и 5% раствор лизола, а также стерильные пробирки, чашки Петри, ватные тампоны, пинетки пастеровские, физиологический раствор и набор готовых питательных сред в чашках и пробирках.

Перед вскрытием шерсть животного обмывают ватным тампоном, смоченным 2% раствором лизола, труп укладывают на доску, покрытую стерильной бумагой, животом вверх. Лапки широко раздвигают и прикалывают к доске иглами или привязывают к крюч-

кам по углам доски. После фиксации животного осматривают наружные покровы и разрезают кожу от лобка до нижней челюсти. По направлению передних и задних лапок кожу рассекают боковыми надрезами. Скальпелем отсепаровывают кожу от подкожной клетчатки, осматривают паховые и подмышечные лимфатические узлы. Из измененных лимфатических узлов готовят четыре мазка-отпечатки и производят посев на питательные среды. После этого приступают к вскрытию грудной и брюшной полостей, остерегаясь попадания дезинфицирующего раствора внутрь.

Грудную полость вскрывают, подняв мечевидный отросток пинцетом, ножницами перерезают ребра в области хрящей. Осматривают грудную полость и при наличии изменений в органах из части их делают мазки-отпечатки и посевы на питательные среды. Из легких готовят три мазка-отпечатка. Обязательно исследуют кровь из сердца, для чего верхушку его прижимают раскаленным скальпелем и в этом месте проколов мышцу стерильной пастеровской pipеткой, набирают кровь, готовят мазок и высевают на питательные среды.

Брюшную полость вскрывают, придерживая пинцетом переднюю брюшную стенку, и ножницами рассекают ткани от лобка до диафрагмы, а боковыми надрезами к паху и у диафрагмы широко открывают брюшную полость, сохраняя неповрежденным кишечник.

При осмотре органов брюшной полости особое внимание обращают на селезенку и печень. Из этих органов готовят мазки-отпечатки (из селезенки - 2, а из печени - 1) и делают посевы в соответствующие среды.

Черепную коробку после удаления кожного покрова головы, вскрывают. Череп смывают водом и медкой пилкой распиливают на уровне верхнего края глазницы, боковых затылочных костей и по наружному краю лобных костей.

Крышку черепной коробки удаляют и производят посев из мозга. Головной мозг извлекают после пересечения спинного мозга на уровне большого затылочного отверстия.

После вскрытия труп животного сжигают или автоклавировают, а при невозможности это сделать заливают на сутки 5% лилолом или 5% карболовой кислотой. Инструменты тщательно очищают от крови и стерилизуют кипячением в течение 40 мин, а доску для вскрытия заливают дезинфицирующим раствором.

Мазки-отпечатки на предметных стеклах фиксируют в смеси Никифорова 10-15 мин, окрашивают и изучают. Посевы помещают в термостат.

Взятие крови у лабораторных животных

У кроликов кровь можно брать из уха, сердца, а при необходимости получить максимальное количество крови прибегают к тотальному обескровливанию. Главным местом взятия крови у кролика является краевая вена уха. Перед взятием крови удаляют волосы с наружной поверхности уха в месте укола и дезинфицируют кожу спиртом. Для усиления гиперемии помощник прижимает вену у корня уха. Иглу вводят под кожу по ходу вены, прокалывают стенку сосуда и каплюющую кровь собирают в стерильную пробирку.

У мыши или крысы кровь обычно берут из хвостовой вены. Для усиления гиперемии хвост опускают на несколько минут в стакан с теплой водой (40-50°C), после этого протирают спиртом и надрезают. Можно ввести иглу в боковую вену хвоста по направлению к туловищу.

Для взятия крови у морских свинок чаще прибегают к пункции полостей сердца. Укол делают в месте наиболее хорошо ощущаемого сердечного толчка во втором межреберье, около 1,5 см от левого края грудины на глубину 1,5 - 2 см. Если игла попала в сердце, кровь начинает поступать в шприц.

У птиц (кур) кровь получают пункцией сердца по А. П. Окунцову. Птицу укладывают спинкой на стол и помощник фиксирует ее, правой рукой оттягивает ноги, а пальцем левой руки сжимает крылья у основания. Место введения иглы - середина линии, соединяющей киль грудной кости и начало разветвления ключиц. Из этой точки вниз проводят перпендикулярную прямую, не доходящую на 1 см до горизонтальной линии, соединяющей плечелопаточный сустав с верхушкой среднего отростка грудины. Колец этой перпендикулярной линии и будет местом введения иглы. Перья на месте укола выщипывают, кожу протирают спиртом и 5-граммовым шприцем с иглой не менее 6 см длиной и диаметром 0,5 - 1 мм отбирают кровь из сердца. Глубина введения иглы в грудную полость - около 3,5 - 5 см.

Кровь у баранов берут из яремной вены шприцем или специальной иглой для взятия крови. Шерсть по ходу яремной вены выстригают. Место взятия обмывают теплой водой с мылом, вытирают и смазывают водной настойкой. На основание шеи накладывают жгут, при этом яремная вена набухает. Стерильной толстой иглой шприца набирают кровь. После взятия крови животному вводят подкожно такое же количество теплого физиологического раствора.

Количество крови, которое можно получить у взрослых здоровых

животных, составляет: у барана - 150-250; кроликов - 25-30; морских свинок - 10-12; крыс - 3-5 мл; при тотальном обескровливании у кроликов можно взять 130-150, морских свинок - 40-50, крыс - 6-8 мл.

У лабораторных животных может быть использована как цельная кровь, так и отдельные составные ее части.

Для получения дефибринированной крови ее отбирают в стерильную колбу со стеклянными бусами и встряхивают 10-20 мин, после чего кровь, освобожденную от фибрина, переносят в другую посуду.

Эритроциты получают как из цельной, так и из дефибринированной крови. Для этого кровь нужно отцентрифугировать при 2000-3000 об/мин 10-15 мин и затем отсосать надосадочную жидкость. Эритроциты, осевшие на дно, 3-4 раза отмывают физиологическим раствором, прозрачную надосадочную жидкость удаляют и в пробирке остаются отмываемые от сыворотки эритроциты.

Цитратную кровь получают добавлением к крови 5 % раствора лимоннокислого натрия (1 часть раствора на 10 частей крови).

Плазму крови получают после центрифугирования или отстаивания цитратной крови в холодильнике в течение суток. Получение сыворотки крови будет описано ниже.

МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ИММУННОГО СТАТУСА ОРГАНИЗМА

Все методы иммунодиагностики можно разделить на скрининговые и уточняющие. Первые существуют для фиксирования нарушений в иммунной системе, вторые - для установления механизмов, задействованных в их реализации с целью дальнейшей иммунокоррекции.

В направлении на иммунологическое исследование должны быть указаны возраст, пол пациента, так как эти параметры могут определять особенности иммунограммы в норме. Должна быть отражена используемая медикаментозная терапия в последние 6 месяцев, наличие химио- и радиотерапии в анамнезе, профессиональные вредности, пребывание в зоне, загрязненной радионуклидами. Необходимо указать проводились ли подобные исследования ранее и были ли выявлены отклонения в показателях иммунитета.

Подготовка крови для изучения параметров иммунитета

Получение сыворотки крови. Кровь берут в сухую чистую пробирку. После образования сгустка «обводят» сухой стеклянной палочкой и ставят в холодильник при +4°C. Через 18 часов сыворотки

аккуратно отсасывается и центрифугируется -1500 об/мин в течение 10 мин.и переносится в чистую пробирку. Или, после образования сгустка кровь «обводят» стеклянной палочкой, центрифугируют 10 минут при 1500 об/мин, полученную сыворотку отбирают в чистую пробирку, если невозможно исследование провести сразу, то сыворотку разливают в несколько микропробирок и хранят при -20°C.

Выделение мононуклеаров и нейтрофилов периферической крови

К гепаринизированной крови (20 МЕ/мл) добавляют 10% желатина (на 10 мл крови -1 мл желатина). Ставят на 30 минут в термостат при 37°C. Плазму отсасывают пипеткой и накладывают на градиент плотности Ficoll-Pack=1.077) центрифугируют в течение 30-40 минут при 1500 об/мин. Образовавшееся в интерфазе «кольцо» мононуклеаров снимают пипеткой, полученную клеточную взвесь трижды отмывают 0,9% раствором NaCl и доводят концентрацию до 2×10^6 клеток/мл.

Осадок, содержащий нейтрофилы с эритроцитами отмывают трижды 0,9% NaCl, центрифугируя 10 минут при 1500 об/мин и удаляя надосадок. Для лизиса эритроцитов добавляют 5 мл Н₂O на 40 сек. для восстановления изотоничности добавляют 5 мл 1,8% раствора NaCl, центрифугируя 10 минут при 1500 об/мин. Полученные нейтрофилы трижды отмывают 0,9% NaCl.

Выделение мононуклеаров периферической крови

Мононуклеары выделяют из гепаринизированной крови (20 МЕ/мл), которую разводят в 2 раза 0,9% раствором NaCl (р.47.2).

Выделение клеток проводят методом центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Pack C. Pharmacia Fine Chemicals, Швеция, плотность 1,077 г/см³). Для этого 8 мл разведенной крови накладывают на 3 мл градиента плотности и центрифугируют в течение 30 минут 1500 об/мин. Образовавшееся в интерфазе «кольцо» мононуклеаров снимают пипеткой, полученную клеточную взвесь трижды отмывают 0,9% раствором NaCl и доводят концентрацию до 2×10^6 клеток/мл. Жизнеспособность клеток определяют методом окрашивания 0,06% трипсиновым синим. Число окрашенных клеток не должно превышать 5-7%.

Выделение лимфоцитов

Принцип метода основан на разделении клеток, различающихся по плотности. При центрифугировании в градиенте клетки крови располагаются на тех уровнях, где плотность среды равна их собственной. Одним из распространенных градиентов плотности является смесь фиколл-урографт. Фиколл является соединением полисахаридной природы, урографт представляет собой рентгеноконтрастное вещество с высокой плотностью. Смешивая фиколл и урографт в определенном соотношении, получают раствор с плотностью 1,077 г/см³. Центрифугируя периферическую кровь после наделения ее на раствор фиколл-урографт, удается разделить клетки, имеющие плотность выше (лимфоциты и моноциты) и ниже (эритроциты и гранулоциты) 1,077 г/см³. Вместо урографта можно применять изопак, верографин и другие рентгеноконтрастные вещества.

T-клеточная система иммунитета

Скрининговые методы:

- определение общего числа лимфоцитов;
- определение процентного и абсолютного числа зрелых T-лимфоцитов - CD3 (+) и двух основных субпопуляций - хелперов CD4 (+) и киллеров/супрессоров CD8 (+);
- исследование ответа T-лимфоцитов на ФГА в реакции бластной трансформации (РБТЛ).

Уточняющие методы:

- определения «активационных маркеров» CD25 и HLA II на T-лимфоцитах;
- исследования продукции цитокинов - γ -интерферона, интерлейкина-2, -4, фактора некроза опухоли, интерлейкина-6 in vivo и in vitro;
- изучение пролиферативного ответа в РБТЛ на специфический антиген;
- исследование процессов апоптоза T-лимфоцитов методом определения CD95.

Определение субпопуляций лимфоцитов периферической крови в лимфоцитотоксическом тесте (ЛЦТТ)

Оборудование:

1. Микроплашкетты для иммунологических исследований - камеры Тарисаки (отечественные - «Пластполимер»).
2. Вазелиновое масло.

3. Цитотоксические антитела, направленные к поверхностным маркерам лимфоцитов.

4. Комплексный кроличий лимфолизированный для ЛЦТТ (НИИ гематологии СПб).

5. Эозин красный растворимый любой фирмы.

6. 20% формалин.

7. Микрошприц с диспенсером фирмы «Гампильтон» или любой отечественный аналог с шагом диспенсера 1 мкл.

Для выявления субпопуляций лимфоцитов периферической крови могут быть использованы моноклональные антитела (МКАТ) серии ИКО (НПЦ «Медбиоцентр», Москва):

- анти-CD3; анти-CD4; анти-CD8; анти-HLA-DR; анти-CD20; анти-CD25; анти-CD16. В качестве добавленной характеристики могут использоваться антитела других специфичностей той же фирмы (Например: CD95 - выявляющие клетки с начавшимся апоптозом - программируемой клеточной гибелью).

МКАТ - каждой специфичности раскапывают в камеры Тараски под слой вазелина в объеме 1 мкл на лунку в трех параллелях. Взвесь лимфоцитов добавляли в лунки в объеме 1 мкл и инкубировали 40 минут при 20°C, затем в каждую лунку вносили в 5 мкл кроличьего комплемента. Инкубацию проводим при 20°C - 60 мин. Для окрашивания клеток в каждую лунку вносили по 2 мкл 5% водного раствора эозина, через 2 минуты проводили фиксацию 5 мкл 17% раствора формалина. Результаты реакции оценивают с помощью светового микроскопа при 150-кратном увеличении. Количество специфически прореагировавших лимфоцитов (окрашенных) для каждой субпопуляции подсчитывали в 3-х параллелях не менее 100 клеток в каждой, определяют среднее значение, выражаемое в процентах к числу подсчитанных клеток. Абсолютное количество клеток в 1 мм³ подсчитывали, используя данные клинического анализа крови.

Данная методика уменьшая расход МКАТ в 20 раз, позволяет обходиться без люминесцентного микроскопа. Но во многих практических лабораториях, по-прежнему для оценки клеточного иммунитета применяется реакция непрямой иммуофлюоресценции с использованием тех же МКАТ.

Рабочее разведение, хранение и использование моноклональных антител для фенотипирования клеток крови

Моноклональные антитела (МКА) всех специфичностей (см. таблицу) и FITC-конъюгаты вторых антител (моноспецифические к иммуноглобулинам мыши) выпускаются в виде лиофилизированного в стеклянных флаконах препарата, приготовленного из стабилизированной асцитной жидкости мышей (МКА) или поликлональной антисыворотки (FITC-конъюгаты) с добавлением консерванта. Лيوфилизированные МКА могут храниться при +4°C не менее года.

Для использования в работе содержимое флакона доводится до объема 2.0 ± 0.05 мл добавлением дистиллированной воды (!). Лيوфилизированные препараты стабилизированы таким образом, что рабочее разведение МКАТ сохраняют активность в течение не менее четырех месяцев при хранении в холодильнике (+4°C), что при интенсивной работе исключает необходимость их партификации и замораживания. Прямомеченные МКАТ (для *прямой цитофлуориметрии*) выпускаются в виде готового рабочего раствора, хранить их следует при +4°C. Объем рабочего раствора для постановки реакции - 20 мкл. на один тест.

Методика постановки непрямой реакции поверхностной иммуофлуоресценции

400-500 тысяч клеток, выделенных в градиенте фикодел-верографин (выпускается НПЦ МедБиоСпектр), инкубировать в пробирке с 20 мкл рабочего раствора МКАТ в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего клетки отмыть один раз 1 мл буфера PBS или, для снижения фонового окрашивания клеток, буферным раствором для постановки реакции (выпускается НПЦ МедБиоСпектр), клетки осадить центрифугированием при 1000-1200 об/мин. Супернатант тщательно удалить, а клеточный осадок суспендировать в 20 мкл рабочего раствора (FITC-анти-мышь выпускается НПЦ МедБиоСпектр) и инкубировать в течение 30 мин при 4°C, после чего клетки дважды отмыть в 1,0 мл буферного раствора и суспендировать в 50 мкл. При вращении центрифужного ротора для микроплат, все реакции удобно проводить в круглодонном иммунологическом планшете. Клеточную суспензию поместить в лунку, вырезанную в полоске Parafilm'a, наклеенной на предметное стекло (на одном стекле можно вырезать 12-14 лунок для просмотра разных препаратов).

При отсутствии Parafilm,а на одно предметное стекло можно помещать в виде капли клетки из трех пробирок. Для более прочной сорбции клеток на стекле рекомендуется предварительно поместить в лунки по 20 мкл раствора поли-L-лизина (выпускается НПЦ МедБиоСпектр) и после 45 мин инкубации раствор удалить, а в лунку ввести суспензию клеток из пробирки. Клетки инкубировать на стекле 20 мин, после чего из лунок осторожно отсосать буферный раствор, и вместо него внести в лунки по 10 мкл 50% раствора глицерина.

При учете результатов реакции на отечественных люминесцентных микроскопах предметные стекла не следует покрывать покровными стеклышками, а осторожно поместить объектив в лунку на стекле, используя 50% раствор глицерина в качестве иммерсионной среды. Учитываются светящиеся клетки (свечение в форме кольца).

Рекомендуется использовать объектив микроскопа 90x и окуляр 7-10x.

Результаты реакции следует учитывать в течение 24 час после постановки, предохраняя препараты от воздействия прямого интенсивного света. Микроскопирование производить в тщательно затемненном помещении.

Иммунопероксидазное окрашивание клеток

При отсутствии люминесцентного микроскопа может быть использован вариант иммуноферментного окрашивания связанных с МКАТ клеток-мишеней. Для выполнения этой методики клетки выделить и инкубировать с МКАТ так же, как описано выше, заменив FITC-конъюгаты вторичных антител на иммуноферментный конъюгат (анти-мышь - пероксидаза - выпускается НПЦ МедБиоСпектр). После 30 мин инкубации с пероксидазным конъюгатом при 4°C клетки дважды отмыть 1 мл буферного раствора, и суспензировать осадок в 20 мкл раствора хромогенного субстрата (из расчета: 3 мг 3,3'-диаминобензилина растворить в 5.0 мл физраствора, добавить 15 мкл 3% р-ра перекиси водорода, профильтровать через бумагу. **ВНИМАНИЕ!** Раствор субстрата не хранится, поэтому должен готовиться перед использованием). После 10-15 мин инкубации с субстратом (при комнатной температуре под визуальным контролем развития окраски) клетки дважды отмыть 1 мл буферного раствора, суспензировать в 50 мкл и поместить в лунки на предметном стекле, как описано выше. Учитывать процент клеток с мембранным типом реакции (желто-бурое окрашивание) в световом микроскопе.

Таблица 6

Характеристики моноклональных антител

CD	КЛОН	Изотип антитела	MW (kDa)	Специфичность	Реактивность
CD1	KCO-44	IgG1	45	кортикальные тимоциты	80% тимоцитов и единичные В-клетки периферической крови
CD3	KCO-90	IgG2a	16,20,26	T-клетки	67±2,4% лимфоцитов периферической крови, 25% тимоцитов (исдулярные)
CD4	KCO-88	IgG1	60	T-хелперы	39±1,2% лимфоцитов периферической крови, 80% тимоцитов
CD5	KCO-89	IgG1	67	T-клетки	T-клетки всех этапов дифференцировки, В-клетки больных ХЛЛ, 65±2,3% лимфоцитов периферической крови
CD7	KCO-87	IgG1	40	T-клетки	67,3±2,6% лимфоцитов периферической крови
CD8	KCO-31	IgG1	32	T-супрессоры/цитотоксические	28,2±2% лимфоцитов периферической крови, 80% тимоцитов
CD10	KCO-134	IgG1	100	Лимфоциты	CALLA-облигатный антиген лимфоцитоза: лимфоциты 6-мил. ОДЛ, бластные клетки ХМЛ, Гранулоциты
CD11b	KCO-60a	IgG2a	95,165	С3b рецептор C3 компл. компонента	100% гранулоцитов, 71% моноцитов, 27% мононуклеаров, NK-клетки
CD11c	KCO-116	IgG1	95-65	NK-клетки, моноциты, гранулоциты	15% лимфоцитов периферической крови (K-клетки), все гранулоциты и макрофаги
CD18	KCO-168	IgG1	95	Лейкоциты	β-цепь LFA-1 (CD11a), Mac-1 (CD11b), p150,95 (CD11c)
CD20	BCA-40b	IgG1	35	B-лимфоциты	Зревшие B-лимфоциты (включая стадии про-B)
CD22	KCO-91	IgM		В-клетки	Все В-клетки (на протяжении всех стадий) антиген и интерактив, 7,3±1,3% лимфоцитов периферической крови
CD24	KCO-159	IgG1		В-клетки, гранулоциты	
CD26	KCO-147	IgG1		Активабельные T-В-клетки, макрофаги	20-30% лимфоцитов, макрофаги, активированные клетки

CD	КЛОИИ	Изоим антигена (kDa)	MW	Специфичность	Реактивность
CD34	ICD-115	IgG1	105-120	Клетки-предшественники	Предшественники гемопоэза костных клеток. Блестящие клетки больших ОМЛ, ХМЛ, Т- и В-клеточным ОЛЛ. Клетки эндотелия. В нормальном костном мозге до 1% клеток (стволовые)
CD37	IPD-24	IgG1	40-52	N-, В-клетки, миелоидные клетки	Зрелые Т- и В-клетки миелоидного ряда
CD38	ICD-20	IgG2a	45	Лейкоциты, их предшественники, активированные Т- и В-клетки	90% гранулоцитов, 10-15% моноцитов, плазматические клетки. Активированные моноциты <i>in vivo</i> и смешанной культуре Т- и В-клетки, опухолевые клетки больших размеров паранеопластического лейкоза, кроме ХМЛ
CD45	ICD-46	IgG2b	200	Лейкоциты (общий антиген)	Все клетки крови. Выявляются с лейкоцитами на кристаллы дрезин
CD45 ^{hi} /CD-146		IgG1	220	В, Т (40%), NK-клетки	Все В- и NK-клетки, 40% зрелых Т-клеток, 10% моноцитов
CD50	ICD-60	IgG2a	95, 155	Лейкоциты	Все клетки крови, кроме эритроцитов и тромбоцитов
CD71	ICD-926	IgG1	95	Рецептор трансферрина	Реагируют с лейкоцитами, не взаимодействуют с моноцитами клеток
CD73	ICD-153	IgG1		В-клетки	Реагируют с лейкоцитами, не взаимодействуют с моноцитами клеток
CD95	ICD-160	IgG2a		FAS-антиген, опосредующий апоптоз	Тимциты, FAS-ингибирующие клетки больших лейкозов
	ICD-311	IgM	25	Тпу-1, ранние тимциты	2-10% клеток тимуса, все тимичные Т-клетки
	ICD-97	IgG1		IgG	Реагируют с Fe-резервом иммуноглобулина G человека, нормальными В-клетками, лейкоцитами клеток
	ICD-38	IgG1		IgM	Реагируют с IgM и свободными р-антигенами в сыворотке; с р-антигенами В-клетками в норме и при лейкозе

CD	КЛИОН	Источники антигена (кДал)	MW	Специфичность	Реактивность
ICD-106	IgG1			λ -цепь Ig	Реагирует с легкой λ -цепью Ig на В-лимфоцитах
ICD-107	IgG1			κ -цепь Ig	Реагирует с легкой κ -цепью Ig на В-лимфоцитах
ICD-53	IgG2a	12, 45		HLA-ABC	Взаимодействует с большинством клеток крови и тромбоцитами, не реагирует с эритроцитами
ICD-1	IgG3	29, 34		HLA-DR	Все В-клетки всех этапов дифференцировки, моноциты, активированные Т-клетки. В периферической крови связывается с 28-74,2% мононуклеаров

Определение параметров цитокинового звена иммунитета

Продукцию цитокинов необходимо оценивать, так как многие из них являются продуктами иммунокомпетентных клеток и в то же время, иммунокомпетентные клетки служат мишенями действия цитокинов.

Провоспалительные цитокины продуцируются, секретируются и действуют через свои рецепторы на иммунокомпетентные клетки на ранней стадии воспалительного ответа, участвуют в запуске специфического иммунного ответа и в эффекторной его фазе. В эту группу включают: И-1, И-6, И-8, И-12, TNF- α , IFN α , IFN γ , MIF. Альтернативную группу провоспалительных цитокинов представляют: И-4, И-10, И-13, TGF β . В регуляции специфического иммунного ответа принимают участие: И-1, И-2, И-4, И-5, И-6, И-7, И-9, И-10, И-12, И-13, И-14, И-15, IFN γ , TGF β . Многие цитокины активно участвуют в регуляции миеломоноцитопоэза и лимфопоэза: G-CSF, M-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-5, И-6, И-7, И-9, TGF β .

Индукция синтеза цитокинов

Оборудование:

- боксовое помещение для стерильных работ;
- плоскодонные 96-луночные планшеты;
- протизонные пипетки со стерильными наконечниками (О-200 мкл);
- индукторы цитокинов - ФГА и протидиозан;
- CO₂-индуктор или термостат - 37°C, возможность поддержания для культивирования клеток 5% уровня CO₂.

Свежую гепаринизированную кровь (20 МЕ/мл) тщательно перемешивают. Добавляют к 0,6 мл крови 2,4 мл среды Игла (Хенкса, 199) с 2 мм глутамином и 80 мкг/мл гентамицина (т.е. кровь разводят в 5 раз). Готовят рабочие растворы индукторов синтеза цитокинов - ФГА и ЛПС-содержащего препарата протидиозана. Для этого к 1,8 мл среды Игла добавляют 200 мкл маточного раствора ФГА (1 мкг/мл). Таким образом получают раствор, в котором в 100 мкл содержится 10,0 мкг ФГА, что является оптимальной дозой для стимуляции продукции интерлейкина-2 (И-2), И-4, И-6. Для приготовления рабочего раствора протидиозана смешивают 2,4 мл среды Игла и 800 мкл 0,005 % раствора протидиозана, при этом в 100 мкл полученного раствора содержится 1,0 мкг протидиозана. Раствор используют для индукции синтеза И-1 и FNO-а, И-8, IFN-а.

В 96-луночный планшет для культивирования клеток в первые шесть лунок каждого ряда вносят по 100 мкл рабочего раствора ФГА, в следующие шесть лунок вносят по 100 мкл рабочего раствора протидиозана, в следующие шесть лунок каждого ряда вносят по 100 мкл среды Игла.

Подготовительные образцы периферической крови вновь тщательно перемешивают и вносят по 100 мкл во все лунки ряда.

Культивирование проводят в CO₂-инкубаторе в течение 24 часов, после чего осторожно отбирают супернатанты и исследуют на наличие цитокинов.

Определение цитокинов методом ИФА

Для определения цитокинов можно использовать наряду с зарубежными - отечественные тест-системы, разработанные ГосНИИ ОЧБ (СПб) и производимые фирмами «Протениновый контур», и «Цитокины».

Эти тест системы основаны на «сэндвич»-методе твердофазного ИФА с применением пероксидазы хрена в качестве индикаторного фермента. За 10-15 минут до окончания инкубации готовится раствор субстрат-хромогенной смеси. Затем ячейки планшеты трижды промывают вшесенем 300 мкл промывочного раствора вкаждую из них. Во все лунки добавляют 200 мкл раствора субстрат-хромогенной смеси. Инкубируют в течение 20 минут при комнатной температуре в темноте. Останавливают реакцию добавлением 50 мкл раствора 1N серной кислоты. Учет результатов, определяющих активность связанной пероксидазы, проводят с использованием автоматическо-

го фотометра, при длине волны 492 нм, устанавливая нулевое поглощение по лункам со стандартом без определяемого цитокина в растворе. Чувствительность метода при использовании отечественных тест-систем - 5-30 кг/мл.

Определение интерферона - α (IFN- α)

Первые МКАТ предварительно иммобилизованы на внутренних поверхностях ячеек разборных планшетов для микротитрования. В каждую из ячеек вносят вторые МКАТ (К независимому эпитопу молекулы IFN- α) конъюгированные с биотином, в количестве 50 мкл на лунку (разведение АГ - 1:10). В первые два вертикальных ряда ячеек микропланшеты вносят по 200 мкл стандартов: А-0 пг/мл IFN- α , В-5 пг/мл, С-10 пг/мл, D-25 пг/мл, Е-50 пг/мл, F-100 пг/мл, F-250 пг/мл, H-500 пг/мл.

В остальные ячейки вносят по 200 мкл образцов. Планшет инкубируют в течение 1,5 часов при 37°C в суховоздушном термостате при непрерывном встряхивании. После инкубации раствор из ячеек удаляют. Ячейки трижды промывают внесением 300 мкл промывочного раствора. Индикаторным механизмом является конъюгат пероксидазы хрена с авидином, имеющий очень высокое сродство к биотину, который конъюгирован со вторым МКАТ, используемыми в тесте. Вносят в каждую ячейку 200 мкл конъюгата, авидина с пероксидазой хрена в разведении 1:100, инкубируют 45 минут при +37°C в суховоздушном термостате при непрерывном встряхивании. Раствор конъюгата удаляется из ячеек, проводят этапы отмывки и окраски.

Определение FNO- α , II-1 β , II-4

Первые МКАТ предварительно иммобилизованы на внутренних поверхностях ячеек твердых планшетов для ИФА. В первые два вертикальных ряда ячеек планшеты вносят по 100 мкл стандартов - А-0 пг/мл исследуемого цитокина, В-50 пг/мл, С-250 пг/мл, D-500 пг/мл, Е-1000 пг/мл, F -2000 пг/мл цитокина. В остальные ячейки вносят по 100 мкл образцов. Образцы и стандарты вносят в рекомендуемых буферах. Планшет инкубируют в течение 1,5 часов при 18-20°C. После инкубации раствор из ячеек удаляется, трижды ячейки промываются промывочным раствором. Вторые МКАТ, меченные биотином, вносят по 100 мкл и инкубируют в течение 1,5 часов при непрерывном встряхивании при 18°C. Промываются ячейки трижды. Вносятся конъюгат стрептовиди-

на с пероксидазом хрена разбавленный 1:100 буфером и вносят по 100 мкл во все ячейки планшета и инкубируют при 18°C и непрерывном встряхивании в течение часа. После инкубации раствор из ячеек удаляется. После этого проводят этапы отмывки и окраски.

Определение И-8 также проводится с использованием первых антител, после этапов инкубации и отмывки вносятся вторые антитела после повторения этапов отмывки и прохождения 2-5 фазы иммунологической реакции вносят третьи антитела. Затем проводят этапы отмывки и окраски.

В настоящее время разрабатываются отечественные тест-системы твердофазной ИФА для определения И-2, И-6, других уже открытых и описанных цитокинов. За рубежом имеются коммерческие тест-системы к И-3, И-5, FNO-а, IFN- γ , - β , - α и другим медиаторам иммунитета.

Определение цитокинов с использованием биологических методов

Остатки:

- боксовое помещение для стерильных работ;
- плоскодонные 96-луночные планшеты для культивирования клеток;
- прецизионные пипетки со стерильными наконечниками (0-200 мкл);
- И-2 и И-6 зависящие перевиваемые клеточные линии;
- стандарты И-2 и И-6;
- среды для культивирования клеток;
- β -счетчик для подсчета интенсивности включения клетками ^3H -тимидина;
- CO_2 - инкубатор или термостат на 37°C и возможность поддержания для культивирования клеток 5% уровня CO_2 .

Определение содержания И-2 в супернатантах клеток

Содержание И-2 определяют с помощью стандартного теста поддержания пролиферации И-2 зависимой Т-клеточной перевиваемой линии CTLL-2 (Т-лимфоциты мыши). С этой целью клетки CTLL-2 отмывают дважды перед постановкой теста для исключения влияния остаточных доз И-2, поддерживающих рост культуры. Исследуемые образцы вносят в лунки 96-луночного планшета (Flow) для иммунологических исследований в разведениях 1:2, 1:4, 1:6. Образцы разводят в среде RPMI-1640 с 10 % сыворотки плода коровы,

2М глутамин. Положительный контроль - 2-кратные разведения стандартного препарата П-2 в той же среде, отрицательный - среда RPMI-1640 с 10 % сывороткой плазмы коровы. Клетки с TLL-2 культивируют с исследуемыми и контрольными образцами в течение 48 часов. За 18 часов до завершения культивирования в ячейки планшета вносят ³H тимидин в дозе 5 мКи/мл. После завершения культивирования клетки снимают с помощью харвестера (Flow) на нитроцеллюлозные фильтры. Уровень пролифераций клеток оценивают в исследуемых и контрольных образцах по интенсивности включения ³H-тимидина с помощью бета-счетчика (Rackbeta) и жидкостного сцинтиллятора. Уровень биологической активности П-2 в исследуемых образцах рассчитывают, сравнивая полученные значения с контрольными образцами и выражают в ед/мл.

Определение содержания П-6 в супернатантах клеток. Аналогично определению П-2, но в тесте поддержания пролиферации П-6 используется гибридома мыши В9.

В-клеточная система иммунитета

Скрининговые методы:

- определение процента и абсолютного количества В-лимфоцитов-CD20⁺, CD19⁺;
- определение уровней неспецифических иммуноглобулинов А, М, G, Е в сыворотке крови;
- определение в крови циркулирующих иммунных комплексов;
- исследование ответа в РБТЛ на В-клеточный митоген.

Уточняющие методы:

- определение специфических иммуноглобулинов А, М, G, Е в сыворотке крови;
- определение продукции П-6;
- определение секреторного IgA.

Определение уровней иммуноглобулинов в сыворотке крови человека методом твердофазного ИФА

Для исследования могут быть использованы тест-системы фирмы «Протективный контур» и «Полигност» совместно со «Стибиум плюс (СПб)». Тест-системы предназначены для количественного определения уровня иммуноглобулинов G, M, A, E человека в сыворотке крови, плазме и иных биологических жидкостях.

Необходимое оборудование

- Прецизионные микропипетки на 10, 5, 200 и 1000 мкл высокой точности;
- шейкер для микропланшет;
- фотометр для микропланшетов с длиной волны 450, 492 нм.

Определение уровня IgE в сыворотке крови

IgE был впервые изолирован в 60-х годах XX столетия из сывороток больных атопией и множественной миеломой. В 1968 г ВОЗ определила IgE как самостоятельный класс иммуноглобулинов. Согласно ВОЗ 1 МЕ/мл соответствует 2,4 нг. Обычно концентрация IgE выражается в МЕ/мл или кЕ/мл (кЕ-килоединица). Основные эффекторные свойства IgE: индукция и выделение биогенных аминов, индукция цитотоксической активности эозинофилов, моноцитов, макрофагов, регуляторное влияние на Т-лимфоциты с рецепторами для IgE. Гипериммуноглобулинемия-повышенное содержание IgE, характерно для атопии, гельминтозов, изолированного дефицита IgA, гипоплазии тимуса (синдромы Ди-Джорджи, Вискотт-Олдриджа), хронического грануломатоза детей, синдрома Жоба.

В набор для определения концентрации IgE входят первые и вторые антитела.

СП «РОШ-Москва» предлагает иммунодиагностикум IgE ИФА. Иммуноферментный набор предназначен для количественного определения общего иммуноглобулина E (IgE) в сыворотке и плазме крови человека.

Тест используется для диагностики, прогнозирования и контроля эффективности лечения аллергических заболеваний, паразитициемий, при оценке иммунного статуса. Повышение уровня общего IgE наблюдается при ряде иммунодефицитов, паразитарных инвазиях и грибковых инфекциях.

Состав набора: планшеты 96-луночные, покрытые моноклональными АТ к IgE человека, конъюгат анти-IgE моноклональных АТ с пероксидазой, калибровочные пробы, контрольный образец, концентрированный раствор для промывания планшетов, реактивы для ферментативной реакции.

Необходимое оборудование: фотометр для 96-луночных планшетов, длина волны 492 нм.

Диапазон измерений IgE - 25 - 1000 МЕ/мл.

Объем стандартизированной пробы - 15 мкл.

Общее время проведения анализа - 1,5 часа.

Набор рассчитан на 120 определений, 3 планшеты.

В настоящее время практические лаборатории по-прежнему применяют для определения концентрации иммуноглобулинов в сыворотке крови - реакцию иммунопреципитации по Mancini. Но этот метод менее достоверен, по сравнению с описанными выше и более длителен.

Определение компонентов системы комплемента C1q, C3, C4, C5a, C1-ингибитора в сыворотке крови

Все вышеперечисленные компоненты определяются методом твердофазного ИФА с использованием тест-систем «Цитокин» (СПб). В состав компонентов наборов входят:

1. Стандарты: C1q- 150 мкг/мл, C3-1000 мкг/мл; C4-340 мкг/мл; C5a-0,020 мкг/мл; C1 inh-240 мкг/мл.
2. Первые и вторые антитела ко всем перечисленным компонентам комплемента, конъюгаты.
3. Растворы для разведения антител стандарта и отмывки.
4. Компоненты субстрат-хромогенной смеси, 1N серная кислота.

Определение гемолитической активности комплемента CH₅₀

Используется метод иммунного гемолиза. Основан на комплемент-зависимом лизисе нагруженных эритроцитов барана. Для полного гемолиза по классическому пути необходимо наличие всех компонентов комплемента. В соответствии с международным стандартом за единицу активности комплемента принимается такое его количество, которое вызывает 50% гемолиз в стандартных условиях. Гемолитическая активность комплемента выражается в гемолитических единицах и обозначается CH₅₀.

Материалы:

- раствор Alsever: 21,0г; цитрат Na-8,0г; NaCl-4,0г; дистиллированная вода - до 1000 мл;
- барбиталовый буфер (исходный пятикратный раствор): NaCl-42,5г; барбитал-2,875г; барбитал-натрий-1,875г; CaCl₂·H₂O-0,616г; дистиллированная вода до 1000 мл;
- 10% раствор желатина;
- рабочий раствор: барбиталовый буфер - 200 мл, дистиллированная вода - 800 мл, раствор желатина должен быть 0,1%, pH должен быть 7,2, доводят pH-NaOH до 1,0 M;

• гемолитическая сыворотка кролика (против эритроцитов барана) (ИВС, Санкт-Петербург).

На всех этапах метода используется дистиллированная вода.

Оборудование: термостат, центрифуга, фотометр для микропланшетов.

Подготовка сыворотки для исследования: стандартный забор сыворотки. Хранение при (-40° - 70)°С. При 20°С сыворотку можно хранить не более 2-3-х суток. Через 5-7 суток остается 50% гемолитической активности.

Сенсибилизация эритроцитов барана (получение гемолитической системы).

1. Эритроциты барана отмывают 3 раза рабочим раствором.

2. 0,2 мл отмытых эритроцитов разводят 2,8 мл воды. Измеряют при ОП₅₄₁ и доводят концентрацию эритроцитов в растворе до величины, при которой их гемолиз давал бы при ОП₅₄₁ значение 0,7.

3. Взвесь эритроцитов после доведения их концентрации смешивают с равным объемом рабочего раствора, в котором растворены 4 единицы гемолитической сыворотки. 1 гемолитическая единица - это титр x 4. Для гемолитической сыворотки имеющей титр 1/1500 4 гемолитических единицы - это разведение гемолитической сыворотки в рабочем растворе в 375 раз.

Взвесь эритроцитов объединенную с гемолитической сывороткой инкубируют 30 минут при 37°С, каждые 10 минут смесь осторожно перемешивают. После инкубации эритроциты отмывают рабочим раствором 3 раза.

4. Доводят концентрацию эритроцитов в рабочем растворе до величины, при которой полный гемолиз (0,2 мл эритроцитов + 2,8 воды) дает при ОП₅₄₁ значение 1,0

Полученная суспензия является готовой гемолитической системой, которая используется даже в микрометоде для определения S_{100} .

Типовые комплексы.

1. Готовят ряд разведений (кратных 2) исследуемых сывороток, а также сыворотки донора - стандарт. Разведение делают рабочим раствором. Обычно используют разведение в диапазоне 1:40 - 1:320.

2. Разведения проб вносят в 96-луночный планшет по 100 мкл в лунку. В 3 лунки вносят только рабочий раствор (100 мкл/лунку) - отрицательный контроль спонтанного гемолиза. В 3 лунки вносят 150 мкл воды со следовым количеством сапонина (положительный контроль гемолиза).

3. Во все лунки (кроме лунок с положительным контролем) вносят по 50 мкл рабочего раствора.

4. Во все лунки вносят по 100 мкл суспензии сенсibilизированных эритроцитов барана.

5. Планшет встряхивают на шейкере 3-5 минут (37°C). Через 30 минут планшет вновь помещают на шейкер на 45 минут и затем инкубируют еще 30 минут в термостате.

6. Планшет центрифугируют при 1500 об/мин. 7-10 минут. После центрифугирования надосадочную жидкость из каждой 8 ячейки (50-100 мкл) переносят в новый планшет, который помещают на фотометр для определения оптической плотности при 415 нм (ОП₄₁₅).

Обработка результатов

1. Из ОП₄₁₅ каждой пробы вычитают значение при ОП₄₁₅ отрицательного контроля. При построении графической зависимости строят кривую гемолиза в координатах: абсцисса - разведение пробы, ордината - гемолиз при ОП₄₁₅.

2. ОП₄₁₅ для 50% гемолиза определяют из расчета ОП₄₁₅ (50%) = (100%)/2, где ОП₄₁₅ (100%) - значение при полном гемолизе (положительный контроль) после вычета значения спонтанного гемолиза (отрицательного контроля).

3. Для каждой пробы строят кривую гемолиза, используя логарифмическую бумагу и, данные разных разведений.

4. Находят на кривой точку соответствующую ОП₄₁₅ (50%) и определяют разведение.

5. Способ расчета СН₅₀ основан на сравнении гемолитической активности сывороток больных с гемолитической активностью сыворотки донора.

Для расчета необходимо выбрать одно разведение при котором ОП₄₁₅ донора (стандарт) находится в пределах 0,4-0,7. Показатель при данном разведении принимается за 100%. Для расчета процента гемолитической активности у больных при том же разведении: $K = \text{ОП}_{415} \text{ сыворотки больного} / \text{ОП}_{415} \text{ стандарта} \times 100$ условных гемолитических единиц. Колебания показателя К у здоровых людей находится в пределах от 70 до 140 условных гемолитических единиц.

Оценки системы нейтрофильных гранулоцитов

Процесс уничтожения внеклеточных возбудителей определяется целым рядом функциональных свойств нейтрофилов, таких как:

1) миграция в зону воспаления; 2) адгезия фагоцита к клеткам

эндотелия; 3) способность к фагоцитозу; 4) бактерицидность (опосредующая каллинг возбудителей), причем изменения каждого из них вызывает нарушение функциональной активности фагоцита. Кульминацией фагоцитарного процесса является переваривание микроорганизмов. Уже в момент прикрепления микроорганизма к мембране фагоцита начинается синтез и поступление в кровь цепной группы провоспалительных цитокинов - И-1 β , FNO- α , И-6. Эти цитокины на всех этапах потенцируют процессы уничтожения возбудителей нейтрофилами, усиливая процессы опсонизации микроорганизмов, миграции нейтрофилов в очаг воспаления, адгезии их эндотелию сосудов, стимуляция зонных форм нейтрофилов из костного мозга. И-1, FNO- α индуцируют также синтез еще одного провоспалительного цитокина И-8. Его основная функция - усиление хемотаксической активности нейтрофилов.

Для этого используются следующие основные реакции:

- определение функции миграции нейтрофилов;
- реакции фагоцитоза (процент фагоцитирующих клеток, микробное число, показатель завершенности фагоцитоза, количество активных фагоцитов, абсолютный фагоцитарный показатель);
- исследование адгезивной способности нейтрофилов;
- исследование бактерицидности нейтрофилов в НСТ- и ЛКТ-тестах.

Функциональная активность лимфоцитов

О функциональной активности Т- и В- лимфоцитов можно судить по ответу в реакции бластной трансформации лимфоцитов с митогенами. Постановка реакции со специфическим антигеном, возбудителем заболевания, позволяет судить об изменении ответа в ходе патологического процесса. Снижение ответа на митоген, специфический антиген может быть характеристикой Т- и В- клеточного иммунодефицита. Очень высокий неадекватный (при использовании малых доз митогенов), ответ на РБТЛ может говорить о чрезмерной активации клеток, встречается при аутоиммунных заболеваниях.

Постановка реакции бластной трансформации

Свежую гепаринизированную кровь в количестве 0,6 мл разводят средой Игла с добавлением 2 мМ глутамината и 80 мкг/мл в 5 раз и вносят по 100 мкл в 96-луночные планшеты для иммунодиагностических исследований вместе с митогенами. В качестве митогенов ис-

пользуют для индукции и пролиферации Т-лиф с ФГА «Serva», в концентрации 2,5 и 15 мкл/мл, для индукции пролиферации В-лимфоцитов-митоген лаконоса (PWM) в концентрации 5 мкл/мл. Планшеты с исследуемыми образцами культивируют в течение 72 часов при 37°C и 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе, за 16 часов до окончания инкубации вносят ³H-тимидин в дозе 5 мк Ки/мл. После завершения культивирования клетки снимают с помощью харвестра (Flow) на нитроцеллюлозные фильтры. Уровень бласттрансформации лимфоцитов исследуемых образцах оценивают по интенсивности включения ³H-тимидина с помощью счетчика (Rackbeta) и жидкостного сцинтиллятора и выражают в импульсах в минуту (имп/мин). Бласттрансформацию лимфоцитов в отсутствие митогена оценивают как спонтанную. Индексы стимуляции рассчитывают из соотношения показателей митоген-индуцированной и спонтанной бласттрансформации лимфоцитов.

Определение HLA-A, -B, -DR фенотипов обследуемых лиц проводится в настоящий момент с целью выявления генетической предрасположенности к ряду заболеваний, определение характера прогрессирования заболевания в связи с определением HLA фенотипом, отбора гетеросовместимых пар донор-реципиент при трансплантации органов и тканей.

Метод проточной цитометрии. Проточная цитометрия - метод позволяющий измерять физические, биохимические и функциональные характеристики клеток (объем, площадь поверхности клеток, интенсивность и поляризацию флуоресценции, рассеивание света в различных угловых интервалах и т.д.) при помощи электрических и оптических датчиков. Сигналы этих датчиков обрабатываются различными способами, а полученные данные отображаются в виде гистограмм распределения тех или иных характеристик клеток. Уникальность метода цитометрии в потоке состоит в том, что измерения выполняются на отдельных клетках с очень большой скоростью (до 3×10^5 /мин⁻¹), что позволяет проводить анализ клеточных популяций с высокой статистической точностью за короткое время и небольшими усилиями. Возможность анализа оптических параметров клеток позволяет осуществлять их сортировку в сплошных смесях по одному или более измеряемым параметрам.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Иммунологические методы используют, как для выявления титра антител в сыворотке крови (серодиагностика), так и для обнаружения антигенов в биологических жидкостях.

Общие закономерности иммунологических методов (ИМ):

1) исследование производится *in vitro*;

2) проявляются при иммунологическом соответствии (гомологичности) антигена и антитела;

3) протекают в 2 фазы (невидимая и видимая).

Для количественной характеристики иммунологических методов исследования используют такие понятия, как чувствительность и специфичность.

Чувствительность = $\frac{\text{число положительных реакций у истинных больных}}{\text{число обследованных больных с подтвержденным диагнозом}}$

Специфичность = $\frac{\text{число отрицательных реакций в контрольной группе}}{\text{число обследованных в контрольной группе}}$

В идеале чувствительность и специфичность иммунологических методов приближается к 100%.

Все иммуномикробиологические методы можно разделить на 3 группы:

1) ИМ, основанные на прямом взаимодействии антигена с антителом (феномены агглютинации, преципитации, геммагглютинации, иммобилизации и др.);

2) ИМ, основанные на опосредованном взаимодействии антигена с антителом (реакции непрямои геммагглютинации, коагглютинации, латекс-агглютинации, угольной аггломерации, бентонит-агглютинации, связывания комплемента и др.);

3) ИМ с использованием меченых антител или антигенов (метод флюоресцирующих антител, иммуоферментный и радиоиммунный анализы, спиниммунологический и другие методы).

Реакция агглютинации (РА)

Реакция основана на взаимодействии поверхностных антигенов бактерий и других корпускулярных частиц с антителами и протекает в две фазы:

1) специфическая фаза - связывание детерминантной группы (эпитопа) антигена с паратопом - активным центром иммуноглобулина (невидимая фаза);

2) неспецифическая (видимая) фаза - образующийся комплекс (АГ+АТ) утрачивает растворимость и выпадает в осадок в виде хлопьев. Однако это явление возможно лишь в электролитной среде, например в 0,85% растворе натрия хлорида.

РА можно применять для обнаружения специфических антител в сыворотке крови и, наоборот, при помощи стандартной агглютинирующей сыворотки можно идентифицировать выделенные микробы.

Развернутая РА для выявления антител в исследуемой сыворотке крови

Для постановки реакции необходимо иметь:

- 1) исследуемую сыворотку крови;
- 2) 0,85% раствор NaCl (физиологический раствор);
- 3) антигенный диагностикум, т.е. взвесь микроба определенной концентрации.

Вначале готовят разведение сыворотки больного. В отдельную пробирку добавляют 2,4 мл физиологического раствора и 0,1 мл сыворотки - получается разведение сыворотки 1:25, это основа для последующего приготовления ряда последовательных двукратных разведений. В штатив устанавливают 7 пробирок, 2 последние из них - контрольные. Во все пробирки, кроме последней (контроль сыворотки), наливают по 0,5 мл физиологического раствора. Затем из пробирки (основное разведение сыворотки 1:25) берут 0,5 мл и добавляют в первую пробирку - здесь получилось разведение 1:50. Из 1-й пробирки вновь берут 0,5 мл и переносят во 2-ю - здесь разведение сыворотки составляет уже 1:100. Таким же образом готовят ряд последовательных двукратных разведений сыворотки. Из 5-й пробирки 0,5 мл жидкости выливают в сосуд с дезинфицирующим раствором. В 6-й пробирке - только физиологический раствор (контроль антигена), в 7-ю добавляют 0,5 мл основного разведения сыворотки (1:25).

На следующем этапе работы во все пробирки, кроме 7-й (контроль сыворотки), вносят по 2-3 капли антигенного диагностикума, т.е. живой микробной взвеси, содержащей 3-4 млрд. микробных тел в 1 мл. Жидкость во всех пробирках мутнеет. Штатив с пробирками встряхивают и помещают на 2 ч в термостат. Через 2 ч учитывают предварительный результат реакции (агглютинация с Н-антигеном).

Окончательный результат учитывают через 16-18 ч при выхождении пробирок в условиях комнатной температуры (агглютинация с О-антигеном). При положительной реакции на дне пробирки образуется агглютинат - осадок в виде перевернутого зонтика, надосадочная жидкость остается прозрачной (рис. 6). При встряхивании пробирки наблюдаются так называемые "смерчи", которые быстро распадаются на крупные хлопья. Отрицательная реакция - содержимое пробирки равномерно мутное, отсутствует осадок. Жидкость такая же, как и в 6-й пробирке (контроль антигена). В 7-й пробирке (контроль сыворотки) жидкость прозрачна, но нет осадка (табл. 7).

Таблица 7

Постановка развернутой реакции агглютинации

Индикаторы	Основа пробирки					Контроль пробирки	
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	контроль антигена	контроль сыворотки
Исходный раствор натрия хлорида (0,85%), мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Исходная сыворотка в разведении 1:25, мл	0,5+	0,5+	0,5+	0,5+	0,57	-	0,3
Последнее разведение сыворотки	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800		
Дистиллированная вода, мл	3	3	3	3	3	3	-

Инкубация при 37°C в термостате 2 ч с последующим выдерживанием при комнатной температуре (16-22°C) до следующего дня.

Результат	+++	+++	-	-	-	-	-
-----------	-----	-----	---	---	---	---	---

Титр сыворотки 1:100

За титр сыворотки принимают последнее разведение сыворотки, в которой еще наблюдается четкая агглютинация. Интенсивность РА оценивают по 4-х крестовой системе. Положительной считается как минимум 3-х крестовая реакция.

Реактивы Кастеллани

Некоторые микробы помимо специфических видовых антигенов содержат также и групповые антигены. При иммунизации организм отвечает на них выработкой соответствующих видовых и группо-

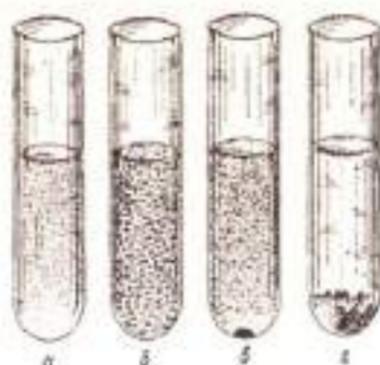


Рис. 6. Реакция агглютинации микроскопическая.

В 1-й (а) и 2-й (б) пробирках - зернистая агглютинация, в 3-й (в) - отрицательный результат, в 4-й (г) - положительный.

вых антител. Поэтому сыворотка, содержащая групповые агглютинины, агглютинирует родственные между собой микробные виды, имеющие общий групповой антиген.

Метод Кастаньяни основан на удалении из иммунной сыворотки антител, реагирующих с групповыми антигенами. Насыщение сыворотки культурой гомологичного (специфичного) микроба ведет к полному удалению как специфических, так и групповых антител. Однако насыщение сыворотки культурой гетерологичного (родственного) микроба ведет к удалению только групповых антител, и она будет агглютинировать только гомологичные микробы (табл. 8).

Таблица 8

Использование реакции Кастаньяни для серологической диагностики брюшного тифа и паратифов

Вид микробов, которые агглютинирует культура сыворотки больного	Агглютинация исследуемой сыворотки до адсорбции агглютинином	Агглютинация исследуемой сыворотки после адсорбции агглютинином		
		культура S. typhi	культура S. paratyphi A*	культура S. paratyphi B
S. paratyphi A (антигены 1,2,12)	+	+	-	+
S. paratyphi B (антигены 1,4,12)	+	+	-	-
S. typhi (антигены 5,9,12)	+	-	-	+

* Можно предположить, что заболевание вызвано S. paratyphi A.

Делают разведения сыворотки 1:100. Затем готовят антигены, т.е. взвесь суточных агаровых культур разных видов микробов, которые агглютинируются этой сывороткой. Взвеси центрифугируют при 3000 об/мин, к осадку добавляют по 2 мл исследуемой сыворотки в разведении 1:100. Опытным путем было установлено, что для истощения 1 мл иммунной сыворотки 1:100 надо брать осадок микробной взвеси, полученной из 5-6 пробирок со скошенным агаром. Содержимое пробирок перемешивают, помещают на 2 ч в термостат, а затем на 18 ч в холодильник (4°C). После этого взвесь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 20 мин. Надосадочную жидкость (истощенная сыворотка) испытывают в развернутой РА с теми видами микробов, которые агглютинировались ею до насыщения.

Ориентировочная РА для идентификации микроба

Реакция служит для предварительного определения вида микроба. На предметное стекло наносят каплю узкоспецифичной адсорбированной сыворотки (т.е. сыворотку, содержащую только специфические антитела). Сыворотку наносят в разведении 1:10 и рядом - каплю физиологического раствора (контроль). Исследуемую культуру микроба петлей вносят в обе капли и размешивают. Через 2-4 мин учитывают результат. При положительной реакции (соответствие исследуемой культуры диагностической сыворотке) наблюдается скучивание бактерий в виде хлопьев на фоне прозрачной жидкости. В контроле - равномерная муть. Реакцию ставят перед постановкой развернутой РА для идентификации микроба.

Реакция непрямой геммагглютинации (РНГА)

РНГА является своеобразной модификацией РА. Сущность реакции состоит в том, что молекулы антигена адсорбируются на поверхности эритроцитов. Такие "нагруженные" антигенами эритроциты приобретают способность агглютинироваться иммунной сывороткой, специфичной для данного антигена. Эритроциты склеиваются и выпадают в осадок, образуя на дне пробирки геммагглютинат. В последнее время РНГА получила широкое распространение благодаря высокой чувствительности, экспрессивности и простоте постановки.

В лунках полистироловых планшетов готовят ряд последовательных двукратных разведений сыворотки. В предпоследнюю лунку вносят - 0,5 мл заведомо положительной сыворотки и в последнюю

0,5 мл физиологического раствора (контроли). Затем во все лунки добавляют по 0,1 мл разведенного эритроцитарио диагностикума, встряхивают и помещают в термостат на 2 ч. В положительном случае эритроциты оседают на дне лунки в виде ровного слоя клеток со складчатым или зазубренным краем (перевернутый зонтик), в отрицательном - оседают в виде пуговки или колечка (табл. 9).

Таблица 9

Постановка реакции непрямой геммагглютинации

Индикаторы	Положительный результат					Контроль	
	1-я	2-я	3-я	4-я	5-я	1,6	1,6
Положительная реакция эритроцитарио диагностикума	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-	0,5
Индикаторы эритроцитарио диагностикума 1:21-мл	0,5+	0,5+	0,5+	0,5+	0,5+	жидкий осадок эритроцитарио диагностикума 0,5	-
Положительная реакция эритроцитарио диагностикума	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800		
Эритроцитарио диагностикума	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Инкубация при 37°C в течение 2 ч в термостате.

Результаты	+++	+++	-	-	-	+++	-
------------	-----	-----	---	---	---	-----	---

Титр сыворотки 1:100

На эритроцитах можно адсорбировать не только антигены, но и антитела. В данном случае РНГА можно применять для индикации патогенных микробов во внешней среде. Для этого IgG сыворотки фиксируют на поверхности бараньих эритроцитов. Разрешающая способность экспресс-индикации антигенов составляет несколько тысяч микробных тел в 1 мл.

Реакция латекс-агглютинации (РЛА)

Помимо эритроцитов, в качестве носителей антигенов или антител можно использовать частицы полистирольного латекса, которые служат носителями антигена и при образовании иммунных агрегатов играют роль "мостиков" между молекулами антител. Латексные частицы являются как бы искусственными эритроцитами, но более устойчивы к внешним воздействиям. Каплю суспензии такого латекса прибавляют к капле исследуемой сыворотки, тщательно перемешивают. При положительной реакции образуются мелкие, но хорошо видимые невооруженным глазом агглютинаты.

Реакция коаглютинации (РКА)

Белок А некоторых штаммов золотистого стафилококка способен неспецифически адсорбировать на своей поверхности Fc-фрагменты иммуноглобулина G (за исключением IgG₁). Получившаяся молекула способна агглютинировать гомологичные антигены.

Помимо частиц латекса, белка А в реакциях "антиген - антитело" могут быть использованы и другие инертные носители (бентонит, каолин, активированный уголь и др.).

Реакция преципитации

В реакции участвуют мелкодисперсные антигены (преципитиногена), которые связываются с соответствующими антителами (преципитинами). Чаще всего эту реакцию применяют для выявления антигенов по известной иммунной преципитирующей сыворотке, содержащей антитела-преципитины. Это - качественный метод исследования. Наиболее популярна в медицинской и ветеринарной практике реакция Асcoli для обнаружения антигена возбудителя сибирской язвы.

В узкую преципитационную пробирку добавляют стандартную иммунную сыворотку и на нее осторожно накладывают жидкость, содержащую определяемый антиген. Появление на границе двух жидкостей кольца (преципитина) свидетельствует о наличии антигена возбудителя сибирской язвы в исследуемой жидкости. Преципитат возникает вследствие укрупнения коллоидных частиц антигена. Иногда эту реакцию называют кольцеобразной. Важным условием образования нерастворимого комплекса антиген - антитело является полная прозрачность жидкостей, а также эквивалентное соотношение ингредиентов, т.к. образующийся комплекс растворяется в избытке антигена или антитела.

Реакция преципитации в агаре (по Оухтерлони)

Метод диффузной преципитации позволяет детально изучать состав сложных водорастворимых антигенных комплексов. Средой для растворения является слой застывшего агара, в котором пробиваются луночки. В одну луночку помещают жидкость, содержащую исследуемый антиген, в другую - стандартную иммунную сыворотку. Компоненты, входящие в состав антигена, диффундируют навстречу соответствующему антителу с различной скоростью. Комплекс антиген - антитело расположен в различных участках геля, где образуются линии преципитации. Каждая из линий соответствует только одному комплексу антиген - антитело.

Радиальная иммунодиффузия по Манчини

При соотношении антигена и антитела, близком к оптимальному, образуется кольцо преципитации. Чем выше концентрация внесенного в лунку антигена, тем больше диаметр кольца. Чем выше концентрация антитела, тем на большее расстояние он продиффундирует до того как сформируется кольцо и тем шире будет диаметр этого кольца.

Если в реакции использовать 3 стандарта с известной концентрацией антигена, то можно получить калибровочную кривую. Такой подход можно использовать для определения концентраций иммуноглобулинов, компонента комплемента С₃ и т.д.

Реакция иммуноэлектрофореза

В основе реакции лежит реакция преципитации. Реакция наиболее популярна в последние годы при исследовании антигенной структуры микроорганизмов. Антигенный комплекс помещают в лунку, которая находится в центре геля, залитого на стеклянную пластинку. Затем через гель пропускают электрический ток - происходит электрофорез белков, различные антигены перемещаются на неодинаковые расстояния соответственно своей электрофоретической подвижности. После окончания электрофореза в капилляр, расположенную по краю пластинки (параллельно направлению движения белков), вносят специфическую иммунную сыворотку. Затем пластинку помещают во влажную камеру. В местах образования комплекса антиген - антитело появляются дугообразные линии преципитации.

Реакция иммунного лизиса

Антитела-лизисы способны растворять микробы или другие клеточные элементы. Однако свое действие лизисы могут проявлять только в присутствии комплемента. Для постановки реакции готовят ряд разведений инактивированной нагреванием сыворотки, затем добавляют живую микробную взвесь и комплемент. После инкубации в термостате реакцию оценивают с помощью повторных количественных высевов. В качестве контроля используют исследуемую культуру микробов, нормальную сыворотку и комплемент.

Феномен Исвева - Пфейффера. Реакцию иммунного лизиса ставят *in vivo* и употребляют обычно для лабораторной диагностики холеры. Смесь культуры микроба со специфической иммунной сы-

вороткой вводят интрабрюшинно морским свинкам. При соответствии выделенной культуры и иммунных антител происходит растворение микроорганизмов. Это можно установить микроскопией мазков, взятых из экссудата, или при посеве на агар (отсутствие роста).

Реакция связывания комплемента (РСК)

РСК широко используют для лабораторной диагностики венерических болезней, риккетсиозов, вирусных инфекций. Реакция протекает в две фазы. Первая фаза - взаимодействие антигена и антител при обязательном участии комплемента, вторая - выявление результатов реакции при помощи индикаторной гемолитической системы (эритроциты барана и гемолитическая сыворотка). Разрушение эритроцитов гемолитической сывороткой происходит только в случае присоединения к гемолитической системе комплемента. Если же комплемент адсорбировался ранее на комплексе антиген - антитело, то гемолиз эритроцитов не наступает.

При наличии в исследуемой сыворотке антител, комплементарных антигену, образующийся комплекс антиген - антитело связывает (адсорбирует) на себе комплемент. При добавлении гемолитической системы гемолиза не происходит, т.к. весь комплемент израсходован на специфическую связь комплекса антиген - антитело, а эритроциты остались неизменными.

При отсутствии в сыворотке антител, комплементарных антигену, специфический комплекс антиген - антитело не образуется и комплемент остается несвязанным. Поэтому при добавлении гемолитической системы комплемент присоединяется к ней. Результатом реакции в данном случае будет гемолиз эритроцитов - в пробирках образуется так называемая "лаковая" кровь.

Ввиду сложности реакции все компоненты, участвующие в ней, должны быть оттитрованы и взяты в реакцию в равных объемах.

Метод флуоресцирующих антител (МФА)

Данный метод является экспрессным и высокочувствительным. Существуют две его разновидности.

При прямом методе к исследуемой взвеси микробов, фиксированной на стекле, добавляют сыворотку, меченную флуорохромом (для этой цели используют обычно изотиоцианат флуоресцина - ФИТЦ). Образующийся комплекс антиген - антитело при освещении ультра-

фиолетовыми (сине-фиолетовыми) лучами дает ярко-зеленое свечение.

При непрямом методе МФА используют обычные диагностические сыворотки против какого-либо вида микробов. Добавление этой сыворотки к испытуемой взвеси микробов вызывает образование комплекса антиген - антитело. Этот комплекс выявляется с помощью универсальной флуоресцирующей сыворотки, содержащей антитела γ -глобулиновой фракции крови того вида животного, от которого была получена диагностическая сыворотка.

Для образования комплекса антиген - антитело препарат помещают во влажную камеру при 37°C, затем тщательно промывают дистиллированной или водопроводной водой от несвязавшихся антител. Светящийся комплекс выявляют при люминесцентной микроскопии.

Люминесцентная микроскопия позволяет не только удостовериться наличие микроорганизма и оценить его морфологию, но и выяснить, в каких клеточных структурах микроорганизм локализован, что чрезвычайно важно для клинической диагностики.

Непрямой МФА можно использовать и для выявления антител в сыворотке крови. Для этого на стекло наносят взвесь эталонного микроорганизма, после фиксации его на стекле и промывания наносят капли сыворотки крови в определенных разведениях. После промывки наносят люминесцирующую сыворотку против глобулиновой фракции сывороточных белков крови человека.

В последние годы в качестве флуоресцентной метки используют положительно заряженные ионы редкоземельных металлов - лантанидов (европий, самарий, тербий и др.), которые обладают гораздо более длительной флуоресценцией и большим стоксовским сдвигом. Все это позволяет снизить количество ложноположительных результатов.

Имуноферментный анализ (ИФА)

В настоящее время ИФА является наиболее широко распространенным иммунологическим методом. Принцип ИФА аналогичен прямому варианту МФА, но имеет ряд отличий:

- 1) антитела или антигены фиксируются не на стеклах, а на внутренней поверхности синтетических планшетов для иммунологических реакций;
- 2) в качестве метки используется не флюорохром, а фермент (пероксидаза, щелочная фосфатаза, уреаза и др.);
- 3) реакция учитывается не под микроскопом, а визуально, после

добавления в лунку субстрата для данного фермента.

Для объективной оценки результатов ИФА используют специальные фотометры с вертикальным ходом лучей.

Радиоиммунный анализ (РИА)

Принцип анализа аналогичен ИФА, но в качестве метки используют не фермент, а радиоактивный изотоп.

Для определения антигенов и антител разработаны многочисленные варианты иммунологического анализа, которые предусматривают использование меченых различным образом реактивов.

Радиоактивное мечение изотопом ^{125}I , а в последнее время все чаще ^{125}I - многократно проверенный и надежный метод. Но реактивы нестабильны в результате радиоактивного распада и опасны для здоровья.

Иммунорадиометрическое определение антигена отличается от радиоиммунологического тем, что используются изотопы меченого реагента. Для определения антигена твердую поверхность, например пластиковую, нагружают антителами и добавляют исследуемый раствор. После отмывания количество антигена, связавшегося с пластиком, можно определить, добавляя избыток радиоактивно меченых антител. Специфичность метода повышается при использовании "твердофазных" и меченых антител, направленных к разным участкам антигена.

Антигены в сложной смеси могут быть идентифицированы методом иммуноблоттинга.

Белки после разделения сложной их смеси методом электрофореза в полиакриламидном или агарозном геле можно перенести из геля на микропористую нитроцеллюлозную мембрану. Далее неспецифически связанные с мембраной антигены могут быть идентифицированы с помощью меченых антител. Если белки антисыворотки разделить изоэлектрофокусированием, а затем перенести (блоттинг) на мембрану, то с помощью меченого антигена можно установить и так называемый спектротип антисыворотки, т.е. определить изотип антител, взаимодействующих с данным антигеном.

Методические подходы к диагностике аллергических заболеваний

Обращают на себя внимание тяжесть и длительность проявлений аллергических заболеваний, приводящих к длительной нетрудоспо-

способности наиболее молодых слоев общества. Поэтому ранняя специфическая диагностика аллергопатологии является актуальной.

Основным принципом выявления истинных аллергических реакций (заболеваний) является обнаружение специфических антител или факта их присутствия. Все методы специфической диагностики базируются на знании свойств аллергических антител:

1) способности реагировать фиксироваться в коже и слизистых, что позволило с диагностической целью использовать кожные тесты - прямые (прик-тест, скарификационные, внутрикожный), непрямые (тест Праустнича - Кюстнера) и провокационные (ингаляционный, конъюнктивальный, назальный);

2) способности IgE фиксироваться в клетках-мишенях с последующими, видимыми под микроскопом морфологическими изменениями их и, соответственно, использованием клеточных прямых и непрямых тестов - тест дегрануляции тучных клеток, базофилов;

3) способности аллергических антител к преципитации и, соответственно, использование тестов преципитации в сыворотке или агаре (при сывороточной болезни). Высвобождение под действием комплекса антиген - антитело медиаторов аллергии повлекло за собой внедрение многочисленных тестов определения биологически активных веществ (гистамина, серотонина, ацетилхолина, простагландинов, интерлейкинов и др.).

Следует отметить, что эти методы очень сложные, требующие дорогостоящего оборудования и реактивов.

Для специализированной диагностики аллергических реакций используются методы, позволяющие непосредственно обнаружить аллергические антитела в сыворотке и секретах (слюне, бронхиальных смывах, назальном секрете и т.д.

При аллергическом обследовании условно можно выделить тесты 1-го, 2-го, 3-го уровней.

Тесты 1-го уровня позволяют выявить выраженные нарушения в аллергическом статусе, являются информативными, специфическими, с достаточной степенью вероятности позволяют диагностировать истинные заболевания, даже протекающие латентно.

1. Аллергический анамнез.
2. Фармакологический анамнез.
3. Пищевой анамнез.
4. Тесты с атопическими аллергенами.
5. Уровень общего IgE в сыворотке.

6. Лабораторные методы - клинический анализ крови (эозинофилия), цитологическое исследование секретов (мазки из носа, конъюнктивы и т.д.) на эозинофилию.

Тесты 1-го уровня должны выполняться в любом аллергологическом кабинете в поликлинических условиях.

Тесты 2-го уровня позволяют диагностировать заболевания не-реактивного типа, атопические заболевания, наличие которых предполагается при сборе аллергического анамнеза, но не удается выявить в тестах 1-го уровня. Сюда входят тесты для более углубленного обследования, позволяющие уточнить природу заболевания и назначить патогенетическую терапию.

1. Внутрикожные тесты с аллергенами.

2. Провокационные тесты (ингаляционный, оральные, назальные, конъюнктивальные и др.).

3. Уровень специфических IgE.

4. Базофильный тест Шелли.

5. Тесты преципитации, позволяющие выявить наличие преципитирующих антител.

6. Иммуный статус.

7. Клеточные тесты.

Тесты 2-го уровня выполняются как в амбулатории, так и в стационаре.

Тесты 3-го уровня можно выполнять только в крупных аллергологических центрах. Они позволяют выявить истинные механизмы аллергических заболеваний и часто представляют собой больше научный интерес, чем практический.

1. Определение специфических IgG в сыворотке (субклассов IgG).

2. Специфическое высвобождение гистамина из базофилов.

3. Изучение состояния системы интерлейкинов.

4. Определение уровня простагландинов.

5. Изучение чувствительности рецепторного аппарата к специфическим антигенам и неспецифическим медиаторам.

6. Определение уровня медиаторов аллергии, ферментов и других биологически активных веществ, участвующих в аллергических реакциях.

Несомненно, что тесты 2-го и 3-го уровней будут пополняться новыми методами, разработанными по мере совершенствования наших знаний.

АЛЛЕРГИЧЕСКИЕ ПРОБЫ

Аллергия - особое иммунологическое состояние организма, которое отличается повышенной чувствительностью к антигенам и сопровождается иммунной травмой клеток тканей и органов. Аллергические состояния специфичны, нередко они сохраняются всю жизнь, поскольку поддерживаются механизмами иммунологической памяти и периодическими контактами с антигеном.

В зависимости от того, какие факторы иммунной системы участвуют в формировании повышенной чувствительности, различают следующие типы аллергии: В-зависимая, Т-зависимая и смешанная.

В-зависимая аллергия связана с накоплением в организме аллергических антител, формируется не ранее чем через 9-10 дней после контакта с антигеном, местная реакция на аллерген появляется через 15-30 мин. В связи с быстрым развитием реакций В-зависимые аллергии часто называют гиперчувствительностью немедленного типа. К патологии этого типа относятся пылевая аллергия (поллинозы), пищевая аллергия, бронхиальная астма, отек Квинке, анафилактические аллергии и др.

Т-зависимая аллергия обусловлена наличием Т-лимфоцитов. Минимальный срок для формирования сенсибилизации при этом 3-4 дня, однако местная реакция на аллерген развивается не сразу, а через 24-48 ч (гиперчувствительность замедленного типа). К этому типу повышенной чувствительности относятся инфекционная и химическая аллергии, аутоаллергия.

Смешанная аллергия, с преобладанием гуморального или клеточного компонента, обычно является результатом хронических или рецидивирующих аллергических процессов.

С помощью проб можно расшифровать этиологию аллергии, что имеет важное значение для лечения многих инфекционных и неинфекционных заболеваний, позволяет предупредить опасные аллергические осложнения от применения лекарств и сывороточных препаратов. Покраснение в месте введения аллергена в кожу свидетельствует о состоянии повышенной иммунологической чувствительности (сенсибилизации) организма. Диагностические аллергены условно делят на инфекционные и неинфекционные. Инфекционные аллергены, как правило, представляют собой очищенные фильтраты или экстракты из микроорганизмов. Реже используются нативные аллергены, содержащие убитые тела микробов и продукты метаболизма. Неинфекционные аллергены представлены в виде экстрактов

пыльцы различных растений, экстрактов из домашней, гостиничной и библиотечной пыли, экстрактов из перхоти, шерсти, волос различных животных, пищевых аллергенов.

Кожные пробы с инфекционными аллергенами

Состояние повышенной чувствительности может развиваться к патогенным, условно патогенным и непатогенным микроорганизмам. Сенсибилизация организма к патогенным микроорганизмам формируется после перенесенных инфекционных заболеваний. Особенно хорошо выражена аллергическая перестройка после таких инфекций, как бруцеллез, туберкулез, туляремия, сип, менингококк, сибирская язва, орнитоз, актиномикоз, дерматомикозы. В связи с этим для диагностики таких заболеваний применяют постановку кожных аллергических проб (КАП) с аллергенами, носителями соответственно названия — бруцеллины, тулярин, мадлени, уайтморин, антраксин и др. После иммунизации некоторыми живыми вакцинами, помимо иммунитета, приобретает также и состояние аллергии к возбудителям туберкулеза, туляремии, бруцеллеза, оспы, кори и др.

Аллергия к условно патогенным и непатогенным микробам является важным, а иногда ведущим звеном в патогенезе разнообразных хронических заболеваний дыхательных путей, носоглотки, желудочно-кишечного тракта, почек, печени, кожи, суставов. Для установления вида этих аллергизирующих микроорганизмов также применяют постановку кожных проб с аллергенами гемолитического стрептококка, стафилококков, пневмококка, пейсерии катаралис, кишечной палочки, протеев мирабилис и моргани, синегнойной палочки и др. Положительный результат аллергодиагностики помогает начать этиотропное лечение, направленное на ликвидацию инфекционного очага.

Инфекционные диагностические аллергены вводят чаще всего внутрикожно, реже накожно путем втирания в царапины (скарификация). При внутрикожном способе в среднюю треть ладонной поверхности предплечья специальной иглой вводят обычно 0,1 мл аллергена. Через 24-48 ч учитывают наличие и размеры эритемы, инфильтрата и болезненность в месте инъекции. Обычно положительной считают реакцию с диаметром папулы не менее 5 мм.

В плановом порядке ставят пробы с туберкулином для выявления контингентов, подлежащих иммунизации вакциной БЦЖ, ибо между противотуберкулезным иммунитетом и аллергией имеется определенный параллелизм. Поэтому отрицательная аллергическая проба на туберкулин свидетельствует об отсутствии иммунитета. Для

массовой туберкулинодиагностики применяют внутрикожную пробу Манту с аллергенами ПИД (сухой очищенный туберкулин) или ПИД-Л (очищенный туберкулин в стандартном разведении). Туберкулиновую реакцию лучше учитывать через 72 ч, когда стихают явления неспецифического воспаления, а папула достигает максимальной величины. Размер папулы определяют прозрачной миллиметровой линейкой по диаметру. Если размер инфильтрата до 1 мм - реакция Манту отрицательная; 2-4 мм - сомнительная; 5 мм и более - положительная; более 20 мм - гиперергическая. Лица с отрицательной пробой Манту подлежат обязательной вакцинации БЦЖ, с гиперергической реакцией - нуждаются в наблюдении фтизиатра.

Кожные пробы с неспецифическими аллергенами

В естественных условиях к большинству неинфекционных аллергенов формируется гиперчувствительность немедленного типа, т.е. Вещицистная аллергия. Повышенная чувствительность организма к пыльцевым, бытовым, пищевым и медикаментозным аллергенам связана с образованием в организме аллергических антител различных классов.

Кожные пробы с неспецифическими аллергенами применяют для выявления повышенной иммунологической чувствительности организма к пыльце растений (амброзия, полынь, тимopheевки и др.), к бытовой пыли (аллергены из микроклеточной дерматофагов, из сухих дыфний и др.), к эпителиальным (аллергены из перхоти человека, собак, кошек, лошадей, из перьев птиц, из меха животных), к некоторым компонентам пищи (аллергены из рыб, мяса, молока, яиц, помидоров), к аллергенам насекомых (пчел, комаров, москитов, клопов, пауков).

Неспецифические аллергены с диагностической целью вводят внутрикожно путем скарификации, внутрикожно и аппликационно - на неповрежденную кожу. Врачам частей и кораблей чаще всего приходится ставить КАП для выявления сенсибилизации к противостолбнячной лошадиной сыворотке и некоторым антибиотикам (пенициллинового ряда, стрептомицину и др.). При этом препараты вводят внутрикожно в объеме 0,1 мл (сыворотка должна быть разведена 1:100) и наблюдают в течение 20 мин за реакцией кожи в месте введения.

Характерными для аллергической реакции кожи являются волдырь и эритема. При наличии только эритемы диаметром до 14 мм - реакция сомнительная (+), эритемы до 20 мм и небольшого отека - положительная (++) , гиперемии и выраженного отека - положительная (++++) и резкоположительная (++++). Положительная кожная реакция обычно сопровождается зудом.

ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКИЕ ИММУНОПРЕПАРАТЫ

Эффективная профилактика многих инфекционных заболеваний в значительной степени обусловлена использованием вакцин, иммунных сывороток и иммуноглобулинов. В ряде случаев эти препараты используются и для лечения инфекционных заболеваний.

Вакцины

Идеальная вакцина должна удовлетворять следующим требованиям: вызывать пожизненный иммунитет у 100% принятых при однократном введении; быть безопасной; не нуждаться в холодильной цепи (хранение и транспортировка при низких температурах); вводиться пероральным путем.

Современные вакцины можно разделить на несколько групп: 1) живые; 2) инактивированные кортискулярные; 3) инактивированные субъединичные (химические); 4) геинонкогенные; 5) апатоксины.

Живые вакцины получают, используя attenuированные (ослабленные) штаммы бактерий и вирусов. Основным свойством вакцинных штаммов, принципиально отличающим их от патогенных, является стойкая утрата ими способности вызывать в организме человека типичное инфекционное заболевание. Живые вакцины имеют ряд преимуществ перед инактивированными. Они, прежде всего, формируют напряженный иммунный ответ, т.е. при введении в организм человека размножаются, вызывая развитие вакцинальной реакции, сходной с естественным инфекционным процессом.

В качестве недостатков живых вакцин следует отметить возможность реверсии, т.е. восстановления вирулентности вакцинного штамма, и опасность контаминации другими организмами, переносчиками в культурах клеток, куриных эмбрионах, лабораторных животных.

Вакцинные, attenuированные штаммы получают различными методами. В некоторых случаях в качестве вакцинных штаммов используют культуры, полученные путем отбора из числа выделяемых от больных людей и животных микроорганизмов, так называемых спонтанных мутантов, обладающих присущими вакцинным штаммам свойствами (штамм "EV" - чумная; штамм "VA 19" - бруцеллезная; штамм "Мадрид E" - сыпнотифозная). В других случаях для получения вакцинных штаммов воздействуют на патогенные культуры различными физическими, химическими и биологическими факторами с последующим отбором непатогенных вариантов, сохранивших

иммунные свойства. Некоторые живые вакцины, например, оспенная, состоят из вирусов, генетически близко родственных возбудителю и имеющих с ним общие антигены. Эти непатогенные для человека микроорганизмы индуцируют в организме эффективный перекрестный иммунитет и к родственному патогенному возбудителю.

Инактивированные корпускулярные вакцины получают путем инактивации микроорганизмов физическими или химическими факторами (прогревание при 56-60°C, воздействие ультрафиолетовыми лучами, обработка формалином, спиртом, мертиолятом и др. веществами).

Эффективность убитых бактериальных и вирусных вакцин в целом ниже, чем живых, однако они менее реактогенны.

Инактивированные субъединичные (химические) вакцины представляют собой наиболее активные антигены, извлекаемые из микробных клеток с помощью кислот, спиртов, ферментов или разрушением вирусов с помощью физических и химических факторов. Субъединичные вакцины, освобожденные от балластных веществ, менее реактогенны по сравнению с корпускулярными вакцинами. При введении больших доз антигенов повышается иммунологический эффект, появляется возможность использовать ассоциированные препараты, действующие одновременно против нескольких инфекций.

Генноинженерные (рекомбинантные) вакцины получают, внедряя гены протективных антигенов в дрожжевые клетки. Эти гены интегрируются с геном дрожжевой клетки, и в результате их экспрессии дрожжевые клетки активно продуцируют протективные антигены бактерий.

В последние годы выпускают инкапсулированные вакцины. С целью микроинкапсуляции используют биodeградирующие в организме полимеры. Для вакцин наиболее приемлемым является полилактид - полигликолад (ПЛ-ПГ), деградирующий в организме до молочной и гликолевой кислот, т.е. до нормальных метаболитов. Важным свойством полимера является способность освобождать антиген с заданной скоростью импульсивно или постоянно. Особое преимущество состоит в его адьювантном эффекте и возможности введения вакцины через рот и дыхательные пути. Комбинируя частицы разных размеров в одной смеси, можно приготовить препарат, который после разовой инъекции импульсивно высвобождает антиген на 10, 130 и 210-й день после инъекции.

В последние годы заметилась тенденция к применению комбинированных вакцин, содержащих до 6 антигенных компонентов. В качестве примера можно привести вакцины, содержащие дифтерийный

анатоксин, коклюшный компонент, столбнячный анатоксин и трех типов вирусы полиомиелиита. Одна из таких вакцин "Тетракокк 0,5" производства фирмы "Пастер-Мерье" разрешена для применения в РФ.

Анатоксины. В основе патогенеза многих заболеваний (столбняк, дифтерия, ботулизм, газовая гангрена) лежит действие на организм экзотоксинов. Поэтому иммунитет при этих заболеваниях носит преимущественно антитоксический характер и обусловлен наличием в крови антитоксинов. Впервые антитоксические вакцины получил французский ученый Рамон (1916), применяя для ослабления ядовитых свойств дифтерийного и столбнячного экзотоксинов сочетанное действие формалина (0,3-0,4%) и умеренного тепла (37°C) в течение месяца. Обезвреженный, но иммуногенный препарат из токсина он назвал анатоксином (измененный токсин).

В настоящее время для практических целей выпускают дифтерийный, столбнячный, стафилококковый, ботулинический А, В, Е и газовой гангрены (перфрингенин и эдематигенин) анатоксины. Анатоксины также сорбируют на гидрате окиси алюминия или фосфате алюминия.

Вакцинные препараты выпускают в стеклянных ампулах или флаконах. Большинство живых вакцин выпускают в виде сухих (замороженных при низких температурах и высушенных из замороженного состояния в условиях глубокого вакуума) препаратов. Живые вакцины должны транспортироваться и храниться при температуре не выше 4-8°C.

Убитые вакцины и анатоксины более устойчивы при хранении, чем живые, но замораживание убитых вакцин и анатоксинов недопустимо, т.к. при последующем оттаивании могут измениться физические свойства препарата.

Перед применением препаратов необходимо тщательно осмотреть ампулы или флаконы и установить их целостность, наличие этикетки со всеми данными: 1) название предприятия, изготовившего препарат; 2) название препарата; 3) номер серии; 4) номер контроля ОБК (отдела бактериологического контроля); 5) титр или количество доз препарата; 6) срок годности. Для сухих препаратов указывают объем растворителя.

Не допускается использовать препараты:

- 1) в случае явного изменения физических свойств препарата или повреждения ампулы (флакона);
- 2) по истечении срока годности;
- 3) при нарушении условий хранения.

В армии и на флоте проводят плановые профилактические прививки и прививки по эпидемическим показаниям. Плановые профилактические прививки включают:

- вакцинацию против гриппа с ежегодной ревакцинацией;
- ревакцинацию против туберкулеза молодому пополнению и постоянному составу в возрасте до 30 лет при отрицательной пробе Манту.

Профилактические прививки по эпидемическим показаниям - при угрозе заноса инфекционных заболеваний или при их возникновении - могут быть регулярными или эпизодическими.

Регулярные прививки проводят в некоторых округах против чумы, туляремии и клещевого энцефалита личному составу частей, расположенных в природных очагах этих инфекций.

Некоторые вакцины используют для лечения хронических вялотекущих инфекций: бруцеллеза, хронической гонореи, герпетических инфекций.

Сыворотки и иммуноглобулины

Предупреждение развития инфекции путем введения в организм готовых антител до начала заболевания получило название сероиммунопрофилактики. При сероиммунотерапии антитела вводят во время болезни для нейтрализации патогенного действия микробных токсинов.

По направленности действия все сывороточные препараты делят на антитоксические и антимикробные. Гетерологичные сывороточные препараты получают обычно от животных после длительной гипериммунизации соответствующими анатоксинами или микроорганизмами. Они содержат антитела в очень высокой концентрации, однако ввиду чужеродности иммунные сыворотки животного происхождения нередко способствуют аллергии у людей. Гомологичные, т.е. полученные от человека, сывороточные препараты в этом отношении значительно безопаснее.

Антитоксические сыворотки. Эти препараты применяют для экстренной профилактики и терапии заболеваний, в патогенезе которых преобладают явления микробной интоксикации (дифтерия, столбняк, газовая гангрена, ботулизм, скарлатина). Антитоксины нейтрализуют свободные токсины и малоэффективны против токсинов, уже связанных с чувствительной клеткой. Поэтому, чем раньше установлена этиология инфекции, тем быстрее можно будет ввести сыворотку и тем лучше будет лечебный эффект.

Активность антитоксических сывороток измеряют содержанием

антигитоксических единиц (АЕ) в 1 мл. Так, 1 АЕ противодифтерийной сыворотки нейтрализует 100 Dпт токсина для морской свинки массой в 250 г.

Антимикробные сыворотки. Это иммунопрепараты в основном противовирусного действия. Их получают путем фракционирования крови человека и выпускают в виде 10% раствора в ампулах под названием иммуноглобулины. В настоящее время выпускают два вида иммуноглобулинов: противокоревой (нормальный) и иммуноглобулины направленного действия (противогриппозный, антирабический, противостолбнячный, противоклещный и др.).

Противокоревой иммуноглобулин, извлеченный из донорской крови (или плацентарной), содержит антитела к возбудителям кори, скарлатины, ветряной оспы, паротита, аденовирусных заболеваний и других инфекций. Это связано с тем, что препарат готовят из смеси большого числа сывороток взрослых людей. Иммуноглобулины направленного действия получают путем фракционирования сыворотки крови вакцинированных доноров или реконвалесцентов.

Сыворотки и иммуноглобулины обычно вводят внутримышечно, при особых показаниях - внутривенно.

Продолжительность пассивного иммунитета за счет гетерологичных иммуноглобулинов 1-2 нед. за счет гомологичных - 4-5 нед.

БАКТЕРИОФАГ

Бактериофаг - вирус бактерий, паразитирующий только на живой микробной клетке. Он имеет корпускулярное строение и представляет собой шаровидное тело (головку) с отростком. Вирус покрыт белковой оболочкой. В головке фага заключены ДНК или РНК. Размеры фага колеблются в пределах 45-100 нм.

Существуют вирулентные и умеренные фаги. Вирулентные фаги вызывают инфекцию, заканчивающуюся лизисом бактериальных клеток и синтезом новых фаговых частиц. ДНК умеренных фагов включается в хромосому бактерий и передается при их делении неограниченному числу потомков. Такой тип взаимодействия фага с клеткой называется лизогенной, а бактерии, несущие в геноме фаговую ДНК (профаг), называются лизогенными. Они широко распространены в природе и обнаруживаются в воде, почве, сточных водах, испражнениях больных и других биосубстратах.

Репродукция вирулентного фага в клетках бульонной бактериальной культуры сопровождается их лизисом и просветлением сре-

ды. На газоне чувствительных бактерий, выращенных на агаровой среде в чашке Петри, фаги образуют зоны очагового или сплошного лизиса, что зависит от их концентрации. Зоны очагового лизиса получили название негативных колоний фага или стерильных пятнышек. Они имеют морфологию, характерную для определенных фагов и образуются из одной фаговой частицы при внедрении ее и последующей репродукции в клетках микроорганизмов.

Большинство фагов характеризуется видоспецифичностью в отношении бактерий. Однако существуют фаги, способные поражать только отдельные варианты одного и того же вида бактерий. Их используют для определения фаговаров (фаготипов) внутри данного вида.

В практической работе фаги применяют для:

1) фаготитрования бактерий, что важно для маркировки исследуемых культур при эпидемиологическом анализе заболеваний;

2) дифференцировки бактериальных культур с целью установления их видовой принадлежности;

3) фагодиагностики, заключающейся в выделении фага из организма больного (например, из испражнений), что косвенно свидетельствует о наличии в материале соответствующих микроорганизмов. Фаги, так как они обладают антигенными свойствами, также используют для иммунизации животных с целью получения диагностических антифаговых сывороток. Кроме того, в отдельных случаях фаги используют для фаготерапии - лечения инфекционных заболеваний.

Выделение бактериофага

Для выделения бактериофага из объектов окружающей среды (вода, суспензии фекалий и т.д.) готовят фильтрат исходного материала. С этой целью 3-5 г фекалий тщательно размешивают в 50 мл мясо-пептонного бульона и полученную взвесь инкубируют в термостате при 37°C 18-20 ч. После этого взвесь освобождают от грубых нерастворимых частиц путем фильтрования или центрифугирования. Освобождение фага от микроорганизмов достигается фильтрованием осветленной взвеси через фильтры-свечи или асбестовые пластинки Зейтца; указанные фильтры задерживают почти все микроорганизмы, а корпускулы бактериофага проходят через поры фильтров и могут быть обнаружены в фильтрате.

В некоторых случаях отделение фага от микроорганизмов достигается прогреванием взвеси при 59°C в течение часа. В этих условиях все вегетативные формы бактерий погибают, а активность большинства фагов сохраняется. Кроме того, исследуемую взвесь можно об-

работать хлороформом, который убивает микроорганизмы, но не действует на большинство фагов.

В полученном фильтрате обнаружение бактериофага производят путем посева этого фильтрата с соответствующей культурой бактерий в жидкую питательную среду. Для этого берут четыре пробирки с мясо-пептонным бульоном, вносят 4-6-часовую культуру микроорганизмов, гомологичную выделяемому фагу, питательную среду помещают в термостат и спустя 2-3 ч добавляют исследуемый фильтрат. Через 12-18 ч инкубирования пробирок в термостате учитывают результаты.

При выделении бактериофага слабой или средней активности его литическую активность (титр) повышают путем пассажей на гомологичной микробной культуре.

В лабораторных специфичность бактериофага определяют методами Отто или Фюрта.

Метод Отто. Растворенный 3% мясо-пептонный агар разливают в стерильные чашки Петри, охлажденные чашки подсушивают в термостате в течение 10-15 мин. На поверхность питательной среды засевают "газоном" 16-18 часовую бульонную культуру бактерий, гомологичных искомому бактериофагу, наносят каплю известного фага или исследуемого фильтрата, чашку наклоняют и дают капле фага стечь по противоположному краю. Чашки инкубируют в термостате 18 ч и учитывают результат. Если фаг гомологичен микроорганизму и биологически активен, то по пути стекания капли роста микробов не будет, среда остается прозрачной.

Метод Фюрта. В 15-30 мл мясо-пептонного бульона вносят 0,5 мл фекалий и помещают в термостат при температуре 37°C на 20 ч. На следующий день этот МПБ фильтруют через свечу и заливают 1,5% МПА, охлажденный до 48-50°C. Фильтрат тщательно смешивают с агаром, когда агар застынет, среду подсушивают в термостате обычным способом.

Дно чашки делят на 8-10 секторов и на каждый сектор сеют штрихом одну бульонную культуру микроорганизмов 3-часового возраста. Результаты учитывают через 18-24 ч. Если в исследуемом фильтрате есть бактериофаг, то гомологичный микроорганизм не будет расти на питательной среде или могут образоваться только отдельные колонии как результат размножения фагорезистентных бактериальных клеток. На тех же секторах питательной среды, куда нанесли микробную культуру, гетерологичную бактериофагу, будет

нормальный рост микробов. В модификации Фишера дно чашки с агаром, по Фюрту, делит рядом пересекающихся под прямым углом продольных и поперечных линий на 30 квадратов. В центр каждого квадрата вносят петлей испытуемые бульонные культуры. Чашки помещают в термостат на 18-20 ч и учитывают результат.

Методы титрования бактериофага

Титром бактериофага называют то его максимальное разведение, при котором данный бактериофаг способен лизировать гомологичную микробную культуру.

Метод серийных разведений (Аппельмана). Испытуемый фильтрат или известный бактериофаг разводят 10-кратного мяско-пептонным бульоном. Для этого берут 10 пробирок с 4,5 мл МПБ в каждой. В первую пробирку вносят 0,5 мл исследуемого фага, содержимое пробирки тщательно перемешивают. Из этой пробирки 0,5 мл переносят в следующую и т.д. Таким путем готовят ряд 10-кратных разведений фага (10^{-1} - 10^{-6}). В каждую пробирку приготовленного ряда вносят по одной капле соответствующей бульонной культуры. Для контроля берут 2 пробирки с МПБ, в одну из которых вносят 0,5 мл исследуемого фага (контроль на отсутствие бактерий в исследуемом фаге), в другую пробирку - одну каплю микробной культуры (контроль культуры).

Все пробирки помещают в термостат на 18 ч. Титр фага определяют по наибольшему разведению препарата, в котором обнаруживается литическая активность.

Метод агаровых слоев (Граци). В чашки Петри заливают 0,5% МПА с геницианвиолетом (0,1 мл 0,4% геницианвиолета на 1 л среды). Агар в чашках подсушивают в термостате до полного удаления конденсата.

Берут 0,7% МПА в пробирках по 2,5 мл в каждой, расплавляют его на водяной бане и охлаждают до 48-50°C. В стерильную пробирку вносят 0,1 мл 1-миллиардной взвеси эталонной суточной агаровой культуры и добавляют 1 мл соответствующего разведения исследуемого бактериофага, тщательно смешивают, добавляют 2,5 мл 0,7% МПА, еще раз тщательно смешивают и содержимое пробирки выливают в чашку с МПА (вторым слоем). Смесь равномерно распределяют по поверхности агара и оставляют чашку в горизонтальном положении на 40-50 мин, то есть до полного охлаждения агара. Затем чашки слегка подсушивают и инкубируют в термостате при 37°C в течение 18-20 ч.

На фоне равномерного роста микробов отмечаются пятна, где рост отсутствует, что обусловлено лизисом микробной культуры в результате действия бактериофага. При большом количестве бактериофага

наступает лизис микроорганизмов на всей поверхности агара. Если же количество фаговых корпускул невелико, то участков лизиса будет мало, их можно сосчитать и, допуская, что каждый участок лизиса образовался в результате действия одной корпускулы фага, рассчитать количество активных корпускул фага в 1 мл препарата. Допустим, что на агаре в чашке имелось 30 пятен лизиса (колоний фага) при исследовании фильтрата в разведении 10^{-7} . Следовательно, титр фага будет равен 3×10^8 , т.е. в 1 мл фага содержится 3×10^8 активных корпускул. Следует помнить, что 0,7% МПА, охлажденный до 48°C , можно хранить не более часа. Метод Грациа является важнейшей частью методики постановки реакции нарастания титра фага.

ГЕНОИНДИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Обнаружение и идентификация возбудителей инфекционных заболеваний представляет собой одну из важнейших задач микробиологии. Решение этой задачи обеспечивается богатым арсеналом методических приемов, начиная от классических методов микробиологического тестирования и заканчивая иммунохимическими и молекулярно-биологическими методами. В каждом случае характер и сложность диагностических приемов зависят от биологии искомого возбудителя инфекции, которые претерпевают адаптивные изменения под воздействием экологических факторов, антибактериальной терапии и т.д.

Поэтому в последние годы все чаще и чаще традиционные, а порой и недавно наиболее перспективные методы диагностики оказываются недостаточными или принципиально неприменимыми. В связи с этим в настоящее время при проведении диагностических исследований стремятся к выявлению в исследуемых образцах специфических фрагментов нуклеиновых кислот патогенов.

Одним из наиболее часто применяющихся с этой целью методов является гибридизация специфических последовательностей нуклеиновых кислот (зондов) с фрагментами генома искомого патогена, с помощью которой проводят обнаружение в исследуемых образцах, идентификацию возбудителей до вида, рода или семейства, дифференцируют патогенные и непатогенные штаммы одного вида (токсигенные и нетоксигенные *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia enterocolitica* и т.д.). Зонды представляют собой меченые радиоактивными (^{32}P , ^{35}S , ^{125}I) или хромогенными (фотобиотин, аммиолигк 1)

метками одноцепочные участки нуклеиновых кислот (в большинстве случаев ДНК) длиной, как правило, 32-37 нуклеотидов, которые связываются с комплементарными последовательностями в процессе реассоциации ДНК. Эти последовательности, в зависимости от типа используемых гибридизационных проб, могут быть обнаружены в геноме штаммов одного или близко родственных видов либо в гомологичных генах изолятов различных видов (например, гены, кодирующие синтез термоллабильных энтеротоксинов *E.coli* и *V.cholerae*, R-плазмиды *Serratia* и *Klebsiella* spp.).

Искомые последовательности доступны обнаружению, даже если они составляют 0,001% генома возбудителя. При этом не требуется обязательного изолирования чистой культуры патогенов, и процесс идентификации в различных клинических биосубстратах занимает от 6 до 48 ч. Чувствительность метода составляет от 2×10^3 до 1×10^6 КОЕ/мл, специфичность гибридизации очень высока (0,5-0,8% ложноположительных результатов).

Вместе с тем достаточно сложная техника проведения экспериментов по гибридизации с использованием радиоактивно меченных проб препятствует широкому внедрению метода в диагностические лаборатории. Поэтому в последнее время широкое применение получила полимеразная цепная реакция (ПЦР), основанная на многократном копировании выбранной нуклеотидной последовательности генома с помощью ДНК-полимеразы, синтезирующей взаимно комплементарные цепи ДНК, начиная с двух олигонуклеотидных праймеров (затравок), комплементарных противоположным цепям ДНК в участках, ограничивающих последовательность-мишень и ориентированных 3,5-концами навстречу друг другу. При синтезе ДНК праймеры физически встраиваются во вновь образуемые молекулы ДНК, и каждая из таких цепей, синтезированных с помощью одного из праймеров, может служить матрицей для синтеза комплементарной нити с помощью другого праймера. Для этого лишь надо денатурировать образовавшиеся на первой стадии реакции двухцепочечные молекулы ДНК, дать возможность праймерам комплементарно присоединиться к ДНК и осуществить элонгацию. Эти три стадии составляют цикл ПЦР и приводят к удвоению количества ДНК в образце.

Любая из вновь синтезированных цепей ДНК служит матрицей для синтеза новых молекул ДНК, поэтому они будут соответствовать по длине и последовательности участку ДНК, выбранному для амплификации. Эти молекулы образуются уже после второго цикла

ПЦР, а в последующих циклах будет происходить экспоненциальный рост числа именно таких, ограниченных с двух концов праймерами, молекул ДНК. Их количество определяется формулой $(2^n - 2n)x$, где n - число циклов ПЦР, $2n$ - количество ПЦР-продуктов неопределенной длины, синтезируемых постоянно, но "разбавляемых" в ходе реакции, x - первоначальное количество копий матрицы в образце.

Следовательно, теоретически за 20 циклов ПЦР можно амплифицировать 2^{20} (около 10^6) копий заданного участка ДНК, что позволяет теоретически обнаруживать единственную молекулу искомого ДНК в образце. Для получения удовлетворительных результатов исследования, как правило, достаточно провести 27-30 циклов ПЦР в связи с тем, что к этому моменту накопление ДНК-продукта из экспоненциального становится линейным из-за истощения пула нуклеотидов, праймеров, инактивации полимеразы, конкуренции со стороны неспецифических продуктов амплификации и от прочих причин. Выявление амплифицируемых фрагментов осуществляют, как правило, путем их разделения методом гель-электрофореза и визуализации в УФ свете после окрашивания этидием бромидом или посредством ДНК-ДНК-гибридизации с внутренним олигонуклеотидом (зондом).

Из схемы реакции становится понятным, что метод обладает широкими возможностями для обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний различной этиологии. Относительная простота постановки, быстрота, высокая чувствительность и специфичность придает полимеразной цепной реакции значительные преимущества при лабораторной диагностике вирусных инфекций, а также при выявлении микроорганизмов, культивирование которых слишком длительно и трудоемко, а различные варианты иммунохимической диагностики (серологическое тестирование, иммуноферментный анализ, метод флюоресцирующих антител) не вполне надежны. Этим методом удается обнаруживать около 100 м.к.г./мл в пробе с применением для визуализации результатов электрофореза в агарозном геле или 1-25 клеток при использовании с этой целью дот-гибридизации. Незаменима ПЦР при обнаружении вирулентных штаммов бактерий, достигаемом путем амплификации фрагментов генов, кодирующих различные факторы вирулентности (*tox* - ген *Corynebacterium diphtheriae*, *inv* - ген *Y. enterocolitica*). Для исследования с использованием ПЦР при выявлении патогенных микроорганизмов доступны не только свежеснятые образцы (биоптаты и т.д.), но и замороженные, фиксированные этанолом или формалином пробы.

Полимеразная цепная реакция - единственный на настоящее время методический подход, способный доказать присутствие в образце обладающих патогенным потенциалом некультивируемых форм микроорганизмов с последующей их идентификацией путем амплификации, к примеру, генов 16S рРНК, их секвенирования и последующего сравнения полученных результатов с нуклеотидными последовательностями аналогичных генов известных микроорганизмов. Таким образом были идентифицированы возбудители бациллярного ангиноматоза *Rochalimaea henselae*, болезни Виппла - актиномицет *Tropheryma whippelii*. В настоящее время с использованием ПЦР ведется поиск предполагаемых ранее инфекционных агентов - возбудителей саркоидоза, заболевания Крона, малакоплаксии, хронического возвратного остеомиелита.

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИКИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Выявление фенотипической изменчивости (модификации)

Изучают колонии *Proteus mirabilis*, выращенные на питательном агаре в чашке Петри через 24 ч после посева разведенной культуры. Отмечают, что все колонии протей окружены зоной роения. Пересевают все колонии петлей на поверхность питательного агара с 1% сухой желчью в чашки Петри и инкубируют при 37°C 18-24 ч. Все колонии протей, выращенные на питательном агаре с желчью, не имеют зон роения. Вновь пересевают каждую колонию в чашку Петри с питательным агаром и инкубируют при 37°C 18-24 ч. Наблюдают, что все колонии, выращенные на питательном агаре, окружены зоной роения.

Изменение фенотипа протей на питательной среде с желчью (утрата роения) следует считать модификацией, т.к. сильно все три ее отличительных признака: определенность (связь отсутствия роения с определенным фактором - желчью), общность изменений (утрата роения наблюдается у всех изученных клеток или колоний популяции), обратимость (при отсутствии желчи в питательной среде восстанавливается исходный фенотип).

Выявление мутантов-бактерий и доказательство спонтанности мутаций тестом перераспределения

В две чашки Петри с питательным агаром вносят по 0,1 мл суточной бульонной культуры *E.coli* M-17 (посевная доза 1×10^8 бактерий) и

равномерно распределяют шпателем по поверхности питательной среды. Через 6 ч инкубации при 37°C в одной из чашек перераспределяют шпателем популяцию бактерий (микрocolонии) по поверхности питательной среды, а другую чашку оставляют нетронутой. Выросшие через 24 ч бактерии пересеивают из каждой чашки методом отпечатков с помощью штампа-репликатора на поверхность питательного агара с рифампицином (100 мкг/мл) в отдельные чашки Петри и инкубируют при 37°C. Через 24 ч учитывают результат: на поверхности среды с рифампицином в чашке без перераспределения выросли единичные колонии рифампицинрезистентных мутантов, в чашке с перераспределением посевов выросли более многочисленные (в десятки - сотни раз) колонии антибиотикоустойчивых мутантов.

Перераспределение бактерий шпателем на поверхности питательной среды без антибиотика не оказывает влияния на число бактерий. Если допустить, что антибиотикоустойчивые мутанты возникают в результате индукции антибиотиком, то после перераспределения и без него на питательной среде с антибиотиком должно вырасти одинаковое число колоний антибиотикоустойчивых мутантов. Если же антибиотикоустойчивые мутанты возникают спонтанно и в отсутствие антибиотика, то результат будет иной. Уже в первой инкубации (через 6 ч) на среде без антибиотика на чашках появляются микрocolонии антибиотикоустойчивых клеток-мутантов. Благодаря перераспределению бактерии-мутанты из этих микрocolоний распространяются по всей поверхности среды и после посева отпечатками на среду с антибиотиками дадут начало многочисленным колониям мутантов, в то время как отпечатки с чашки без перераспределения выявляют только небольшое число колоний, соответственно исходным микрocolониям мутантов. Полученный в данном опыте результат доказывает, что антибиотикоустойчивые мутанты возникли спонтанно до контакта бактерий с селективным агентом рифампицином.

Постановка опыта конъюгации

Донор: *E. coli* K-12 HfrC Leu⁺ Thr⁺ Sm^r. Реципиент: *E. coli* C-600 Leu⁻ Thr⁻ Sm^s. Селективная среда для выделения рекомбинантов: максимальная среда, содержащая NH₄Cl - 5 г, NH₄NO₃ - 1 г, Na₂SO₄ - 2 г, K₂HPO₄ - 3 г, KH₂PO₄ - 1 г, MgSO₄·7H₂O - 0,1 г, глюкозу - 2 г, агар-агар - 15 г, дистиллированную воду до 1 л, стрептомицин 200 ЕД/мл.

К 4,5 мл суточной бульонной культуры реципиента добавляют 0,5 мл суточной бульонной культуры донора и инкубируют при 37°C

в течение 1 ч. Затем делают разведения смеси физиологическим раствором от 10^{-1} до 10^{-7} и высевают по 0,1 мл на селективную среду в чашки Петри (на среде могут вырасти только колонии бактерий рекомбинантов, ставших прототрофами в результате получения генов *Leu* и *Trp* донора). В качестве контроля на ту же среду засевают раздельно по 0,1 мл культуры донора и реципиента. Они не должны расти на селективной среде, т.к. доноры чувствительны к стрептомицину, а реципиенты – ауксотрофы по лейцину и треонину. Для определения числа жизнеспособных клеток донора разводят его культуру физиологическим раствором и высевают из разведений 10^{-4} - 10^{-7} по 0,1 мл на селективную среду без стрептомицина. Все посевы инкубируют при 37°C 24-48 ч.

После подсчета выросших колоний определяют частоту рекомбинаций по отношению числа рекомбинантов к числу донорских клеток. Например, после посева 0,1 мл смеси в разведении 10^{-4} на селективной среде выросло 150 колоний рекомбинантов, а после посева 0,1 мл культуры донора в разведении 10^{-6} выросло 75 колоний.

Следовательно, частота рекомбинантов будет:

$$\frac{1,5 \cdot 10^7}{7,5 \cdot 10^8} = 2 \cdot 10^{-2}$$

Выявление конъюгативных R-плазмид

Исследуемые бактерии: клинические штаммы антибиотикорезистентных шигелл Зонне. Реципиент: штамм *E. coli* W 1655 *Trp-Lac⁺ N^s*, сохранивший видовую чувствительность к антибиотикам и имеющий не-трансмиссивную хромосомную устойчивость к налидиксовой кислоте. Питательная среда для определения детерминант приобретенной антибиотикоустойчивости: среда Эндо, содержащая раздельно антибиотики - тетрациклин (64 ЕД/мл), левомецетин (64 мкг/мл), стрептомицин (128 ЕД/мл), канамицин (128 ЕД/мл), ампициллин (256 ЕД/мл). Селективная среда для выделения антибиотикоустойчивых рекомбинантов - указанная среда с антибиотиками, содержащая дополнительно к каждому антибиотику налидиксовую кислоту (64 мкг/мл).

Для выявления детерминант антибиотикоустойчивости засевают петлей суточные бульонные культуры шигелл Зонне на секторы сред Эндо с различными антибиотиками и без антибиотиков (контроль).

На каждую чашку делают посев 4-12 штаммов путем нанесения

одной петлей культуры радиальным штрихом. С целью изучения трансмиссивности детерминант антибиотикоустойчивости путем конъюгации вносят по 0,5 мл тех же культур Зонне (доноры) в пробирки с 4 мл бульона Хоттингера и добавляют в каждую пробирку по 0,5 мл суточной бульонной культуры эшерихий (реципиента), т.е. для каждого штамма шигелл используют одну пробирку. Посевы инкубируют при 37°C.

Через 24 ч учитывают антибиотикорезистогаммы. Шигеллы Зонне имеют детерминанты приобретенной антибиотикоустойчивости к тем антибиотикам, на средах с которыми выросли сплошным газоном или отдельными колониями по ходу посева, и чувствительны к тем антибиотикам, на средах с которыми роста нет. В это же время делают высев из пробирок с конъюгационной смесью бактерий на секторы селективных сред для выделения антибиотикоустойчивых рекомбинантов. Высев из смеси делают конкретно для каждого штамма шигелл только на селективные среды с теми антибиотиками, устойчивость к которым обнаружена при определении детерминант антибиотикорезистентности. Методика посева на секторы сред идентична уже описанной. Чашки с посевами инкубируют при 37°C 24 ч, после чего учитывают результаты. Шигеллы Зонне имеют трансмиссивные детерминанты устойчивости к тем антибиотикам, на селективных средах с которыми вырастают газонами или отдельными колониями темно-красного цвета рекомбинанты кишечной палочки. Отсутствие роста рекомбинантов на селективных средах с антибиотиками свидетельствует о нетрансмиссивности детерминант устойчивости к этим антибиотикам. Конъюгативная трансмиссивность комплекса детерминант антибиотикоустойчивости с большой вероятностью указывает на их принадлежность к конъюгативной R-плазмиде.

Выявление Col-плазмид

Исследование проводят методом отсроченного антагонизма по Фредерикю. Испытуемые культуры (например шигеллы Зонне) засевают уколом в 1,5% мясо-пептонный агар по 4-5 штаммов на одну чашку Петри. После инкубирования в течение 24 ч при 37°C выросшие макроколонии стерилизуют парами хлороформа. С этой целью чашку размещают вверх дном и на внутреннюю поверхность крышки наносят 4-6 капель хлороформа. Через 30 мин хлороформ удаляют, выдерживая чашки с открытой крышкой 15-20 мин. Затем поверхность агара заливают слоем расплавленного и охлажденного до

48°C 0,7% мясо-пептонного агара (5 мл), предварительно смешанного 0,1 мл шестичасовой бульонной культуры индикаторного штамма (например *E.coli* W1655). После суточной инкубации при 37°C учитывают результат. Бактерии имеют Col-плазмиду (продуцируют колицины), если вокруг их макроколоний образовались зоны подавления роста индикаторной культуры на фоне ее роста сплошным газонем в остальных участках среды. Идентификацию вида Col-плазмид осуществляют этим же методом, используя коллекцию эталонных индикаторных культур с известной резистентностью или чувствительностью к колицинам.

ЧАСТНАЯ БАКТЕРИОЛОГИЯ

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СТАФИЛОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Представители рода *Staphylococcus*, включающего в себя 31 вид бактерий, играют важную роль в инфекционной патологии человека. Наибольшее значение в медицинской микробиологии имеют золотистый (*S. aureus*), эпидермальный (*S. epidermidis*) и сапрофитический (*S. saprophyticus*) стафилококки. Однако в последнее время в клиническом материале все чаще обнаруживают возбудителей, относящихся к группе так называемых коагулазоотрицательных стафилококков (*S. capitis*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. liquefaciens*, *S. schleiferi*, *S. xylosus*, *S. warneri* и др.). Стафилококки представляют собой шаровидные Грамположительные бактерии, располагающиеся в виде гроздьев винограда.

Материалом для бактериологического исследования являются раневое отделяемое, кровь, спинномозговая жидкость, рвотные массы и промывные воды желудка, пунктаты из ограниченных очагов воспаления (абсцессы и др.), мокрота, мазки со слизистых оболочек носоглотки и т.д. Чаще всего патологический материал забирают с помощью ватных тампонов, которые помещают в пробирку с транспортной питательной средой для контроля стерильности (СКС).

Кровь больного засевают в питательную среду на основе СКС в соотношении 1:10 - 1:20. Пробы из ограниченных очагов воспаления (гнои, экссудат) забирают с помощью шприца, а рвотные массы и промывные воды помещают в стерильные флаконы с притертыми пробками. Взятые образцы не позднее двух часов с момента забора доставляют в бактериологическую лабораторию.

Микробиологическая диагностика стафилококковой инфекции включает в себя три этапа.

На первом этапе из исследуемого материала готовят мазки на предметных стеклах и окрашивают их по Граму. При обнаружении в мазках грамположительных кокков диаметром 0,5-1,5 мкм, располагающихся поодиночке, парами, короткими цепочками или в виде гроздьевидных скоплений, можно предположить наличие в исследуемой пробе стафилококков. Первичный посев патологического ма-

териала производят на универсальные (красный агар, мясо-пептонный бульон) и селективные (желточно-солевой агар) питательные среды, которые инкубируют в термостате при температуре 37°C в течение 18-24 ч. Для лучшего выявления пигмента чашки с красным и желточно-солевым (ЖСА) агаром дополнительно выдерживают на свету при комнатной температуре еще сутки.

На втором этапе изучают культуральные свойства выросших на плотных и жидких питательных средах стафилококков. На красном агаре стафилококки образуют гемолитические и негемолитические непрозрачные колонии белого или золотистого цвета, гладкие, с ровными краями, диаметром 1-3 мм. Колонии золотистого стафилококка окружены зоной полного гемолиза и в большинстве случаев обладают золотистым или палевым пигментом. При наличии в последующем материале стафилококков, обладающих ферментом лецитиназа (*S. aureus*, *S. xylosum* и др.), на ЖСА вырастают колонии, окруженные видимым при косом освещении радужным венчиком.

Из части выросшей на плотной питательной среде колонии готовят мазок на предметном стекле, окрашивают по Граму и микроскопируют. При наличии в мазке типичных грамположительных кокков оставшуюся часть колонии пересевают на сектора красного или мясо-пептонного агара для накопления чистой культуры.

На третьем этапе производят видовую идентификацию стафилококков на основании изучения комплекса биологических свойств выделенных чистых культур (табл. 10) и определение чувствительности возбудителей к антимикробным препаратам.

Для дифференциации стафилококков от стрептококков ставят пробу на каталазу. Для постановки этого теста чистую культуру изучаемого штамма помещают с помощью стеклянной палочки в каплю 3-10% раствора перекиси водорода на предметном стекле и растирают круговыми движениями. В положительных случаях наблюдают выделение пузырьков газа. В отличие от стафилококков стрептококки не обладают ферментом каталазы.

Реакция плазмокоагуляции. Петлю суточной агаровой культуры стафилококка суспендируют в 0,5 мл разведенной 1:5 шпигатной кроличьей плазме. Результаты реакции регистрируют через 1, 2, 4 и 18 ч инкубации проб в термостате при температуре 37°C. Появление на две пробирки студнеобразного сгустка свидетельствует о наличии у изучаемого штамма фермента плазмокоагулазы.

Определение ДНКазы. Суточную агаровую культуру стафилококка

засевают коротким штрихом на поверхность содержащего ДНК мясопептонного агара. После инкубации посевов при 37°C в течение 18-24 ч поверхность агара заливают 1 N раствором соляной кислоты. Вокруг продуцирующих ДНКазу колоний образуется зона просветления.

Определение фосфатазы. Изучаемую культуру засевают бляшками на чашку с фенолфталейновым агаром. После 18-24 ч инкубации при температуре 37°C выросшие колонии обрабатывают раствором аммиака.

О положительной реакции свидетельствует появление розового окрашивания колоний.

Ферментацию мочевины и углеводов изучают путем посева куль-

Таблица 10

Основные дифференцирующие признаки стафилококков, наиболее часто встречающихся в клиническом материале

Вид стафилококков	ДНК-аза	Плазмо-когуляза	Фосфо-таза	Нитрат-редуктаза	Продукция аргемин	Уреа-за	Глюко-за	Мани-тола	Ман-нитол	Сов.-рост
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+
<i>S. epidermidis</i>	-	-	+	+	+	+	(+)	(+)	+	-
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	d
<i>S. intermedius</i>	+	+	+	+	-	+	d	(+)	(+)	d
<i>S. schleiferi</i>	+	-	+	+	+	-	(+)	+	-	-
<i>S. carnis</i>	-	-	-	d	d	-	(d)	+	-	+
<i>S. warneri</i>	-	-	-	d	+	+	(d)	-	(+)	d
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	-	+	+	-	(+)	-	+	d
<i>S. haemitis</i>	-	-	-	d	d	+	-	-	+	(+)
<i>S. lupinus</i>	-	-	-	+	+	d	(+)	+	+	-
<i>S. cohnii</i>	-	-	-	-	d	-	(d)	(d)	(d)	d
<i>S. xylinus</i>	-	-	d	d	d	+	-	+	+	+

+ 90% положительных и более штаммов; - 90% и более отрицательных штаммов; d - 11-89% позитивных; () - замедленная реакция.

туры стафилококка на питательную среду, содержащую 1% соответствующего субстрата и индикатор.

Определение ацетона. Суточную агаровую культуру стафилококка засевают в бульон Кларка. После инкубации при 37°C в течение 18-24 ч в пробирки с культурой добавляют небольшое количество

5% спиртового раствора альфа-нафтола и 40% NaOH. После повторной инкубации в течение 1 ч учитывают результат. При наличии ацетона среда окрашивается в красный цвет.

Для ускоренной биохимической идентификации стафилококков на кафедре микробиологии Военно-медицинской академии разработан микрометод с использованием жидких дифференциально-диагностических сред в полистироловых планшетах. Для определения фаговара *S. aureus* используют международный набор типовых бактериофагов, с помощью которого можно выявить наиболее опасные в эпидемиологическом отношении штаммы. В последние годы все более широкое распространение получает электрофоретический метод внутривидового типирования стафилококков по спектрам образующих ими внеклеточных белков. Для определения экзотоксинов стафилококков разработаны иммуноферментные тест-системы, обладающие высокой чувствительностью и специфичностью.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СТРЕПТОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Род *Streptococcus* включает в себя 29 видов бактерий, вызывающих поражение дыхательных путей (пневмония, скарлатина, фарингит и др.), ЛОР органов (ангина, отит, мастоидит и др.), сердечно-сосудистой системы (эндокардит и др.), гнойно-воспалительные заболевания кожи и подкожной клетчатки (рожа, флегмона, стрептодермия и др.), центральной нервной системы (менингит), послеродовые и детские инфекции, воспалительные заболевания полости рта (кариес и др.), сепсис и постстрептококковые заболевания (ревматизм, нефрит). Наибольшее значение в этиологии стрептококковых инфекций имеют патогенные стрептококки (*S. pyogenes*), стрептококки группы В (*S. agalactiae*), бета-гемолитические стрептококки групп С и G, стрептококки группы D (*S. bovis*) и пневмококки (*S. pneumoniae*). Стрептококки - шаровидные Грамположительные микроорганизмы, располагающиеся цепочками различной длины.

В зависимости от локализации патологического процесса материалом для исследования служит ротовое отделяемое, мокрота, кровь, ликвор, слизь из зева, кусочки пораженных тканей и т.д. Для взятия материала используют стерильные пробирки (ротовое отделяемое, спинномозговая жидкость), одноразовые шприцы (гной), стерильные ватные тампоны. При тонзиллитах и фарингитах пробы для ис-

следования забирают со слизистой оболочки задней стенки глотки и зева сухим ватным тампоном, фиксируя язык шпателем. Не рекомендуется брать материал в течение двух часов после еды или полоскания рта. После взятия образцов тампоны помещают в пробирку с транспортной питательной средой, основой для которой служит среда для контроля стерильности (СКС). Кровь для бактериологического исследования в объеме 5-10 мл забирают из локтевой вены стерильным шприцем и засевают в находящуюся во флаконе специально предназначенную для этого питательную среду (сахарный бульон) непосредственно "у постели больного" таким образом, чтобы соотношение крови и питательной среды было не менее 1:10-1:20. Оптимальные сроки доставки патологического материала в бактериологическую лабораторию не должны превышать двух часов.

Методы микробиологической диагностики стрептококковых инфекций

На первом этапе исследования микроскопируют окрашенные по Граму мазки, приготовленные из доставленного материала. Стрептококки представляют собой грамположительные сферические или слегка вытянутые клетки диаметром менее 2 мкм, располагающиеся парами и цепочками различной длины. По мере старения культуры количество клеток, окрашивающихся грамотрицательно, возрастает. Следует отметить, что на основании изучения морфологии клеток не всегда можно сделать вывод о принадлежности изучаемой культуры к роду *Streptococcus*.

Взятый для исследования материал засевают на селективные и неселективные питательные среды. Для выделения стрептококков групп А и В из смеси культур используют кровяной агар с неомистином, для выделения *S. agalactiae* - селективный бульон с налидиксовой кислотой и гентамицином, для выделения *S. bovis* - желчно-эскулиновый агар. Обязательным является посев на 5% кровяной агар, для приготовления которого рекомендуется использовать кровь баранца. Эта питательная среда ингибирует рост *Haemophilus haemolyticus*, обладающего сходными с патогенным стрептококком культуральными свойствами и являющегося постоянным обитателем слизистой оболочки верхних дыхательных путей. В качестве сред обогащения используют бульон для стрептококков и среду для контроля стерильности (СКС), которые разливают в пробирки по 3-5 мл.

Стрептококки относятся к микроорганизмам, которые при культивировании в условиях повышенной концентрации двуокиси углерода дают более пышный рост. Поэтому чашки с посевами помещают в экзекатор с плотно притертой крышкой или в анаэробстат, на дно которых ставят зажженную свечу. По мере возрастания концентрации углекислого газа свеча гаснет, создавая благоприятные условия для роста стрептококков. Инкубацию посевов осуществляют при температуре 37°C в течение 18-24 ч.

Целью второго этапа бактериологического исследования является изучение выросших на плотных питательных средах изолированных колоний стрептококков с последующим их субкультивированием для получения чистой культуры. На кровяном агаре стрептококки образуют мелкие (1-2 мм в диаметре) прозрачные, полупрозрачные или непрозрачные колонии серовато-белого цвета.

По виду гемолиза на кровяном агаре стрептококки можно разделить на три группы.

Первая группа представлена бета-гемолитическими стрептококками, способными вызывать полный лизис эритроцитов (полное просветление среды) вокруг образованных ими колоний. В свою очередь эти колонии могут быть слизистыми (прозрачные, 1,5-2,5 мм в диаметре, правильной круглой формы, напоминающие капельки росы), матовыми (шероховатые, 1,5-2,5 мм в диаметре, серовато-белого цвета с характерным слегка приподнятым центром) и блестящими (мелкие, 1-1,5 мм в диаметре, круглые, с ровным краем, блестящей и впадной поверхностью). Слизистые формы колоний характерны для свежeweделенных штаммов *S. pyogenes*, матовые формы - для образующих большое количество М-белка вирулентных стрептококков, а блестящие - для слабо- и авирулентных штаммов *S. pyogenes* и многих штаммов *S. galactiae*.

Вторая группа состоит из альфа-гемолитических стрептококков, дающих на кровяном агаре неполный гемолиз в виде полупрозрачной зоны зеленоватого оттенка, обусловленной превращением гемоглобина в метгемоглобин. Зеленящие стрептококки растут в виде мелких (1-1,5 мм в диаметре) колоний сероватого цвета с гладкой или шероховатой поверхностью. Этот тип колоний характерен для многих видов, вегетирующих на слизистой оболочке полости рта (*S. salivarius*, *S. mutans*, *S. oralis* и др.).

В третью группу входят негемолитические (гамма-стрептококки), не вызывающие в процессе своего роста изменений кровяного агара.

Эти микроорганизмы обладают слабой вирулентностью и в большинстве случаев не имеют практического значения.

Из подозрительных в отношении стрептококков колоний готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Для первых генераций стрептококков чисто характерен выраженный полиморфизм: наряду с типичными шаровидными клетками встречаются вытянутые в длину кокки разной величины. В мазках, приготовленных из выросших на плотных питательных средах колоний, стрептококки располагаются парами, короткими цепочками и скоплениями неправильной формы.

На жидких питательных средах рост различных видов стрептококков имеет свои особенности. Для пиогенного стрептококка характерен придонно-пристеночный рост с образованием мелкозернистого осадка и сохранением полной прозрачности среды. Пневмококки дают обычно придонный рост в виде пушистого рыхлого осадка с сохранением полной прозрачности или равномерным более или менее интенсивным помутнением бульона. *S. bovis*, а также некоторые штаммы *S. pyogenes* и *S. agalactiae* вызывают интенсивное помутнение бульона с образованием небольшого гомогенного осадка. В приготовленных из бульонных культур мазках стрептококки располагаются обычно в виде длинных цепочек (7-8 и более кокков). Однако в препаратах, приготовленных из бульона с диффузным ростом культуры, цепочки состоят, как правило, из небольшого количества кокков.

Для получения чистой культуры выросшие на плотной питательной среде колонии стрептококков пересевают на кровяной агар или в питательный бульон. Из флаконов с посевами крови делают высевы на кровяной агар на вторые, четвертые и девятые сутки для получения изолированных колоний и последующего их субкультивирования. Если при посеве нативного материала на плотные питательные среды колонии стрептококков не обнаружены, производят повторный посев на них со сред накопления.

Третий этап микробиологического исследования заключается в дальнейшей идентификации стрептококков. С этой целью после проверки чистоты выделенной культуры с помощью микроскопии проводят изучение ее биохимических и антигенных свойств.

Для видовой идентификации стрептококков в настоящее время предложено довольно много тестов, однако наибольшее дифференциально-диагностическое значение имеют следующие: определение вида гемолиза на кровяном агаре, проба на каталазу, чувствительность к бацитрацину и сульфаниламидам (сульфаметоксазолу и три-

метоприму), CAMP-тест, гидролиз гиппурата натрия, желчно-эскулиновый тест, рост в бульоне с 6,5% NaCl, наличие PYR (пирролидопиперамидазны) и характер группового полисахаридного антигена (табл. 11).

Таблица 11

Основные биологические свойства стрептококков

Свойства	Микроорганизмы			
	<i>S.pyogenes</i>	<i>S.galactiae</i>	стрептококки группы C и G	<i>S.bovis</i>
Вид гемолиза на кровяном агаре	β	β, α	β	α, γ
Гидролиз гиппурата натрия	-	+	-	-
CAMP-тест	-	+	-	-
Наличие PYR	+	-	-	-
Желчно-эскулиновый тест	-	-	-	+
Рост в бульоне с 6,5% NaCl	-	+	-	-
Чувствительность к бацитрацину	+	-	-	-
Чувствительность к сульфаметоксазолу и триметоприму	-	-	+	+

Проба на каталазу. Тест основан на способности обладающих этим ферментом микроорганизмов расщеплять перекись водорода с образованием кислорода и воды. Для постановки этого теста чистую культуру изучаемого штамма помещают с помощью стеклянной палочки в каплю 3-10% раствора перекиси водорода на предметном стекле и растирают круговыми движениями. В положительных случаях наблюдают выделение пузырьков газа. В отличие от стафилококков стрептококки не обладают ферментом каталаза.

Проба с бацитрацином и сульфаниламидами. Для предварительной идентификации *S. pyogenes* и бета-гемолитических стрептококков групп С и G используют два диска из фильтровальной бумаги, один из которых импрегнирован раствором антибиотика бацитрацина (0,04 ЕД/диск), а второй - смесью сульфаметоксазола (23,75 мкг/диск) и триметоприма (1,25 мкг/диск). Диски помещают на чашку с засеянным испытуемой культурой кровяным агаром и инкубируют 18-24 ч в аэробных условиях. Любая видимая зона задержки роста вокруг дисков интерпретируется как чувствительность к этим антимикробным препаратам (положительный результат). Абсолютное большинство штаммов *S. pyogenes* чувствительны к бацитрацину, а стрептококков групп С и G - к смеси сульфаметоксазола и триметоприма.

САМР-тест. Большая часть стрептококков группы В (*S. agalactiae*) продуцирует экстрацеллюлярный белок (САМР-фактор), который при взаимодействии с бета-лизином золотистого стафилококка вызывает синергическое усиление лизиса эритроцитов. Для постановки САМР-теста через центр чашки с кровяным агаром сплошной линией наносят суточную бульонную культуру продуцирующего бета-лизина *S. aureus* (ATCC 33862). Испытуемые штаммы стрептококков наносят перпендикулярно к линии посева стафилококка. В качестве контрольных используют штаммы *S. agalactiae* (положительный контроль) и *S. pyogenes* (отрицательный контроль). При обнаружении в месте пересечения посевов стрептококка и стафилококка спустя 18 ч инкубации при температуре 37°C зоны синергического увеличения гемолитиза в виде "крыла бабочки" делит вывод о наличии в пробе *S. agalactiae*.

Гидролиз гиппурата натрия. В основе данного теста лежит способность стрептококков группы В вызывать гидролиз гиппурата натрия. Для его постановки петля чистой культуры исследуемого штамма суспендируется в 0,4 мл 1% водного раствора гиппурата натрия. Спустя 2 ч инкубации при температуре 37°C добавляют 0,2 мл 3,5% раствора нингидрина в смеси бутанола и ацетона (1:1). При положительном результате после повторной инкубации в течение 10 мин появляется пурпурное окрашивание.

Желчно-эскулиновый тест. Используется для предварительной идентификации стрептококков группы D (*S. bovis*), которые растут на желчно-эскулиновом агаре с образованием комплекса темно-коричневого или черного цвета. Исследуемую культуру стрептококка засевают на питательный агар, содержащий 40% желчи, 0,1% эскулина и 0,05% нитрата железа. Учет результатов производят через 24-

48 ч инкубации при температуре 37°C.

Рост в бульоне с 6,5% раствором NaCl. Простой и доступный тест для предварительной дифференциации стрептококков группы В, которые в отличие от других стрептококков устойчивы к высокой концентрации хлористого натрия. Учет результатов производят через 24-48 ч инкубации при температуре 37°C.

PYR-тест. В основе метода лежит обнаружение фермента пирролидонил-ариламидазы (PYR), который имеется у большинства штаммов *S. pyogenes* и не встречается у других стрептококков. Небольшое количество (0,2 мл) питательного бульона, содержащего 0,01% L-пирролидонил-бета-нафтиламида, инокулируют полной петлей последующей культуры и инкубируют при температуре 37°C в течение 4 ч. После добавления одной капли диметиламиноацетальдегида в положительных случаях появляется ярко-красное окрашивание.

Антигенная дифференциация стрептококков. Основана на обнаружении полисахаридного антигена клеточной стенки (группоспецифического полисахарида С) с помощью различных иммунологических реакций (преципитации, латекс-агглютинации и др.). Особенность этих методов заключается в том, что в роли антигена выступают не цельные микробные к/и, а их экстракты, полученные после обработки центрифугата чистой культуры стрептококка кислотами (соляной или азотной) или различными ферментами. Выпускаемые в настоящее время диагностикумы обеспечивают идентификацию стрептококков групп А, В, С, F, G.

Иммунологическая диагностика стрептококковых инфекций в лабораторных отделениях чаще всего ограничивается определением титра антител к экстрацеллюлярным продуктам стрептококка - стрептолизину-О и ферменту гиалуронидазе. Для проведения исследований используют парные сыворотки больных, взятые с интервалом в 7-10 дней. Титры антистрептолизина-О у практически здоровых людей не превышают 250 международных единиц (АЕStO). При острых и хронических стрептококковых инфекциях они возрастают, причем при наличии ревматизма или нефрита с первых дней заболевания отмечаются очень высокие титры антител (500 АЕStO и выше). Определение титра антигиалуронидазы (АЕHyS) широко используется в диагностике активности ревматического процесса. У практически здоровых людей они, как правило, не превышают 300 единиц (АЕHyS), а у больных ревматизмом достигают 1000 единиц и более.

Методы экспресс-диагностики стрептококковых инфекций

Бета-гемолитические стрептококки группы А способны вызывать у человека тяжелые постстрептококковые осложнения (ревматизм и гломерулонефрит), для профилактики которых большое значение имеет своевременное начало этиотропной антимикробной терапии. Для обнаружения патогенного стрептококка непосредственно в полученном от больного клиническом материале используются реакция коагулирования и метод флюоресцирующих антител (МФА).

Реакция коагулирования основана на применении группоспецифических антител против бета-гемолитического стрептококка группы А, сорбированных на клетках золотистого стафилококка. Тампон с исследуемым материалом помещают в пробирку, в которую добавляют раствор для экстрагирования полисахаридного антигена клеточной стенки стрептококков. Каплю полученного экстракта наносят на предметное стекло и смешивают с каплей специфического иммуодиагностикума. Появление через 2-3 мин хлопьев агглютината и просветление раствора свидетельствуют о положительном результате.

МФА, основанный на использовании меченых флюорохромом специфических антител против стрептококков группы А, можно применять как для непосредственного обнаружения *S. pyogenes* в нативном материале (экспресс-диагностика), так и на этапах выделения возбудителя после получения изолированных колоний или чистой культуры (ускоренная диагностика).

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ПНЕВМОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Пневмококк (вид *Streptococcus pneumoniae*) как представитель рода *Streptococcus* семейства *Streptococcaceae* имеет ряд характерных для других стрептококков свойства.

Пневмококк является грамположительным диплококком, обычно ланцетовидным, имеющим полисахаридную капсулу, с размером клеток $1 \times 0,2$ мкм. Спор не образует, неподвижен.

S. pneumoniae Является комменсалом верхних дыхательных путей. Вместе с тем пневмококк относят к потенциально патогенным микроорганизмам, поскольку он является ведущим этиологическим агентом острых внегоспитальных пневмоний, менингитов, средних отитов и синуситов; может вызывать также первичный сепсис, инфекции другой локализации.

Пневмококк растет при температуре 25-41°C, оптимум - 37°C. Факультативный анаэроб со сложными пищевыми потребностями, однако 10-20% штаммов требуют анаэробных условий при первичной изоляции, особенно из крови. Пневмококк не имеет каталазы, ферментирует глюкозу по тексоломонофосфатному пути с образованием молочной кислоты. Для полноценного роста пневмококку необходимы высокомолекулярные пептоны, комплекс витаминов, пурины, пиримидины, холин. Все это обеспечивают сердечно-мозговые питательные среды, которые являются наилучшими для культивирования. Оптимум pH среды составляет 7,8. Нуждается в экзогенной каталазе, поэтому обязательным компонентом среды должны быть кровь, которая обогащает среду питательными веществами, обеспечивает буферное действие, поддерживает соответствующий кислородный баланс, а железо гемоглобина действует, как каталаза. Стимулируют рост низкая концентрация глюкозы (не более 0,1%), повышенное парциальное давление CO₂ (5-10%).

На плотных питательных средах пневмококк образует небольшие, диаметром 1-2 мм, колонии с α -гемолитом, часто сходные со стрептококковыми (приподнятый край и центр - "блюдно"), но более прозрачные и влажные. Мукозные колонии образуют 3-й и 37-й серотипы. Атипичные штаммы растут в виде шероховатых колоний (R-форма). В анаэробных условиях вокруг колоний некоторых штаммов может наблюдаться γ -гемолит. При росте на жидких питательных средах пневмококк образует диффузное помутнение.

Биохимическая активность характеризуется ферментацией ряда сахаров с образованием молочной кислоты; медленно ферментируются спирты и пентозы. Отличительным свойством *S. pneumoniae* является ферментация инулина.

В антигенном отношении пневмококк неоднороден. Известно 4 типа пневмококковых антигенов: капсульный полисахаридный антиген, С-полисахаридный антиген, М- и R-протеиновые антигены. Капсульный полисахарид является типоспецифическим антигеном. Он обладает антифагоцитарной активностью (фактор вирулентности) и обуславливает выработку протективных антител. На основании различий в капсульных антигенах пневмококки разделены на 84 сероварианта. Определение капсульного антигена используется в диагностических целях и при создании вакцины. Атипичные штаммы не продуцируют капсульный полисахарид. С-полисахарид входит в состав клеточной стенки и обуславливает видоспецифичность клеток (общий

для всех пневмококков). М-протеиновый антиген - это типоспецифический белок, аналогичный М-белку стрептококков, однако он не имеет антифагоцитарных свойств. R-протеиновый антиген был выделен из шероховатых штаммов пневмококка.

Для исследования на пневмококки используются кровь, ликвор, плевральная и перикардиальная жидкости, гноеродная мокрота, биопсийный, бронхоскопический и другой клинический материал в зависимости от локализации очага инфекции. При выявлении бактерионосителей исследуют фарингеальные мазки. В случае предполагаемой задержки до обработки и исследования материал следует хранить при 4°C.

Бактериоскопический метод

Препаратами для микроскопии служат фиксированные мазки, приготовленные из нативного материала и окрашенные по Граму. При микроскопии мокроты оценивается пригодность образца для дальнейшего исследования по степени гноеродности и контаминации орофарингеальной флорой. Образец считается репрезентативным, если количество эпителиальных клеток в нескольких полях зрения при увеличении $\times 100$ меньше 25, а число лейкоцитов больше 25, при соотношении Л/э.к. > 5 . После такого скрининга осуществляют экспресс-диагностику пневмококковой инфекции, применяя большое увеличение. Диагностическим критерием считается преобладание грамположительных lancetовидных диплококков либо их присутствие в количестве 10 в одном поле зрения.

Наиболее ценным и в то же время простым экспрессивным методом диагностики является реакция набухания капсулы по Найфельду. Для постановки теста готовят мазок из исследуемого материала с добавлением капли поливалентной пневмококковой антикапсульной сыворотки (омни-сыворотка) и капли метиленовой сини, после чего накрывают покровным стеклом и микроскопируют. В положительных случаях наблюдается *quellung*-эффект, капсула вокруг клеток пневмококка значительно увеличивается в размерах и становится четко видимой. Этот феномен позволяет легко выявлять и дифференцировать пневмококки от других стрептококков.

Бактериологический метод

Первичный посев материала производят только на кровяной агар. В качестве основы питательной среды используют сердцечно-мозго-

вой агар либо эритроит-агар, к которым добавляют 5-7% крови, 15-20% лошадиной сыворотки и 1-2% дрожжевого экстракта. Кровь засевают в сердечико-мозговой бульон. Материал из респираторного тракта предварительно гомогенизируют химическим способом, смешивая его с муколитиком N-ацетил-L-цистеином, либо механическим способом с помощью миксера. В итоге получают гомогенат в рабочем разведении 1:10, посев которого производят количественным методом. Чашки инкубируют при температуре 37°C в атмосфере с 5-10% CO₂ в течение 18-24 ч.

После инкубации чашки просматривают с использованием лупы, выявляют характерные для пневмококка колонии с α-гемолизом и производят их пересев частыми штрихами на сектора чашки с кровавым агаром для выделения и накопления чистой культуры. При необходимости из колоний готовят окрашенные по Граму мазки и микроскопируют.

Дальнейшее изучение выделенных чистых культур предусматривает установление видовой принадлежности, определение сероварианта и чувствительности к антибиотикам. Иногда определяют вирулентность пневмококка в опыте на белых мышах.

Идентификацию пневмококка осуществляют по совокупности морфологических, физиологических, культуральных, серологических и биохимических свойств. Для дифференциации пневмококка от других видов зеленящих стрептококков используют два основных теста - лизис желчью или дезоксихолатами и чувствительность к оптохину (этилгидрокупренин гидрохлориду).

Тест лизиса желчью. Основан на способности 10% р-ра желчи крупного рогатого скота и 2% р-ра дезоксихолата или таурохолата натрия лизировать молодую культуру пневмококка. Желчь понижает поверхностное натяжение между бактериальной мембраной и средой, что ведет к ускорению естественного аутолитического процесса. Постановку теста осуществляют либо в жидкой среде, когда в две пробирки, одна из которых опытная, содержащая 10% желчный бульон, другая - контрольная с сывороточным бульоном, вносятся испытуемая бульонная культура и выдерживается до часа, либо на плотной среде путем нанесения на газонный рост или изолированные колонии капли желчного бульона (дезоксихолата) и выдерживания, пока не высохнет капля (5-10 мин).

При лизисе пневмококка на жидкой среде отмечается просветление в опытной пробирке; на плотной среде на месте капли рост уплот-

няется или исчезает совсем. Рост стрептококков остается интактным.

Оптохиновый тест. Тест основан на различной чувствительности пневмококка и зеленящих стрептококков к оптохину. Рост пневмококка ингибируется концентрациями оптохина не более 5 мкг/мл. При применении бумажных дисков, импрегнированных оптохином, которые накладывают на инокулированные штрихом чашки с кровяным агаром, зона ингибирования роста *S. pneumoniae* после 18-часовой инкубации значительно превышает зону -стрептококков.

Серотипирование пневмококков. Антигенную структуру пневмококков изучают в реакции агглютинации на стекле или в реакции Найфельда с использованием набора сывороток к капсульным полисахаридам. Набор состоит из "опт" -сыворотки (антитела ко всем 84 сероварам), поливалентных пуловых сывороток, содержащих антитела к 4-7 сероварам и серогруппам, имеющим буквенное обозначение (от "А" до "I"), и типовых сывороток, входящих в пулы. Идентификация может быть также осуществлена с использованием коммерческих реагентов для реакции коаггутинации.

Методы иммунодиагностики

Для диагностики пневмококковых инфекций применяют ряд методов, позволяющих выявлять пневмококковый полисахаридный антиген, присутствующий в растворенном состоянии в различных биосубстратах (мокрота, ликвор, сыворотка крови, моча). Ценность этих экспресс-методов особенно заметна при проведении диагностики на фоне антибиотикотерапии, когда бактериологический метод оказывается неэффективным. Иммуноиндикация пневмококковых антигенов осуществляется при наличии соответствующих реагентов и тест-систем с помощью реакции ко- и латекс-агглютинации, иммуноферментного анализа и встречного иммуноэлектрофореза.

Сероконверсия (четырёхкратный и более подъем титра специфических антител в сыворотке крови) является одним из наиболее надежных критериев этиологической диагностики. Однако результат может быть получен только ретроспективно, спустя 10-15 дней (исследование парных сывороток). Иногда (при отсутствии парных сывороток) в поздние сроки обследования, серологический диагноз устанавливают на основании исследования только одной сыворотки, сопоставляя выявленный уровень антител с известным для данной инфекции минимальным диагностическим титром.

Для определения уровня антипневмококковых антител в сыворотке крови больного используют непрямой вариант метода флюоресцирующих антител (МФА) и ИФА. При постановке МФА в качестве антигена предпочтительнее использовать аутоштаммы пневмококка, выделенного от данного больного. Когда аутоштамм выделить не удастся (исследование в поздние сроки болезни, на фоне антибиотикотерапии и т.д.), для приготовления антигенных препаратов рекомендуют применять гетерологичные штаммы наиболее часто встречающихся серотипов. Препараты обрабатывают разведениями сыворотки больного 1:80 - 1:5120), затем люминесцирующей сывороткой против гаммаглобулинов человека согласно стандартной методике и микроскопируют в люминесцентном микроскопе. Минимальный диагностический титр антипневмококковых антител 1:320 для детей до 3 лет и 1:640 для взрослых больных.

Биологический метод

Исследуемый материал в количестве 0,5-1 мл вводят интрабрюшинно белым мышам. Через 1-5 дней погибшую от сепсиса мышь вскрывают с соблюдением асептики, берут кровь из сердца и засевают на питательные среды.

Применение биологического метода ограничено его трудоемкостью, неэкономичностью, длительностью выделения чистых культур пневмококка. Кроме того, нередко циркулирующие в настоящее время штаммы пневмококка характеризуются низкой вирулентностью и их не удается выделить на мышах.

Диагностические критерии

При исследовании неконтаминированного материала (кровь, ликвор, плевральная жидкость и другой материал, полученный инвазивными методами) этиологический диагноз может быть установлен на основании факта выявления самого возбудителя или его антигена. Сложности возникают при интерпретации результатов исследования такого доступного, чаще всего используемого, но в то же время высоко контаминированного материала, каким является мокрота, полученная от больного пневмонией. В этом случае необходимо принимать во внимание и то, что *S. pneumoniae*, выделенный из мокроты, может быть комменсалом верхних дыхательных путей, и то, что пневмония - это полиэтиологическое заболевание. Таким

образом, точный этиологический диагноз пневмококковой пневмонии может быть установлен при использовании комплекса методов с учетом следующих критериев: а) изоляция пневмококка из крови или плевральной жидкости; б) выделение пневмококка в диагностической концентрации (10^5 /мл) из мокроты; в) выявление сероконверсии к пневмококку в парных сыворотках крови больных. В других случаях устанавливается только вероятный этиологический диагноз. Необходимо также обращать внимание на эффективность начатой антибактериальной терапии.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МЕНИНГОКОККОВОЙ ИНФЕКЦИИ

Возбудитель - менингококк - принадлежит к семейству *Neisseriaceae*, роду *Neisseria*, виду *Neisseria meningitidis*. Менингококк вызывает у человека эпидемический переносный менингит, характеризующийся острым гнойным воспалением мозговых оболочек и эпидемическим распространением; менингококкцемия и назофарингиты. В период эпидемических вспышек в очагах широко распространено носительство менингококков.

Материалы для исследования: спинномозговая жидкость (СМЖ), кровь, носоглоточная слизь, соскоб из геморрагических элементов сыпи, секционный материал.

Как при взятии материала, так и при проведении исследования необходимо учитывать невысокую жизнеспособность менингококка во внешней среде. Поэтому материал исследуют немедленно или не позднее 2-3 ч после взятия, сохраняя его при температуре 37°C.

Для микробиологической диагностики инфекции, вызванной менингококком, применяют методы: бактериоскопический, бактериологический, серологический.

Бактериоскопический метод

Кровь и носоглоточная слизь бактериоскопическому исследованию не подлежат. Из спинномозговой жидкости (лучше из осадка) готовят мазки, фиксируют, окрашивают метиленовой синькой в течение 5 мин или по методу Грама. При микроскопии окрашенного мазка обнаруживают бобовидные одиночные или парные кокки, расположенные либо внутри лейкоцитов, либо свободно. Аналогич-

ным образом изучают мазки-отпечатки из оболочек мозга при исследовании секционного материала.

Обязательному бактериоскопическому изучению подвергают материал из колоний менингококков на плотных питательных средах. Для улучшения дифференцировки с грамположительными кокками фиксированные мазки окрашивают по Граму в модификации Кассины.

Состав красителей следующий.

1. 0,5% спиртовой раствор бриллиантовой зелени (хранить во флаконе с резиновой пробкой).

2. Основной реактив: 0,5% спиртовой раствор йодистого калия - 96 мл; 5% спиртовой раствор йода - 2 мл.

Вначале готовят 0,5% спиртовой раствор йодистого калия, подогревая на водяной бане до полного его растворения; затем добавляют раствор основного фуксина и йода. Раствор хранят в темном флаконе с притертой или резиновой пробкой.

3. Раствор этилового спирта - 30%.

4. Водный раствор фуксина: основного фуксина Целя - 1 мл; дистиллированной воды 9 мл.

Методика окраски: на обезжиренное стекло наносят каплю воды, в которой эмульгируется изучаемая культура. К капле микробной взвеси добавляют каплю бриллиантовой зелени, распределяют в виде мазка, высушивают на воздухе и фиксируют в пламени. На препарат наносят основной краситель на 1,5-2 мин, затем краску смывают водой. Preparat в наклонном положении промывают 30% спиртом до отхождения облачков краски. Вновь промывают водой и докрасивают раствором фуксина в течение 2 мин. При микроскопировании грамотрицательные микробы розовые, грамположительные - зеленовато-черные. На том же стекле целесообразно готовить контрольный мазок из смеси стафилококка и кишечной палочки.

Бактериологический метод

Менингококки растут на плотных и жидких питательных средах, к которым добавляется кровь, сыворотка или асцитическая жидкость. В качестве основы для приготовления питательных сред можно использовать сухой питательный агар Дагестанского института питательных сред, агар на переваре Хоттингера, агар "Д", к которому добавляют 20% нормальной лошадиной сыворотки или сыворотки крупного рогатого скота. Используют для посева свежеприготовленные среды, подогретые в термостате до температуры 37°C.

Исследование спинномозговой жидкости. Спинномозговую жидкость получают в стерильных условиях в количестве 2-3 мл.

Первый день. По 1-2 капли жидкости засевают на две чашки с сывороточным агаром, которые помещают в термостат при температуре 37°C. Одну чашку инкубируют в обычной атмосфере, вторую - при повышенной концентрации CO₂ (10-12%). Прозрачную спинномозговую жидкость целесообразно центрифугировать при 3 тыс. об/мин в течение 15-20 мин и посев на сывороточные среды производить из осадка. После посева из жидкости (или осадка) готовят мазки для бактериоскопического исследования.

Второй день. Изучают характер роста на средах. Через 18-20 ч колонии менингококка мелкие (0,5-1 мм в диаметре), почти прозрачные, слегка выпуклые, с ровными краями и гладкой поверхностью, в проходящем свете голубоватые. Из типичных колоний готовят мазки, окрашивают по Граму и модификации Калины, микроскопируют. Так как при посеве спинномозговой жидкости менингококк вырастает в чистой культуре и образует S-формы колоний, то на этом этапе целесообразно проводить серологическое типирование культуры при помощи групповых противоменингококковых сывороток в реакции агглютинации на стекле.

Выросшую культуру засевают на две пробирки со скошенным сывороточным агаром и одну пробирку со скошенным простым МПА.

Одну пробирку с сывороточным агаром и пробирку с простым МПА инкубируют при температуре 37°C, а вторую пробирку с сывороточным агаром - при 22°C. Эти посева помогают отличить менингококк от *Neisseria catarrhalis*. Кроме того, делают посев в пробирку с полужидким сывороточным агаром для накопления и сохранения культуры.

Третий день. Отмечают наличие роста на сывороточном агаре при температуре 37°C и отсутствие роста на таком же агаре при температуре 22°C, а также на простом МПА при температуре 37°C. Для изучения сахаролитических свойств культуру засевают на плотные или жидкие среды "пестрого" ряда, включающего среды с глюкозой, мальтозой и сахарозой. Эти среды также содержат 20% сыворотки. Делают посев для определения чувствительности выделенной культуры к антибиотикам.

Четвертый день. На основании комплекса биологических свойств выделенной культуры формируют окончательный положительный ответ.

Исследование крови. Во флакон с 50 мл полужидкого 0,1% питательного агара с pH 7,4 засевают 5-10 мл крови больного. Помещают в термостат при температуре 37°C на 18-24 ч и делают высев на чашку с сывороточным агаром. Выделенную культуру изучают так же, как при исследовании спинномозговой жидкости.

Исследование носоглоточной слизи. Материал берут при помощи стерильного ватного тампона на мягкой алюминиевой проволоке с задней стенки глотки, не касаясь языка, зубов, слизистой оболочки щек. Брать материал следует натощак или через 3-4 ч после еды, до начала антибиотикотерапии.

Первый день. Исследуемый материал засевают на чашку с сывороточным агаром и на чашку с сывороточным агаром и ристомцином (100 ЕД/мл).

Второй день. Просматривают чашки с посевами. На среде с ристомцином рост грамположительных кокков тормозится, что облегчает выделение менингококка. Материал из колоний, подозрительных на менингококк, отсеивают на секторы чашки Петри с сывороточным агаром для выделения чистой культуры.

Третий день. Изучают выделенные чистые культуры. Чтобы установить их принадлежность к роду *нейссерия*, ставят реакцию на оксидазу. Реактивом на оксидазу является 1% раствор тетраметилпарафенилендиамина на дистиллированной воде. Изучаемую культуру наносят петлей на поверхность фильтровальной бумаги, смоченной реактивом. След нитриха сразу краснеет, если микроорганизм принадлежит к роду *нейссерия*. Из оксидазоположительных культур готовят мазки, окрашивают по Граму и микроскопируют. Грамотрицательные диплококки, дающие положительную реакцию на оксидазу, засевают на среды "пестрого" ряда на две пробирки с сывороточным и одну пробирку с простым МПА (культурально-температурный тест).

Четвертый день. Учитывают результаты посевов на перечисленных средах. Культуры, признаваемые менингококковыми, тинируют с помощью стандартных агглютинирующих сывороток в реакции агглютинации на стекле. Формулируют окончательный ответ.

Идентификация менингококков. Морфология - грамотрицательный диплококк. Размеры от 0,6 до 1 мкм. Клетки овальной формы, напоминают боб или кофейные зерна, вогнутые стороны двух клеток обращены друг к другу. Неподвижен. Спор и капсул не имеет. В культуре - выраженный полиморфизм. В материале от больного менингококки расположены как внутри лейкоцитов, так и вне их.

Культуральные свойства: аэроб, но рост улучшается в присутствии 10-12% CO₂; весьма чувствителен к колебаниям температуры; растет только на средах, содержащих животный белок; колонии S и R-формы; не растет при комнатной температуре; оксидазоположительен.

Биохимическая активность: ферментирует глюкозу и мальтозу до кислоты без газа.

Антигенная структура: имеет видоспецифические и полисахаридные антигены, по которым менингококки разделены на семь серологических групп, обозначаемых буквами A, B, C, D, X, Y, Z.

Токсикообразование: токсические вещества менингококков обладают свойствами экзо- и эндотоксинов.

Менингококк от других видов рода нейссерия дифференцируют с учетом различных биологических признаков.

Иммунологический метод

Для иммунодиагностики менингококковой инфекции могут быть использованы следующие реакции.

Реакция непрямой гемагглютинации. С 5-6-го дня болезни титры антител, выявляемых в РНГА, достигают 1:200 и выше. В качестве антигена в этой реакции используют взвесь эритроцитов, сенсibilизированных специфическим полисахаридом менингококка. Реакция ставится по обычной методике.

Реакция иммунофлуоресценции. Приготовленные из свежих культур менингококков различных серогрупп препараты обрабатывают сывороткой, а затем флуоресцирующей сывороткой против глобулинов человека. После этого препараты изучают в люминесцентном микроскопе.

Реакция связывания комплемента. Ее можно использовать как для выявления противоменингококковых антител в сыворотке больного, так и для обнаружения менингококкового антигена в материале от больного. Реакцию можно ставить в качественном и количественном вариантах, классическим методом и методом связывания на холоду.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГОНОРЕИ

Гонорея - венерическое заболевание, протекающее как специфический уретрит в острой или хронической форме. Возбудитель гонореи – гонококк (*Neisseria gonorrhoeae*) – вызывает также бленнорею и, в редких случаях, воспаление слизистых глотки и прямой кишки.

Гонококки представляют собой диплококки размером 1,2x0,8 мкм, состоящие из двух бобовидных кокков, располагающихся выпуклыми сторонами друг к другу. Спор не образуют, но имеют вежную капсулу. Жгутиков не имеют. Грамотрицательны.

Гонококки - факультативные анаэробы, на простых питательных средах не растут. Оптимальная температура роста 35-36°C. Биохимические свойства гонококков выражены слабо: на средах "пестрого" ряда они ферментируют только глюкозу с образованием кислоты. Важным свойством гонококков является наличие шигхромоксидазы.

Общепринятыми в микробиологической диагностике гонорей являются бактериоскопический и бактериологический методы исследования, причем первый используется значительно чаще. Иммунологический метод (реакция Борде - Жангу) имеет вспомогательное значение.

Материал для исследования: у мужчин - отделяемое уретры, сок предстательной железы, сперма, осадок мочи; у женщин - отделяемое влагалища и шейки матки. В необходимых случаях берут также соскобы со слизистых других возможных очагов поражения (прямой кишки, глотки, конъюнктивы глаз). Материал отбирают стерильной петлей, ватным тампоном или ложечкой не ранее чем через 2 ч после последнего мочеиспускания или спринцевания.

Микроскопического исследования. Готовят два мазка из исследуемого материала, фиксируя их 96% спиртом в течение 3 мин. Один из мазков окрашивают метиленовым синим, другой - по Граму. Метиленовый синий наилучшим образом контрастирует гонококк, позволяя четко определить его форму, размер, характер взаимодействия с клетками макроорганизма. Мазок, окрашенный по Граму, необходим для окончательной видовой дифференциации обнаруженных кокков. При положительном результате в мазках обнаруживают грамотрицательные диплококки бобовидной формы, находящиеся внутри лейкоцитов. Положительный бактериоскопический диагноз ставится в основном при острой форме гонорей до применения антибиотиков. При хронической гонорее или на фоне лекарственной терапии бактериоскопическое исследование часто не позволяет сделать вывод о наличии

или отсутствия заболевания, так как в этих случаях гонококки могут либо вовсе не обнаруживаться в мазках, либо иметь атипичную форму (в виде шаров или, наоборот, очень мелких образований) и тинкториальные свойства. В таких случаях необходимо проводить бактериологическое исследование. Культуральный метод обязательно применяется также для контроля по окончании лечения больных гонореей, при диагностике заболевания у детей, по требованию судебно-медицинской экспертизы и в некоторых других случаях.

Бактериологическое исследование. Эффективность во многом определяется качеством питательных сред. Среды для культуральной диагностики гонорей готовят на основе мясо-пептонного агара из мяса кроликов или свежих бычьих сердец с добавлением сыворотки крови, дрожжевого гидролизата, казеина. Исследуемый материал засевают на поверхность питательной среды и инкубируют при 37°C в течение 24-72 ч в атмосфере, содержащей 10-20% углекислого газа. Гонококки образуют круглые прозрачные или слегка мутные колонии, напоминающие капли росы. Выделенные чистые культуры идентифицируют по морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. В конце исследования обязательно определяют чувствительность культуры гонококка к пенициллину.

Иммунологические исследования. При диагностике гонорей, как уже говорилось, они самостоятельного значения не имеют. При хроническом течении заболевания и в сомнительных случаях ставят реакцию связывания комплемента (реакция Борде - Жангу) с сывороткой крови больного. В качестве антигена используют взвесь гонококков, убитых формалином.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГАЗОВОЙ ГАНГРЕНЫ И СТОЛБНЯКА

Спорообразующие анаэробы рода *Clostridium* принадлежат к семейству *Bacillaceae* и насчитывают свыше 150 видов. Патогенные кластридии при наличии благоприятных условий способны вызывать у человека газовую гангрену, столбняк, ботулизм, псевдомембранозный энтероколит и другие заболевания, связанные с кластридиальным поражением различных органов и систем.

Возбудителем столбняка является столбнячная палочка (*C. tetani*), а возбудителей газовой гангрены по степени патогенности принято делить на три группы. Первая группа включает наиболее патогенные виды, каждый из которых может самостоятельно вызывать га-

зовую гангрену (*C. novyi*, *C. perfringens*, и *C. septicum*). Во вторую группу входят клостридии, обладающие менее патогенными свойствами (*C. histolyticum*, *C. bifementans*, *C. sporogenes*, *C. fallax*). Каждый из них также способен самостоятельно вызывать газовую гангрену, но чаще они встречаются в ассоциации с другими анаэробами. Третья группа представлена малопатогенными клостридиями, не способными вызывать развитие газовой гангрены, однако, присоединяясь к возбудителям первой или второй группы, они существенно ухудшают течение болезни. К ним относятся *C. tertium*, *C. butyricum*, *C. sordellii* и некоторые другие. Следует иметь в виду, что газовая гангрена - это полимикробное заболевание, в патогенезе которого важную роль играет и сопутствующая микрофлора (стафилококки, стрептококки, энтеробактерии и другие возбудители). Обнаружение патогенных клостридий в раневом отделяемом далеко не всегда свидетельствует о развитии соответствующего заболевания, поэтому правильный этиологический диагноз должен быть основан на совокупности клинических и микробиологических данных.

При развитии газовой гангрены и столбняка бактериологическому исследованию подлежат раневое отделяемое и кусочки пораженных тканей, перевязочный и шовный материал, кровь, секционный материал, при подозрении на столбняк у женщины после родов или аборта - выделения из матки и т.д. Гной при большом его количестве (5-7 мл) транспортируют непосредственно в шприце или помещают в стерильную пробирку. Для взятия материала из глубины раны используют стерильные ватные тампоны. Кусочки некротических тканей и пропитанные раневым отделяемым ватные тампоны немедленно помещают в глубину транспортной питательной среды. Для экспресс-микроскопии исследуемого материала должен быть предусмотрен отдельный ватный тампон, который либо сразу используют для мазков на предметных стеклах, либо помещают в стерильную пробирку для доставки в лабораторию.

Кровь для бактериологического исследования в объеме 5-10 мл забирают из долевой вены стерильным шприцем и засевают непосредственно "у постели больного" таким образом, чтобы соотношение крови и питательной среды было не менее 1:10 - 1:20.

Взятый тем или иным способом патологический материал в течение часа доставляют в бактериологическую лабораторию. Выделение и идентификацию возбудителей анаэробной инфекции осуществляют в три этапа.

На первом этапе исследования производят микроскопично нативного материала, биологическую пробу на лабораторных животных и посев на питательные среды.

Из поступившего материала готовят несколько мазков на предметных стеклах для последующей окраски по Граму (для изучения морфологии и граммпринадлежности бактерий), по Цилю - Нельсену (для обнаружения спор) и по Бурри (для обнаружения капсул). Клостридии представляют собой крупные (0,5-1,5x4-10 мкм) грамположительные палочки, образующие споры круглой или овальной формы. В зависимости от видовой принадлежности бактерий споры могут располагаться в средней части (центрально), ближе к одному из концов (субтерминально) и на самом конце микробной клетки (терминально). Диаметр споры превышает поперечник вегетативной клетки, поэтому палочки выглядят раздутыми и напоминают веретено. Для возбудителей газовой гангрены характерно центральное и субтерминальное расположение спор, а у возбудителя столбняка споры располагаются терминально, что придает бактериям вид барабанных палочек. Абсолютное большинство клостридий подвижны (перитрихи) и не образуют капсул, однако *C. perfringens* неподвижен и обладает хорошо выраженной капсулой, что используется для экспресс-диагностики этой инфекции.

Для постановки биопробы лабораторных животных (морские свинки, белые мыши) заражают взвесью исследуемого материала (0,5-1 мл) в бедро задней лапки. У погибших животных исследуют ткань из места заражения и внутренние органы (кровь из сердца, печень и селезенку). При наличии в исследуемом материале *C. tetani* у животных развивается клиническая картина "восходящего" столбняка: сначала отмечаются ригидность хвоста и паралич лапки, в которую был введен материал; затем развивается паралич задних конечностей и части мышц туловища; наконец, спазм захватывает всю поперечнополосатую мускулатуру, что приводит к искривлению позвоночника и гибели животного.

Поступившие для исследования кусочки тканей и органов переводят в жидкую фазу путем растирания их в стерильной фарфоровой ступке с добавлением СКС для получения 10% суспензии. Подготовленный для посева материал разделяют на две равные части, одну из которых прогревают на водяной бане при 80°C в течение 20-30 мин. Эта процедура позволяет избавиться от находящихся в пробе вегетативных клеток бактерий и существенно упрощает выделение споро-

образующих анаэробов. Исследование гнетого и негетого материала в дальнейшем ведут параллельно.

Для выделения клостридий из нативного материала чаще всего используют анаэробный кровяной агар, СКС, среду Китта - Тароцци, сахарный агар и др.

Целью второго этапа бактериологического исследования является получение изолированных колоний облигатных анаэробов. В зависимости от оснащения бактериологической лаборатории питательными средами, реактивами и оборудованием эта цель достигается с помощью одного из описанных выше методов (см. "Методы создания анаэробных условий"). На анаэробном кровяном агаре клостридии вырастают в виде шероховатых (реже гладких) крупных плоских колоний, имеющих, как правило, зону полного гемолиза и обладающих в большинстве случаев тенденцией к ползучему росту. Некоторые возбудители (*C.tetani*, *C.septicum* и др.) могут вырастать в виде сплошного нежного налета, состоящего из пучков и переплетающихся нитей. Колонии *C.perfringens* могут приобретать на воздухе зеленоватую окраску и обычно окружены двойной зоной гемолиза (полный гемолиз у края колонии и альфа-гемолиз на периферии). В глубине плотной питательной среды клостридии имеют вид дисков, чечевицек, клубочков шерсти, хлопьев и др. При этом многие возбудители газовой гангрены (*C.perfringens*, *C.novy* и др.) вызывают многочисленные разрывы плотной питательной среды за счет интенсивного газообразования.

После посева подозрительных колоний в глубину СКС или среды Китта - Тароцци для защиты от токсического действия кислорода воздуха из них готовят мазки на предметном стекле, окрашивают по Граму, отмечают морфологические особенности бактерий и проверяют чистоту выделенной культуры. Если колония состоит из морфологически однородных микробов, культура считается чистой и подлежит проверке на азотолерантность. С этой целью часть колонии переносят на сектор кровяного агара и инкубируют 24-48 ч при 37°C в аэробных условиях. Облигатные анаэробы не будут давать роста в этих условиях.

На третьем этапе выросшие в СКС или среде Китта - Тароцци микроорганизмы после проверки на чистоту культуры подлежат дальнейшей идентификации. Некоторые биологические свойства возбудителей газовой гангрены и столбняка представлены в табл. 12. Сахаролитические свойства анаэробов проверяют путем посева чис-

Некоторые биологические свойства основных возбудителей газовой гангрены и столбняка

Виды клостридий	Каталаза	Подвижность	Легитиминаза	Индол	Ферментация		
					Лактоза	сахароза	мальтоза
<i>C. jejuni</i>	+	-	+	-	+	+	+
<i>C. tetani</i> тип А	-	+	+	-	-	-	-
<i>C. perfringens</i>	-	+	-	-	+	-	-
<i>C. botuli</i>	-	+	-	+	-	-	-

той культуры на среды "пестрого" ряда, включающего глюкозу, лактозу, галактозу, леулузу, сахарозу, мальтозу, глицерин и некоторые другие углеводы. Протеолитические свойства изучают на питательных средах, содержащих кусочки печени (среда Китта - Тароши) или свернутого куриного белка. Лещитиназную активность клостридий учитывают на желточном агаре. Предварительную идентификацию микроорганизмов проводят на основании анализа комплекса морфологических, культуральных и биохимических свойств.

Окончательная идентификация возбудителей газовой гангрены и столбняка основана на выявлении продукции экзотоксина и его инактивации специфическим антитоксином в реакции нейтрализации на лабораторных животных. Для идентификации токсинов возбудителей газовой гангрены используют поливалентные (содержащие антитоксины против нескольких возбудителей) и моновалентные противогангренозные сыворотки (антиперфрингенс, антисептикум, антигистолитикум и др.). Для обнаружения экзотоксина возбудителя столбнячной инфекции применяют антитоксическую противостолбнячную сыворотку. Содержащий экзотоксин центрифугат чистой культуры возбудителя смешивают в определенной пропорции с разными антитоксическими сыворотками и после 40-минутной экспозиции вводят лабораторным животным. Результаты учитывают через 5-6 ч и окончательно - на 3-4-е сутки. В случае нейтрализации токсина животное остается живым, при отрицательной реакции погибает через 0,5-4 часа после инъекции. Видовую и типовую принадлежность изучаемой культуры устанавливают по нейтрализующему действию гомологичной антитоксической сыворотки.

Методы экспресс-диагностики газовой гангрены основаны на обнаружении *C. perfringens*, что связано с особенностями биологических свойств возбудителя и частым обнаружением его в патологическом материале.

Экспресс-анализ, включающий в себя световую микроскопию, иммунолюминесцентный метод и газовую хроматографию (ГХ), позволяет выдать ориентировочный положительный ответ уже через 1,5-2 ч после поступления материала в лабораторию. Приготовленные из патологического материала мазки окрашивают по Граму и специфической люминесцирующей сывороткой антиперфрингине. При наличии в клиническом материале *C. perfringens* в световом микроскопе обнаруживают крупные грамположительные палочки, окруженные выраженной капсулой. Для выявления подвижности кластридий используют метод "раздавленной" капли (*C. perfringens* в отличие от других кластридий неподвижна). При люминесцентной микроскопии в мазке обнаруживают микробные клетки, флюоресцирующие специфическим желто-зеленым светом. Диагностика кластридиальной инфекции с помощью метода ГХ основана на обнаружении в исследуемом материале летучих жирных кислот (ЛЖК), являющихся специфическими продуктами метаболизма анаэробов (пропионовой, масляной, изокaproновой и др.). Изучение спектра ЛЖК позволяет определить род, а в ряде случаев и вид анаэробных микроорганизмов.

Методы ускоренной диагностики газовой гангрены включают в себя посев нативного материала на среду Вильсона - Блера и лакмусовое молоко.

Посев патологического материала на среду Вильсона - Блера позволяет получить ориентировочный ответ о наличии в исследуемой пробе *C. perfringens* уже через 4-6 ч культивирования при температуре 42°C. Об этом свидетельствует обнаружение почернения питательной среды и появление множественных разрывов агара вследствие интенсивного газообразования. При посеве содержащего *C. perfringens* материала в пробирку с лакмусовым молоком через 2-4 ч культивирования при температуре 42°C в среде наступают характерные изменения: образуются кирпично-красный, пронизанный пузырьками газа творожистый сгусток казеина и прозрачная сыворотка.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ НЕСПОРООБРАЗУЮЩИМИ АНАЭРОБАМИ

Неспорообразующие анаэробы (НОА) представляют собой многочисленную (около 800 видов) группу микроорганизмов, относящихся к различным родам и семействам, характерными признаками которых являются отсутствие спор, чувствительность к токсическому действию кислорода воздуха и сложные питательные потребности.

НОА являются представителями естественной микрофлоры человека и относятся к условно-патогенным возбудителям, болезнетворное действие которых проявляется при создании благоприятных условий (наличие некротизированных тканей, низкий окислительно-восстановительный потенциал, нарушение кровоснабжения и т.д.). Вызываемые ими гнойно-воспалительные заболевания называются неклострициальными анаэробными инфекциями и по тяжести течения могут варьировать от локальных доброкачественных до тяжелых генерализованных форм с летальным исходом. Наибольшее клиническое значение НОА имеют при воспалительных заболеваниях челюстно-лицевой области, легких, органов брюшной полости и в акушерско-гинекологической практике.

Наиболее важные в медицинском отношении НОА относятся к следующим семействам: семейство *Bacteroidaceae* (роды *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* и *Fusobacterium*); семейство *Peptococcaceae* (роды *Peptococcus* и *Peptostreptococcus*); семейство *Actinomycetaceae* (роды *Actinomyces*, *Arachnia* и *Bifidobacterium*); семейство *Lactobacillaceae* (род *Lactobacillus*); семейство *Propionibacteriaceae* (роды *Propionibacterium* и *Eubacterium*); семейство *Veillonellaceae* (род *Veillonella*). Чаще всего гнойно-воспалительные заболевания у человека вызывают анаэробы родов *Bacteroides* (*B. fragilis*), *Prevotella* (*P. melaninogenica*), *Porphyromonas* (*P. saccharolytica*), *Fusobacterium* (*F. nucleatum*), *Peptococcus* (*P. asaccharolyticus*, *P. niger*) и *Peptostreptococcus* (*P. anaerobius*).

Материалами для микробиологического исследования служат кусочки пораженных тканей и отделяемое, полученные из глубины раны, пунктаты из ограниченных очагов воспаления (абсцессов, флегмон, полости суставов и др.). При взятии проб очень важно исключить их контаминацию посторонней микрофлорой. В связи с этим материалы, полученные при бронхоскопии или взятые с поверхнос-

ти ран, а также мокрота, смывы из верхних дыхательных путей, естественно выпущенная моча не подлежат исследованию на анаэробы.

Взятые для исследования образцы должны быть защищены от токсического действия молекулярного кислорода, поэтому при доставке их в лабораторию необходимо соблюдать следующие приемы. При большом количестве гнойного отделяемого (5-7 мл) его можно транспортировать в закрытой резиновой пробкой стерильной пробирке или непосредственно в шприце. При небольшом количестве исследуемого материала его забирают с помощью шприца или стерильного ватного тампона и немедленно помещают в глубину транспортной питательной среды. В некоторых лабораториях для доставки образцов используют пробирки и флаконы, заполненные инертным газом или бескислородной газовой смесью. Кровь для бактериологического исследования в объеме 5-10 мл забирают из локтевой вены стерильным шприцем и засевают в находящуюся во флаконе среду непосредственно "у постели больного" таким образом, чтобы соотношение крови и питательной среды было не менее 1:10-1:20. Сроки оптимальной доставки взятого для исследования материала не должны превышать одного часа.

Выделение и идентификация возбудителей неклостридиальных инфекций

На первом этапе исследования производят микроскопично патологического материала и посев его на питательные среды. Для изучения морфологии, грампринадлежности и количественного соотношения возбудителей приготовленные из патологического материала мазки окрасивают по Граму. Бактерионды, превотеллы, порфиромонады и фузобактерии представляют собой грамотрицательные палочки, нейшеллы - грамотрицательные кокки, лактобактерии, бифидобактерии, арахины, зубактерии, актиномицеты и пропионибактерии - грамположительные плеоморфные палочки, а лептококки и пептострептококки - грамположительные кокки, не отличающиеся по морфологии от стафило- и стрептококков.

Первичный посев содержащего НОА материала производят на неселективные (анаэробный кровяной агар, обогащенная СКС) и селективные (содержащие антибиотики, желчь, налидиксовую кислоту) питательные среды. На неселективных средах наряду с облигатными вырастают и факультативные анаэробы, а селективные среды предназначены для выделения преимущественно анаэробных бак-

терий. Так, например, для селективного выделения *V.fragilis* при смешанных инфекциях используют анаэробный кровяной агар с желчью и капампицином. Инкубацию посевов осуществляют при температуре 37°C в течение 48-72 ч. Сроки культивирования некоторых медленно растущих анаэробов могут составлять 4-7 суток.

Цель второго этапа микробиологической диагностики некластрициальных инфекций состоит в получении изолированных колоний на основании описанных выше методов (см. "Методы выделения чистых культур облигатных анаэробов"). На анаэробном кровяном агаре *V.fragilis* вырастают в виде круглых выпуклых серовато-белых колоний с ровными краями. Для *P.melaninogenica* и *P.saccharolytica* характерно образование коричневого или черного пигмента. Колонии *F.nucleatum* напоминают хлебные крошки или толченое стекло. Анаэробные кокки образуют мелкие выпуклые непрозрачные колонии серовато-белого цвета.

После посева всех разновидностей выросших колоний в глубину СКС для защиты от токсического действия кислорода воздуха из них готовят мазки для последующей окраски по Граму и ставят пробу на аэротолерантность. Облигатные анаэробы дают рост в глубине СКС, но не вырастают на секторах кровяного агара, инкубируемого в аэробных условиях. В ряде случаев для получения чистой культуры анаэробов используют посев изолированных колоний из чашки с анаэробным кровяным агаром с последующим культивированием в анаэроостате.

На третьем этапе чистые культуры анаэробов подлежат дальнейшей идентификации. С этой целью производят изучение их биохимических свойств (определение каталазы, липазы, редукции нитратов в нитриты, гидролизы эскулина, протеолитической и сахаролитической активности и др.) и чувствительности к желчи и некоторым антимикробным препаратам. Для ускоренной биохимической идентификации ИОА используют метод микрокультур в полистироловых планшетах с жидкими дифференциально-диагностическими средами. Принцип метода заключается в посеве больших концентраций чистой культуры анаэробов в лунки планшета, содержащие изучаемые субстраты в объеме 0,1 мл. При этом сроки учета результатов биохимической реакции значительно сокращаются с 18-24 ч до 5-6 ч. Дифференциальные признаки наиболее важных возбудителей некластрициальных инфекций представлены в табл. 13.

**Дифференциальные признаки наиболее важных возбудителей
некlostридиальных инфекций**

Виды анаэробов	Индол	Катаза	Ферментация глицерина	Гидролиз желатина	Устойчивость к желчи	Черный пигмент
<i>Bacteroides fragilis</i>	-	+	+	+	+	-
<i>Prevotella melaninogenica</i>	-	-	+	+	-	+
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	+	-	-	-	-	+
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Peptiostreptococcus asaccharolyticus</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	-	-	+	+	+	-

**Методы ускоренной и экспресс-диагностики вызываемых
НОА инфекций**

Время, необходимое для выделения и окончательной идентификации возбудителей некlostридиальных инфекций, обычно составляет от 5 до 10 суток. Эти сроки не удовлетворяют требований клиницистов, потому что для обоснования тактики проводимого лечения часто необходим немедленный ответ. В связи с этим большое значение приобретают сведения о наличии или отсутствии НОА в клиническом материале. Методы ускоренной и экспресс-диагностики вызываемых НОА гнойно-воспалительных заболеваний включают в себя микроскопию мазков из нативного материала, исследование пробы в ультрафиолетовом свете, иммуно-люминесцентную микроскопию и газовую хроматографию.

При микроскопии окрашенных по Граму мазков из патологического материала бактероиды выглядят как короткие полиморфные граммотрицательные палочки с биполярно окрашенными концами. Для фузобактерий характерен чрезвычайный полиморфизм: обычно это длинные и тонкие граммотрицательные палочки, однако клет-

ки одного вида могут быть представлены кокковидными, палочковидными или нитевидными формами с бульбовидными вздутиями. При наличии в исследуемом образце *F. nucleatum* в мазке обнаруживают тонкие обоюдоострые веретенообразные палочки ("стрелка компаса"), часто располагающиеся сетчатыми скоплениями. Полученные при микроскопии нативного материала данные сравнивают с результатами последующих бактериологических исследований. Обнаружение в мазках микроорганизмов, не выросших в аэробных условиях, косвенно свидетельствует о присутствии в пробе облигатных анаэробов.

Некоторые НОА при облучении длинноволновыми ультрафиолетовыми лучами (люминесцентной микроскоп, лампа Вуда) дают характерную аутофлюоресценцию. Исследования проводят в темной комнате. При наличии в пробе *Prevotella melaninogenica* и *Porphyromonas asaccharolytica* нативный материал и выросшие на анаэробном кровяном агаре колонии светятся красным цветом, а *Fusobacterium nucleatum* дают зеленую флуоресценцию.

Иммуно-люминесцентная микроскопия позволяет получить предварительный положительный ответ уже через 1,5-2 ч после поступления исследуемых образцов в бактериологическую лабораторию. Приготовленные из нативного материала мазки окрашивают по общепринятой методике поли- и моновалентными специфическими люминесцирующими сыворотками против основных возбудителей неклострициальных инфекций.

Метод газовой хроматографии основан на обнаружении летучих жирных кислот (пропионовой, валериановой, капроновой и др.), которые являются специфическими продуктами метаболизма анаэробов. На первом этапе исследования с помощью этого метода устанавливается сам факт наличия НОА в нативном материале. После выделения чистой культуры облигатного анаэроба на основании анализа спектра летучих жирных кислот делают вывод о видовой принадлежности возбудителя.

При работе в полевых условиях можно применять пробирочный метод индикации облигатных анаэробов, не требующий наличия азотистатов и бескислородных газовых смесей. Метод заключается в посеве исследуемого материала в пробирки с селективными питательными средами, приготовленными на основе обогащенной питательной среды для контроля стерильности (ОСКС): ОСКС с гентамицином, ОСКС с клинамицином и желчью и ОСКС с гентамицином и мет-

ронидазолом. После инкубации посевов в термостате при 37°C в течение 24-48 ч регистрируют наличие в посевах микробного роста и его характер (в верхнем слое, нижнем слое или по всему столбику среды). При появлении видимого роста из каждой пробирки делают мазки на предметном стекле и производят высев на чашку с кровяным агаром, которую инкубируют в аэробных условиях в течение 18-24 ч. При обнаружении в пробирках микроорганизмов, не растущих при последующих высевах на кровяной агар, делают вывод о наличии в исследуемой пробе облигатных анаэробов. При этом обнаружение микробного роста в нижней части пробирки с желчью и каминацином свидетельствует о наличии в пробе анаэробов группы *V. fragilis*. Если рост на этой питательной среде отсутствует, делают вывод о наличии в пробе прочих анаэробов.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МИКОЗОВ

Заболевания, вызываемые грибами, - микозы - чрезвычайно разнообразны как по биологическим особенностям их возбудителей, так и по патогенезу и клиническим проявлениям. Все известные микозы можно подразделять на две группы: 1) микозы, возбудители которых абсолютно патогенны для человека (дерматофитии, криптококкоз, гистоплазмоз, кокцидиоз и др.); и 2) микозы, вызванные условно патогенными грибами (так называемые оппортунистические микозы - кандидоз, плесневые микозы). В зависимости от локализации очагов поражения принято говорить о поверхностных или глубоких (висцеральных) микозах, но следует помнить, что деление это во многом условно.

Грибы (*Fungi*) - особая группа эукариотических организмов, характеризующихся множеством свойств, отличающих их от бактерий. Среди грибов, имеющих медицинское значение, встречаются одно-клеточные и мицелиальные, т.е. состоящие из длинных нитей, или гиф, разделенных или не разделенных на отдельные клетки.

Микозы, как правило, не имеют каких-либо специфических клинических признаков, в то же время их лечение требует особого подхода. Именно поэтому в диагностике микозов важную роль играют лабораторные исследования. В микробиологической диагностике микозов особое место занимают микроскопический и микологический методы. Иммунологические исследования и аллергические пробы разработаны не для всех микозов и самостоятельного значения

не имеют, так как, с одной стороны, аллергены, полученные из грибов, недостаточно специфичны, а с другой - микозы часто развиваются на фоне иммунодепрессии, в связи с чем специфический иммунный ответ имеет неадекватный характер.

Материал для исследования берут в зависимости от характера и локализации поражения. Это могут быть кусочки ногтей и волос, соскобы с кожи и слизистых, биоптаты, гной, мокрота, моча, испражнения, ликвор, кровь больного.

Способ микроскопического исследования зависит от исследуемого материала. Из прозрачных образцов (ликвора, мочи) сразу же готовят препарат "раздавленная капля", используя для суспендирования смесь спирта с глицерином (1:1). Кожные и ногтевые чешуйки, волосы предварительно просветляют 10-30% раствором КОН. Кровь микроскопируют в "толстой капле", мокроту и гной - в мазке. Из кусочков тканей готовят мазки-отпечатки или гистологические препараты. Испражнения не микроскопируют. В большинстве случаев препараты не окрашивают. В то же время мазки, изготовленные из мокроты, крови, гноя, а также мазки-отпечатки из тканей и гистологические препараты окрашивают по Граму, Романовскому или иным способом, способствующим контрастированию элементов гриба. Все препараты микроскопируют при увеличении объектива в 40 раз.

Следует иметь в виду, что многие грибы диморфны, т.е. имеют различное строение в паразитической и сапрофитической фазах своего существования (грибы рр. *Candida*, дерматофиты, возбудители особо опасных микозов и т.д.). Диагностически значимым является обнаружение тканевой формы грибов. Если тканевая форма имеет характерное строение, то в этом случае можно ставить окончательный диагноз.

Так при микроскопии пораженных фавусом волос обнаруживают специфическую для этого заболевания картину: внутри волоса наряду с тонким мицелием встречается мицелий широкий, состоящий из прямоугольных клеток, а также скопления круглых или прямоугольных спор, пузырьков воздуха и капелек жира.

Trichophyton violaceum и *T. tonsurans* поражают волосы по типу "эндотрикс", т.е. элементы гриба, в основном споры, цепочками располагаются внутри волоса. В то же время при трихофитии, обусловленной *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*, вариант *gypseum*, споры грибов располагаются как внутри, так и снаружи волоса - поражение по типу "экзотрикс".

Споры возбудителей микроспории также поражают волосы по

типу "эктотрикс", но в этом случае они располагаются хаотично и пеньки не образуют.

В чешуйках кожи и ногтей можно обнаружить ветвящийся или артросторовый мицелий, что является свидетельством грибкового поражения. Но определить не только видовую, но и родовую принадлежность возбудителя в данном случае невозможно.

Обнаружение псевдомицелия однозначно указывает на развитие у больного кандидоза.

При нехарактерности явления диморфизма (например, для плесневых грибов) диагностически значимым можно считать обнаружение гриба при микроскопии лишь материала, не сообщившегося с внешней средой (ликвора, крови, гноя из закрытых абсцессов).

Во всех случаях грибкового поражения вид гриба уточняется только после посева на питательные среды.

В процессе *культуральной диагностики* исследуемый материал засевают на обогащающие углеводами среды, содержащие противобактериальные антибиотики. Универсальными могут считаться среда Сабуро и сусло-агар, плесневые грибы хорошо растут на среде Чапека - Докса. Посевы инкубируют при 37°C или при 22-27°C, причем в первом случае хорошо развиваются дрожжеподобные грибы, во втором - мицелиальные. При диагностике оппортунистических микозов производят количественный посев. Время инкубирования грибов варьирует. Так, грибы рода *Candida* формируют колонии в течение 2 суток, плесневые грибы - 4-7, дерматофиты - за 2-4 недели.

При идентификации грибов учитывают внешний вид колоний, чрезвычайно разнообразных как по форме и характеру поверхности, так и по цвету. Кроме того, при микроскопии препаратов, приготовленных из культур, исследуют строение составляющих их элементов, учитывая все их разнообразие: форму и размер клеток, ветвление мицелия, наличие и вид спор. Для определения вида грибов р. *Candida* и р. *Streptococcus* необходимо изучение их биохимических свойств.

На этом этапе, как правило, заканчивается лабораторная диагностика микозов, вызванных абсолютно патогенными грибами. В случае же выделения от больших культур условно патогенных грибов необходимо подтвердить наличие патологического процесса, дифференцировав его от возможного носительства. Таким подтверждением может быть обнаружение тканевой формы (у диморфных грибов), или определение диагностически значимых титров специфических антител.

Иммунологические исследования особенно важны при диагностике висцеральных микозов. Титры антител определяют при помощи МФА, РИГА, ИФМА. Сложность состоит в отсутствии стандартных антигенов многих грибов. Следует иметь в виду также то обстоятельство, что причиной возникновения оппортунистических микозов может быть иммунодепрессия, что затрудняет трактовку результатов.

Аллергические пробы выявляют характер сенсибилизации организма больных, что имеет значение для разработки правильной тактики лечения. Но применение аллергических проб ограничено в связи с отсутствием стандартных антигенов.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ГНОЙНО-СЕПТИЧЕСКИХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫМИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЯМИ

В настоящий период повсеместно определена ведущая роль в этиологии гнойно-септических инфекций грамотрицательных бактерий, преимущественно энтеробактерий и псевдомонд. Семейство энтеробактерий весьма обширно - 30 родов и более 100 видов. Среди клинических изолятов энтеробактерий, выделенных при гнойно-септических заболеваниях, наиболее частыми (более 80% изолятов) являются три вида: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Proteus mirabilis* - так называемые "проблемные бактерии". Около 20% изолятов составляют представители 23 видов из родов *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Edwardsiella*. На долю остальных 1% изолятов приходится десятки видов прочих энтеробактерий. Подробная характеристика свойств энтеробактерий представлена в учебном пособии: Сиволодский Е.П. "Систематика и идентификация энтеробактерий". СПб., 1994.

Бактериологическое исследование

1 этап: отбор и доставка материала, микроскопия нативного материала, первичный посев на питательные среды. Материалом для микробиологической диагностики гнойно-септических заболеваний служат соответственно локализации инфекционного процесса кровь, гной, отделяемое ран, экссудаты, пунктаты, мокрота; слизь из зева, носа, уха; моча, желчь, ликвор, отделяемое половых органов; кусочки тка-

ней, взятых при операциях и на секции. Берут клинический материал до начала антибактериальной терапии, соблюдая правила асептики.

Венозную кровь в объеме 8-10 мл вносят, прокалывая пробку (предварительно обработанную 70% этиловым спиртом), в герметизированный (завальцованный) флакон, содержащий 80-100 мл питательной среды "СКС-199". Оставшуюся в шприце кровь используют для приготовления мазков.

Гной помещают в пробирку со средой "СКС-199" или, при обильном его количестве, - в герметичную пробирку.

Отделяемое ран, свищей после очистки их поверхности от некротических масс отбирают ватным тампоном, который сразу помещают в среду "СКС-199", или через дренажные трубки стерильным шприцем.

Биоптаты массой не менее 0,5-1,0 г берут из глубины раны с помощью стерильного скальпеля и сразу помещают в пробирку со средой "СКС-199".

Мочу собирают в стерильный флакон (20-30 мл). Ликвор в объеме 3-5 мл помещают в стерильную пробирку, желчь берут при дуоденальном зондировании и помещают отдельно в пробирки порции А, В, С. Мокроту собирают в отдельные флаконы. Слизь из зева, носа, уха, отделяемое половых органов отбирают ватным тампоном, который помещают в пробирку со средой "СКС-199".

Материал доставляют в лабораторию не позже 2 ч, сохраняя его при комнатной температуре или 37°C. Соблюдение указанных условий отбора и доставки материала позволяет сохранить аэробную и анаэробную микрофлору в жизнеспособном состоянии.

Микроскопия нативного материала проводится в целях оперативного получения информации об интенсивности микробного обсеменения проб и соотношения различной микрофлоры. Мазки окрашивают по Граму. При микроскопии обращают внимание на соотношение грамотрицательных и грамположительных бактерий, их форму, споры, капсулы; выраженность фагоцитоза. Энтеробактерии - грамотрицательные палочки, у некоторых видов - с капсулой. Результаты микроскопии сопоставляют в дальнейшем с данными выделения культур на питательных средах.

Первичный посев материала на питательные среды проводят на комплекс универсальных сред, предназначенных для выделения не только энтеробактерий, но и других аэробных и анаэробных бактерий (5% кровяной агар, среды для анаэробов). При целенаправленном исследовании на энтеробактерии используются селективные

плотные среды Эндо, агар с эозин-метиленовым синим (Левина), "Клебсиелла 5-АСК", "Протеус ППМ". Жидкие патологические материалы (гнои, раневое отделяемое, суспензии 10% биоптатов, мочу, гомогенизированную мокроту и др.) засевают на плотные питательные среды для полуколичественного определения концентрации бактерий (в 1 мл или 1 г) методом секторных посевов стандартной (диаметр 3 мм) бактериологической петлей.

Чашки с посевами на 5% кровяном агаре и селективных средах инкубируют при 37°C в течение 24-48 ч. Оставшиеся после посевов материалы в транспортной среде "СКС-199" используют для накопления возбудителей при 37°C. Высев со среды "СКС-199" с посевом крови производят при появлении помутнения среды на чашку с 5% кровяным агаром; при отсутствии признаков роста делают высев со среды "СКС-199" после 10 дней инкубации и инкубируют посевы крови до 6 недель.

План: выделение чистых культур и их первичная дифференциация. Изучают культуральные свойства и морфологию бактерий у всех разновидностей колоний, выросших на средах первичного посева; определяют количество разновидностей бактерий в 1 мл (г) исследуемого материала. На 5% кровяном агаре энтеробактерии формируют колонии средней величины, круглые, влажные, иногда шероховатые, преимущественно без гемолиза; некоторые штаммы *Settia paucescens* имеют красный пигмент; бактерии рода *Proteus* обладают ползучим ростом. На среде Эндо лактозопозитивные энтеробактерии (*E. coli* и др.) образуют колонии, окрашенные в красный цвет, лактозонегативные - бесцветные, мутные или прозрачные колонии. На агаре с эозин-метиленовым синим колонии лактозопозитивных энтеробактерий - темно-фиолетовой окраски, а лактозонегативных - бесцветные, прозрачные или мутные. Наличие на среде "Клебсиелла 5-АСК" колоний, окруженных темно-коричневой зоной среды, указывает на их принадлежность к бактериям рода *Klebsiella*, так как эта цветная реакция специфична для клебсиелл. Появление на среде "Протеус ППМ" колоний, окруженных темно-коричневой зоной среды, указывает на наличие у бактерий триптофандезаминазы и принадлежность бактерий к родам *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*.

Для накопления необходимой для идентификации чистой культуры бактерий засевают часть испытуемых и изолированных колоний со среды первичного посева на сектор питательного агара в чашке Петри (1/4 или 1/6 часть чашки) или сектор желчного агара (содержащий ингибитор роста протей). Оставшуюся часть колоний отсевают на

среду Хью - Лейфсона с глюкозой (или среду Клиглера, Олькеницкого). Посевы инкубируют при 37°C в течение 18-24 ч.

Проводят первичную дифференциацию чистых культур бактерий с секторов питательного агара на принадлежность к семейству энтеробактерий тестами на цитохромоксидазу, отношение к окраске по Граму, ферментацию и окисление глюкозы в O/F тесте.

Определение цитохромоксидазы по Ковачу. На поверхность стеклянной или полимерной чашки Петри наносят каплю 1% водного раствора диметилпарафенилендиамина. Набирают запятым изогнутым концом пастеровской пипетки часть газона испытуемой культуры (петлю из нихромовой проволоки применить нельзя) и помещают на сухую поверхность чашки рядом с каплей реактива. Перемещают этой же пастеровской пипеткой каплю реактива на комочек бактерий. Через 1 мин учитывают результат. При отсутствии цитохромоксидазы окраска бактерий не изменяется, при ее наличии бактерии окрашиваются в красный цвет.

Определение отношения культуры к окраске по Граму. С этой целью используют метод "тяжка". На поверхность стеклянной чашки Петри наносят каплю 3% раствора КОН, вносят в нее полную петлю последующей культуры, растирают культуру в капле, периодически поднимая петлю. Культура является грамотрицательной, если за ней тянется нить слизи. При нечетких результатах целесообразно окрасить бактерии по методу Грама.

Определение ферментации и окисления глюкозы методом O/F теста. Учитывают результаты роста на среде Хью - Лейфсона с глюкозой: при посеве в одну пробирку пожелтение среды на всю глубину столбика указывает на ферментацию; пожелтение среды только в поверхностном слое столбика - на окисление, отсутствие окраски среды - на отсутствие ферментации и окисления глюкозы. Если не проводился посев на среду Хью - Лейфсона, можно определить ферментацию глюкозы экспрессно-микрообъемным методом. В лунку планшета вносят 0,1 мл фосфатно-буферной среды с глюкозой и индикатором. Затем вносят в лунку со средой полную петлю последующей агаровой культуры бактерий, перемешивают, инкубируют при 37°C. Через час учитывают результат: изменение исходного красного цвета среды на желтый указывает на ферментацию глюкозы. Контроль - та же среда без посева бактерий.

Дальнейшей идентификации подлежат культуры грамотрицательных, оксиданзонегативных, ферментирующих глюкозу бактерий.

III этап: идентификация чистых культур, определение чувствительности культур к антибиотикам, выдача ответа при использовании ускоренной микрообъемной биохимической идентификации культур; проведение при необходимости дополнительных исследований. В соответствии с методическими указаниями ГВМУ МО РФ (1991 и 1996 гг.) для идентификации энтеробактерий используют систему ускоренной биохимической идентификации бактерий на основе микрообъемного метода с жидкими дифференциальными средами в планшетах, разработанную на кафедре микробиологии в Военно-медицинской академии (Сиволодский Е.П., Луканов Н.А. 1984). Система включает 12 тестов и 3 предварительных экспрессных теста, позволяет идентифицировать в течение 5 ч 99% изолятов энтеробактерий при гнойно-септических инфекциях.

Дифференциальные среды системы вносят в планшеты стерильными пипетками в день исследования по 0,1 мл в лунку. Среда для одной культуры размещают в одном горизонтальном ряду лунок, желательно в постоянной последовательности: на уреазу, триптофандезаминазу, индол, лизиндекарбоксилазу, ацетон, сероводород, ферментацию лактозы, сахарозы, манниту, сорбита, арабинозы, адонита. Количество планшетов со средами соответствует предполагаемому количеству анализов. Суточную агаровую культуру изучаемых бактерий вносят по полной петле в каждую лунку со средой и тщательно размешивают. Петлю прожигают только в начале и конце посева на весь ряд. На поверхность сред с мочевиной и аминокислотами (лизинном) наносят после посева бактерий по 2 капли стерильного вазелинового масла. В один горизонтальный ряд сред культуру не вносят (контроль сред). Планшеты закрывают крышками и инкубируют при 37°C. Предварительный учет результатов на среде с мочевиной проводят через 2 мин и 1 ч, на среде с лизинном - через 2 ч. Через 4 ч добавляют реактивы на ацетон в лунку со средой Кларка (0,05 мл 12% спиртового альфа-нафтола и 0,05 мл 40% раствора КОН) и вновь помещают планшет в термостат на 1 ч. Через 5 ч после посева окончательно учитывают результаты: наличие уреазы - по переходу исходной желтой окраски в малиновую; наличие триптофандезаминазы - по появлению темно-коричневого (красно-бурого) окрашивания через 1-2 мин после внесения 1 капли реактива с хлорным железом; образование индола - по появлению красного кольца на поверхности среды через 1-2 мин после внесения 1 капли реактива Ковача; наличие лизиндекарбоксилазы - по переходу желтого цвета среды в зеленый или синий; образование сероводорода - по появлению

черного осадка на две луночки; ферментацию углеводов и спиртов - по переходу исходного цвета среды в желтый; наличие ацетона - по появлению красного (розового) окрашивания среды Кларка.

Идентификацию вида (рода) исследуемых бактерий проводят по таблице дифференциальных признаков энтеробактерий (табл. 14). Тест-система позволяет идентифицировать через 5 ч 19 видов энтеробактерий и до уровня рода *Enterobacter*, *Shigella*, *Salmonella*. Дальнейшая видовая идентификация шигелл и сальмонелл проводится при необходимости в реакции агглютинации с соответствующими сыворотками. Видовая идентификация весьма известных видов *Enterobacter* может быть проведена дополнительными микрообъемными тестами (на аргининдигидролазу, орнитиндекарбоксилазу, ферментацию дульцита и рафинозы), но с учетом результатов через 24 ч. Чувствительность выделенных культур к антибиотикам определяют диск-диффузионным методом по унифицированной методике.

Этиологическую значимость выделенных условно патогенных энтеробактерий определяют исходя из источника их выделения и концентрации в материале. Имеют этиологическую значимость при любой концентрации бактерии, изолированные из крови, ликвора, плеврального экссудата, закрытых полостей. Этиологически значимы энтеробактерии, выделенные из ран в концентрации 10^5 КОЕ/мл, из мочи при концентрации 10^4 КОЕ/мл, из мокроты при концентрации 10^6 КОЕ/мл, из трахеобронхиальных смывов в концентрации 10^4 КОЕ/мл. При выдаче ответа указывают концентрацию бактерий в исследуемом материале.

Кроме указанной тест-системы для биохимической идентификации энтеробактерий могут быть использованы коммерческие отечественные тест-системы (ПБДЕ, ММТЕ1, Е2), зарубежные тест-системы и автоматизированные бактериологические анализаторы.

IV этап: завершение идентификации культур со сред накопления или при использовании дополнительных тестов, выдача ответа о чувствительности бактерий к антибиотикам. Идентификацию культур, выделенных после подрастворивания на среде накопления СКС-199 (посев крови), проводят микрообъемным методом по методике III этапа. Через 24 ч после испытания выдают ответ о чувствительности бактерий к антибиотикам.

Таким образом, окончательный ответ о выделении и идентификации условно патогенных энтеробактерий при гнойно-септических заболеваниях выдают через 48-72 ч после начала исследования.

Питательные среды для исследований на условно патогенные энтеробактерии

Среда "СКС-199". Растворяют 33 г среды для контроля стерильности (СКС) в 1 л дистиллированной воды, стерилизуют при 120°C 20 мин. Затем в стерильных условиях к 900 мл свежеприготовленной СКС добавляют 100 мл среды 199 для культур клеток, размешивают, разливают в пробирки по 10-12 мл. Хранят среду при 4°C, используют без последующей стерилизации. Среда предназначена для транспортировки и культивирования аэробных и анаэробных бактерий.

Агар Эндо. Сухая среда. Приготовление по указанию на этикетке. Предназначена для культивирования энтеробактерий.

Агар с золотисто-зеленым сиянием (Левина). Сухая среда. Приготовление по указанию на этикетке. Предназначена для культивирования энтеробактерий.

Среда "Клейбелла 5-АСК" (по Сиволодскому Е.П., 1988). Состав среды (г/л): сухой питательный агар из рыбного гидролизата - 32-35, L-арабиноза - 8-12, бромтимоловый синий - 0,06-0,08; 5-аминосалициловая кислота (5-АСК) - 4,5-5,5, дистиллированная вода - 1 л, 1N раствор NaOH - до установления pH 6,8-7,2. Приготовление среды: в колбу с 200 мл расплавленного стерильного питательного агара вносят 1 г 5-АСК, 2 г L-арабинозы; 0,8 мл 1,6% спиртового раствора бромтимолового синего, перемешивают, добавляют 1N раствор NaOH (около 6 мл) до появления зеленой окраски среды, соответствующей pH - 6,8-7,2; разливают среду в стерильные чашки Петри. Среда зеленого цвета, прозрачная, пригодна к использованию в течение 5 суток (температура при хранении 4°C).

Порядок использования среды: исследуемый клинический материал засевают петлей или катком тампоном на поверхность среды (можно делать посев на 1/4 чашки), инкубируют чашки при 37°C 20-24 ч, после чего одновременно идентифицируют бактерии рода *Klebsiella* по наличию зон черно-коричневой окраски вокруг выросших колоний.

Среда "Протеус-ПММ" (по Сиволодскому Е.П., 1991). Состав среды (г/л): сухой питательный агар из рыбного гидролизата - 36; L-триптофан - 1; хлорное железо ($FeCl_2 \cdot H_2O$) - 0,8; сульфопол - 1,6; вода дистиллированная - до 1 л, pH 6,8-7,2. Вместо сульфопола можно использовать желчь (нативную 100-150 мл/л). Приготовление среды: в колбу с 200 мл стерильного расплавленного агара вносят 0,2 г L-триптофана, кипятят до его растворения, добавляют 0,9 мл 40% раствора сульфопола и 1,6 мл водного раствора хлорного железа, раз-

ливают среду в стерильные чашки Петри. Среда светло-серого цвета, непрозрачная, пригодна 7 суток при 4°C. Использование среды: исследуемый клинический материал засевают петлей или ватным тампоном на поверхность среды (можно засеять на 1/4 чашки), инкубируют при 37°C 20-24 ч, после чего идентифицируют бактерии группы протей, провиденция, морганелла по наличию зон темно-коричневой окраски вокруг выросших колоний.

Среда Китглера. Сухая среда. Приготовление по указанию на этикетке. Предназначена для идентификации энтеробактерий.

Среда Олькеницкого (в модификации без сахарозы). Расплавляют 25 г сухого питательного агара из рыбного гидролизата в 1 л дистиллированной воды и остужают до 50°C. Затем вносят 10 г лактозы, 0,2 г соли Мора, 0,5 г гипосульфита, 1 г глюкозы, 10 г мочевины. Соль Мора, гипосульфит, углеводы, мочевину предварительно растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды. Все ингредиенты перемешивают с агаром, фильтруют через стерильную марлю, устанавливают pH 7,2-7,4, добавляют 4 мл 0,4% водно-щелочного раствора фенолового красного, разливают в стерильные пробирки. Стерилизуют при 112°C 20 мин. Схищивают в виде "скошенного столбика".

Среды и реактивы для системы ускоренной микрообъемной биохимической идентификации энтеробактерий (по Сиволодскому Е.П., Лукапову Н.А., 1984)

Фосфатные буферные основы сред. Предварительно готовят фосфатные буферы (pH - 7,0 и 7,6) и раствор индикатора (0,4% водно-щелочной раствор фенолового красного). Для этого в отдельных колбах готовят 1/15 молярные растворы KH_2PO_4 (9,078 г на 1 л дистиллированной воды) и $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (11,876 г на 1 л дистиллированной воды). Фосфатные буферы с определенным pH получают при смешивании указанных растворов в отдельной колбе в следующей пропорции: фосфатный буфер pH 7,0: Na_2HPO_4 - 6 частей, KH_2PO_4 - 4 части. Фосфатный буфер pH 7,6: Na_2HPO_4 - 8,5 части, KH_2PO_4 - 1,5 части. При необходимости корректируют pH изменением соотношения фосфатов. Раствор индикатора готовят, перетирая в агатовой ступке 0,1 г порошка фенолового красного в 5,7 мл 0,2% раствора едкого натра с последующим добавлением дистиллированной воды до 25 мл. "Фосфатную буферную основу pH 7,6" готовят, смешивая во флаконе емкостью 500 мл: фосфатный буфер pH

7,6 - 100 мл; хлорид натрия - 2,5 г; 0,4% водно-щелочной раствор фенолового красного - 2,5 мл; воду дистиллированную - до 500 мл. "Фосфатную буферную основу рН 7,0" готовят таким же образом, используя фосфатный буфер рН-7,0. Флаконы закрывают резиновыми пробками с алюминиевыми колпачками, стерилизуют при 120°С 30 мин. Стерильные буферные основы сред могут храниться до 5 лет.

Основа для сред с аминокислотами. Во флакон емкостью 500 мл вносят: пептон сухой ферментативный - 0,5 г; хлорид натрия - 1,5 г; магний сернокислый - 0,05 г; калий фосфорнокислый однозамещенный - 0,75 г; никотиновую кислоту - 0,1 г; витамин В₆ - 0,05 г; мясную воду - 25 мл; 1,6% спиртовой раствор бромтимолового синего - 2,5 мл; воду дистиллированную - до 500 мл; рН - 6,0. Флакон закрывают резиновой пробкой с алюминиевым колпачком, стерилизуют при 120°С 30 мин. Срок хранения до 5 лет.

Среды для определения ферментации углеводов и спиртов. Вносят в стерильные флаконы (колбы) определенные объемы (25-50 мл) стерильной "фосфатной буферной основы рН 7,6" и добавляют по одному виду углеводов (спиртов) в виде навесок порошков препаратов в следующем количестве: лактоза, сахароза - 4%; маннит, сорбит, арабиноза - 3%; прочие - 1%. Среды используются без повторной стерилизации, хранятся при 4°С до 2 месяцев.

Среды для определения уреазы. Вносят в стерильный флакон (колбу) 50 мл стерильной "фосфатной буферной основы рН 7,0" и добавляют 1 мл 50% водного раствора мочевины (50% раствор мочевины самостерилизуется). Среду с мочевиной используют без повторной стерилизации, сохраняя при 4°С до 2 месяцев.

Среды для определения ферментации аминокислот (лизина, орнитина, аргинина). Вносят в стерильные флаконы (колбы) определенные объемы (25-50 мл) стерильной "основы для сред с аминокислотами" и добавляют по одной из аминокислот: L-лизин, L-аргинин, L-орнитин в количестве 1%. Среды используют без повторной стерилизации. Срок хранения до 2 месяцев.

Среды для определения триптофандезаминиты и индола. Состав: пептон сухой ферментативный - 5 г; хлорид натрия - 2,5 г; L-триптофан - 2,5 г; вода дистиллированная - до 500 мл. Стерилизовать при 120°С 30 мин. Срок хранения стерильной среды до 5 лет.

Среды для выявления сероводорода. Состав: соль Мора - 0,2 г; гипосульфит - 0,3 г; бульон из рыбного гидролизата - до 500 мл. Стерилизовать при 120°С 30 мин. Срок хранения стерильной среды до 5 лет.

Среда Кларка для выявления ацетона реакцией Фоггса - Проскауэра. Состав: пептон сухой ферментативный - 7,5 г; глюкозы - 5 г; калий фосфорнокислый двузамещенный - 5 г; вода дистиллированная - до 500 мл. Стерилизовать при 112°C 20 мин. Срок хранения стерильной среды до 5 лет.

Среда для ферментации глюкозы микрообъемным методом. Вносят в стерильный флакон (колбу) 50 мл стерильной фосфатной буферной основы рН 7,6 и добавляют 0,5 г Д-глюкозы. Среда используется без повторной стерилизации, хранится при 4°C до двух месяцев.

Реакция на индол (реакция Ковача). Состав: парадиметиланинобензальдегид - 5 г; амидовый спирт - 75 мл; кислота соляная концентрированная - 25 мл. Растворить альдегид в спирте, затем медленно добавить кислоту. Хранить в темном флаконе с притертой пробкой. Срок хранения до 3 лет.

Реактив на триптофандегидрогеназу. Состав: 50 мл 10% водного раствора хлорного железа (FeCl₃) и 50 мл 10% раствора соляной кислоты, совмещенные в одном флаконе. Срок хранения до 3 лет.

Реакция на цитохромоксидазу по Ковачу. Состав: 1% водный раствор диметилпарафенилендиамина. Срок хранения 24-48 ч.

Реактив на ацетон (реакцию Фоггса - Проскауэра). Реактив №1: 40% водный раствор КОН (годен до 1 года). Реактив №2: 12% спиртовой раствор -нафтаола (годен до 3 суток).

Реактив для теста "тмса". Состав: 3% водный раствор КОН. Срок годности 1 неделя.

Пластины для иммунологических реакций однократного применения. Стерильный полнетиотловый планшет с крышкой в герметической упаковке, имеет 96 лунок объемом 0,25 мл (8 горизонтальных рядов по 12 лунок), используется однократно. Предназначен для постановки биохимических тестов идентификации бактерий микрообъемным методом.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЭНТЕРОКОККОВЫХ ИНФЕКЦИЙ

Род *Enterococcus* состоит из 13 видов бактерий, способных вызывать гнойно-воспалительные заболевания органов пищеварения (энтероколит, холецистит, панкреатит), перитонит, урологические и раневые инфекции, эндокардит, остеомиелит, отит, менингит и сепсис. Главную роль в этиологии этих заболеваний играют *E. faecalis* и *E. faecium*.

В зависимости от локализации патологического процесса в качестве исследуемого материала используют раневое отделяемое, тка-

венные биоптаты, кровь, спинномозговую жидкость, желчь, фекалии и т.д. Для забора проб используют стерильные пробирки и флаконы, шприцы и другие приспособления. Материал, взятый с помощью указанных приспособлений, помещают в пробирку с транспортной питательной средой для контроля стерильности (СКС). При подозрении на бактериальную инфекцию посевают кровь с соблюдением правил асептики непосредственно "у постели больного" в питательную среду на основе СКС. Сроки доставки проб в микробиологическую лабораторию не должны превышать двух часов.

Бактериологическую диагностику энтерококковых инфекций осуществляют в три этапа.

На первом этапе из взятого для исследования материала готовят мазки на предметных стеклах с последующей окраской по Граму.

Энтерококки представляют собой слегка удлинённые грамположительные кокки диаметром 0,5 - 1 мкм, которые чаще всего располагаются в парах и коротких цепочках. При подозрении на энтерококковую инфекцию посев материала производят на неселективные (кровяной агар, сахарный бульон) и селективные (кровяной агар с добавлением изида натрия, канамицина, палимпиксина, палидиксониновой кислоты и др.) питательные среды. Инкубацию посева осуществляют при температуре 37°C в течение 24-48 ч.

На втором этапе исследования просматривают посева, выросшие на плотных и жидких питательных средах. На кровяном агаре энтерококки образуют мелкие или средних размеров альфа- или гамма-гемолитические колонии серовато-белого цвета. Исключение составляют *E. durans* и *E. faecalis* subsр. *zymogenes*, для которых характерна бета-гемолитическая реакция. Отрицательной особенностью *E. mundtii* и *E. casseliflavus* является способность к образованию желтого пигмента. На жидких питательных средах энтерококки дают интенсивный рост и вызывают их равномерное помутнение. Для проверки однородности выросшей колонии из небольшой ее части готовят мазок и окрашивают по Граму. При наличии в мазке характерных грамположительных кокков оставшуюся часть колонии засевают в сахарный бульон (мисо-пептонный бульон, содержащий 0,2% глюкозы) и на сектор кровяного агара в чашке Петри для накопления чистой культуры.

На третьем этапе микробиологического исследования проводят окончательную идентификацию возбудителя и определяют его чувствительности к антибиотикам.

После проверки чистоты выделенной культуры методом микроскопии определяют принадлежность ее к роду *Enterococcus*. С этой целью производят посев в молоко с 0,1 % метиленового синего и на чашку с желчно-щелочным агаром (ЖЩА). Энтерококки редуцируют метиленовый синий, вследствие чего уже через 16-20 ч инкубации при температуре 37°C цвет среды меняется с голубого на кремовый. На ЖЩА растут только энтерококки, колонии которых могут появляться лишь на третьей сутки после посева. Для дифференциации энтерококков от стафилококков ставят пробу на каталазу (энтерококки каталазоотрицательны).

В связи с тем, что наибольшее значение в этиологии энтерококковых инфекций имеют только два вида (*E. faecalis* и *E. faecium*), дальнейшая идентификация возбудителей проводится по упрощенной схеме (табл. 15). С этой целью производят посев выделенных культур на энтерококковую дифференциально-диагностическую среду (ЭДДС), сахарно-дрожжевой агар с теллуридом калия и в полужидкий агар для определения подвижности.

Таблица 15

Дифференциальные свойства основных возбудителей энтерококковых инфекций

Виды и подвиды энтерококков	Результативность к теллуриду калия	Энтерококковая дифференциально-диагностическая среда			Подвижность
		редуцирует ТТХ	гемолит	каталаза	
<i>S. faecalis</i>	+	+	-	-	-
<i>S. faecalis</i> subsp. <i>cytogenes</i>	+	+	+	=	-
<i>S. faecalis</i> subsp. <i>herbaceus</i>	+	+	-	+	-
<i>S. faecium</i>	-	-	=	-	-
Подвижные энтерококки	+	+	=	-	+

На чашке со средой ЭДДС определяют одновременно несколько признаков: гемолитическую активность, редукцию трифенилтетразоля хлорида (ТТХ) и способность к протеолизу. При наличии гемолитически активных штаммов энтерококков вокруг выросших колоний появляются белые зоны, соответствующие цвету молочного агара; протеолитически активные штаммы образуют колонии с четко выраженными темно-красными или бурыми зонами; у штаммов, обладающих как гемолитической, так и протеолитической активностью, среда вокруг колоний просветляется и приобретает вид обычного питатель-

ного агара; при росте негемолитических и непротеолитических штаммов энтерококков цвет питательной среды не меняется. Редуцирующие ТГХ штаммы энтерококков растут в виде вишнево-красных колоний с белыми ободками, а не способные восстанавливать ТГХ *E. faecium* образуют бесцветные или окрашенные в слабо-розовый цвет колонии. Обладающие слабой редуцирующей активностью подвижные энтерококки (*E. gallinarum* и *E. casseliflavus*) дают на ЭДС карлковые колонии розовых оттенков разной интенсивности.

На сахарно-дрожжевом агаре растут восстанавливающие теллурит калия штаммы *E. faecalis* и подвижные энтерококки, образуя колонии черного цвета, окруженные бесцветным узким ободком. В пробирке с полужидким (0,2%) агаром подвижные энтерококки вызывают диффузное помутнение всего столбика питательной среды, в то время как неподвижные виды растут только по ходу укола.

Антигенная дифференциация энтерококков основана на определении группоспецифического полисахаридного Д-антигена с помощью различных иммунологических реакций. Чаще всего с этой целью применяют реакции преципитации и латекс-агглютинации, которые используют на втором и третьем этапах для ускоренной микробиологической диагностики энтерококковых инфекций.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СИНЕГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

Синегнойная палочка *Pseudomonas aeruginosa* является типовым видом рода *Pseudomonas*. *P. aeruginosa* характеризуется политропностью, что определяет разнообразие локализаций и клинических проявлений инфекции. Синегнойная палочка относится к основным возбудителям гнойно-септических госпитальных инфекций и чаще всего встречается в ожоговых, онкологических, урологических, травматологических и пульмонологических клиниках, где она занимает 1-2-е место по частоте.

P. aeruginosa - мелкая грамотрицательная палочка, имеет один полярно расположенный жгутик, подвижная; в определенных условиях продуцирует внеклеточную слизь, окружающую клетку. Хорошо растет на обычных питательных средах (питательном агаре, 5% кровяном агаре, среде Эндо и др.) в аэробных условиях при температуре 42°C, 37°C, 20°C, но не растет при 4°C. Через 24 ч роста формирует на питательном агаре и других средах крупные (3-5 мм) плоские сочные колонии вязкой консистенции, спаянные со средой. Колонии многих

штаммов имеют перламутровый блеск (радужный диск), до 75% штаммов продуцируют в среду водорастворимый сине-зеленый пигмент пикоцианин, который является уникальным для синегнойной палочки. Кроме того, большинство культур образует желто-зеленый флюоресцирующий в УФ-лучах пигмент флюоресцина (пивовердин), и некоторые штаммы могут вырабатывать другие пигменты - красный (пигментин), черный (мпомеланин). Индуктором синтеза пикоцианина является питательная среда Китт А, индуктором флюоресцина (пивовердина) - среда Китт В. На всех питательных средах культуры синегнойной палочки имеют характерный запах "земляничного мыла" за счет синтеза триметилламина. Все штаммы *P. aeruginosa* имеют уникальные для рода псевдомонад свойства барьерной чувствительности. Уникальным для вида *P. aeruginosa* является способность к росту при 42°C на селективной среде "Псевдомонас АПС". В О/Ф - тесте с глюкозой на среде Хью - Лейфсона синегнойная палочка не ферментирует, но окисляет глюкозу. Она обладает цитохромоксидазой, нитратредуктазой, аргининдиаминолазой, желатиназой, но не имеет декарбоксилазы. По О-антигену известны 17 сероваров синегнойной палочки.

Синегнойная палочка чувствительна к гентамицину, тобрамицину, амикацину, мезлоциклину, азлоциклину, пиперацеллину, имипенему, азтреонаму, антибиотикам цефалоспоринового ряда.

Единственным методом микробиологической диагностики синегнойной инфекции является пока бактериологическое исследование.

Бактериологическое исследование

Взятие материала и его транспортировку осуществляют по методике, изложенной в разделе "Микробиологическая диагностика гнойно-септических инфекций, вызванных условно патогенными энтеробактериями".

Первичный посев материала проводят на селективную среду для выделения синегнойной палочки и универсальную среду (5% кровяной агар). В качестве селективных сред можно использовать коммерческие зарубежные среды с петрицидом или иргизаном. Однако их превосходит по чувствительности и селективности отечественная среда "Псевдомонас АПС", которую можно приготовить в любой лаборатории. Материал засевают петлей на поверхность среды "Псевдомонас АПС" (можно на 1/4 чашки), инкубируют при 42°C в течение 20-24 ч, после чего учитывают результат: наличие роста бактерий указывает на принадлежность к *P. aeruginosa*. На этом последовании за-

вершается. Если указанная среда не изменилась, продолжают изучение посевов на 5% кровяном агаре или других селективных средах, которые культивировались при 37°C 20-24 ч. Обращают внимание на характерные признаки колоний бактерий, запах триметилamina и синее-зеленое окрашивание среды. По наличию уникального синее-зеленого пигмента (пироцианина) можно окончательно идентифицировать на этом этапе до 75% штаммов синегнойной палочки. Для идентификации беспигментных штаммов требуется постановка дополнительных тестов: на барийчувствительность, цитохромоксидазу, нитратредуктазу, желатиназу, аргининдигидролазу, лизиндекарбоксилазу, окисление глюкозы и маннита на среде Хью - Лейфсона, индукцию пиоцианина на среде Кинг А и пиовердина на среде Кинг В. Тест на цитохромоксидазу ставится с 1% водным раствором диметилпараформальдегида; тесты на нитратредуктазу, аргининдигидролазу, лизиндекарбоксилазу - микрообъемным методом с учетом через 3-4 ч. Остальные тесты учитывают через 24 ч. Идентификацию синегнойной палочки проводят по результатам тестов по представленной таблице дифференциальных признаков бактерий (табл. 16).

Чувствительность выделенных штаммов *P.aeruginosa* к антибиотикам определяют диск-диффузионным методом по унифицированной методике.

Этиологическую значимость выделенных штаммов синегнойной палочки устанавливают по критериям, изложенным в разделе "Микробиологическая диагностика гнойно-септических инфекций, вызванных условно патогенными энтеробактериями".

Питательные среды и тесты для диагностики синегнойной инфекции

Определение окисления и ферментации глюкозы на среде Хью - Лейфсона (O/F тест с глюкозой). Состав питательной среды (г/л): пептон - 0,2; хлорид натрия - 5,0; калий фосфорнокислый двузамещенный - 0,3; азар-агар - 3,0; бромтимоловый синий (1% водный раствор) - 3 мл; глюкоза - 10,0; вода дистиллированная - до 1 л; pH - 7,1-7,2. Среду разливают в пробирки по 5-6 мл, стерилизуют при 120°C 10 мин. Исследуемую культуру засевают в две пробирки уколом (не достигая дна пробирки), в одну из пробирок вносят стерильное вазелиновое масло слоем 1 см. Через 24 ч инкубации при 37°C учитывают результат: отсутствие изменения исходного зеленого цвета среды в обеих пробирках указывает на отсутствие окисления и ферментации глюкозы; по-

нитамми. В последующем рабочую концентрацию хлорида бария определяют только при смене вида питательного агара. При постановке теста в расплавленный горячий стерильный питательный агар вносят навеску хлорида бария для получения рабочей концентрации, разливают среду в чашки Петри. Контрольной средой является тот же питательный агар без хлорида бария. Исследуемую культуру бактерий засевают радикальным штрихом на сектор среды с хлоридом бария (опыт) и питательного агара (контроль), инкубируют при 37°C 24 ч, после чего учитывают результат: отсутствие роста бактерий на среде с хлоридом бария при наличии роста на контрольной среде указывает на принадлежность бактерий к роду *Pseudomonas*.

Питательная среда "Pseudomonas-АПС" (по Сиволодекову Е.П., 1990). Состав питательной среды (г/л): сухой питательный агар 35,0; оксафенамид - 1,1 (растворенный в 10-12 мл диметилсульфоксида), воды дистиллированная - до 1 л; рН - 7,2-7,4. В колбу вносят 200 мл расплавленного горячего агара, добавляют 2,2 мл 10% раствора оксафенамида в диметилсульфоксиде, разливают среду в чашки Петри. Исследуемый материал засевают на сектор среды, инкубируют при 42°C (или 37°C). Наличие колоний бактерий, выросших при 42°C, указывает на принадлежность их *P.aeruginosa*. Колонии, выросшие при 37°C, принадлежат к видам *P.putida* и *P.aeruginosa*.

Определение цитохромоксидазы по Ковачу. На поверхность стеклянной чашки Петри наносят крупную каплю 1% водного раствора диметилпарафенилендиамина. Набирают запыленным изогнутым концом пастеровской пипетки часть газона испытуемой культуры (петлю из нихромовой проволоки применять нельзя) и помещают на сухую поверхность чашки рядом с каплей реактива. Перемещают той же пастеровской пипеткой каплю реактива на комочек культуры бактерий. Через 1 мин учитывают результат. При наличии цитохромоксидазы бактерии окрашиваются в красный цвет, при отсутствии цитохромоксидазы окраска бактерий не изменяется.

Среда Кинг А для выявления иноцитанина. Сухая коммерческая среда. Изготовление и приготовление по указанию на этикетке.

Среда Кинг В для выявления флуоресциина. Сухая коммерческая среда. Изготовление и приготовление по указанию на этикетке.

Среда для определения нитратредуктазы. Состав: пептон сухой ферментативный - 2,5 г; хлорид натрия - 2,5 г; KNO_3 (или $NaNO_3$) - 0,5 г; воды дистиллированная - до 500 мл. Стерилизовать при 120°C 30 мин. Срок хранения до 5 лет.

Среду разливают по 0,1 мл в лунки планшета, вносят в лунку одну петлю исследуемой агаровой культуры, инкубируют при 37°C 3-4 ч. Затем вносят в лунку 1 каплю 0,2% водного раствора риванола и 1 каплю 10% раствора соляной кислоты. При наличии нитратредуктазы среда в лунке приобретает яркую темно-вишневую окраску, среда в контроле (без посева) сохраняет желтую окраску.

Определение лизидекарбоксилазы и аргининадигидролазы. Исследования проводят микрообъемным ускоренным методом с жидкими средами в планшетах, используя среды и методику, применяемую для идентификации энтеробактерий.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БРЮШНОГО ТИФА И ПАРАТИФОВ

Брюшной тиф и паратифы относятся к группе заболеваний, возбудителями которых являются микробы рода сальмонелл (*Salmonella*) семейства кишечных бактерий (*Enterobacteriaceae*).

Возбудители брюшного тифа и паратифов А и В имеют много общих свойств. Морфологически они неразличимы и представляют собой грамтрицательные палочки величиной 0,3-0,6х1,5-3 мкм, спор и капсул не образуют, имеют большое число перитрихально расположенных жгутиков.

Бактерии брюшного тифа и паратифов содержат жгутиковый H- и соматический O-антигены. Брюшнотифозная палочка, кроме того, в своем составе имеет Vi-антиген. Его обнаруживают у свежесделанных из организма штаммов. Содержание Vi-антигена в культурах вариабельно: одни штаммы содержат Vi-антиген в больших, другие - в малых количествах.

Лабораторную диагностику брюшного тифа и паратифов проводят двумя методами: культуральным и выявлением в крови больных агител. С помощью бактериологического (культурального) метода своевременно диагностируют заболевание, осуществляют контроль при выписке переболевших на бактерионосительство, обследуют здоровых людей с целью выявления бактерионосителей, проводят исследование пищевых продуктов и воды на присутствие возбудителей брюшного тифа.

Использование иммунологических методов позволяет установить диагноз в разгаре заболевания и у ранее переболевших путем определения в крови агител (агглютининов).

Материал для бактериологического исследования на возбудителей брюшного тифа и паратифов: кровь, испражнения, моча, костный мозг, розеола, содержимое желчного пузыря, при наличии обследований (по специальным показаниям) и спинномозговая жидкость; в случае гибели больного исследуют трупный материал.

Бактериологические методы исследования

Исследование крови (выделение гемокультуры). Результаты посевов крови во многом зависят от срока исследования (табл. 17).

Таблица 17

Средняя засеваемость возбудителей брюшного тифа и паратифов в зависимости от сроков посева крови

Периоды болезни	Сроки болезни	Положительный результат исследования посева крови, %
Начало	Конец инкубации	Около 100
Период разгара	1-я неделя 2-я неделя 3-я неделя	45
Период угасания симптомов	4-я неделя	15

Кровь для бактериологического исследования берут стерильным шприцем из локтевой вены и засевают на одну из приведенных питательных сред в соотношении 1:10. Указанное разведение необходимо точно соблюдать, чтобы избежать влияния бактерицидных свойств крови. Кроме того, чем большие количества крови используют для посева, тем выше процент положительных посевов. На первой неделе болезни рекомендуется брать для посева не менее 10 мл крови, а в более поздние периоды болезни - 15-20 мл. Такое количество крови следует сеять в 100-200 мл питательной среды.

Для посева крови применяют различные питательные среды: 1) мясо-пептонный бульон с 10% желчи; 2) мясо-пептонный бульон с 0,25% глюкозы и 2-3 мл желчи на 100 мл среды; 3) желчная среда М.А. Рапопорта; 4) просроченные жидкости для парентерального пита-

ния. Среда с желчью является элективными для возбудителей тифо-паратифозных заболеваний. Другие бактерии на них вовсе не растут или рост их замедлен. Желчь препятствует свертыванию крови, нейтрализует нормальные агглютинины сыворотки, разрушает комплемент и тем самым снижает бактерицидные свойства крови при сохранении ее питательных свойств, а также препятствует действию бактериофага. В случае невозможности произвести посев крови на месте сыворотку вместе со сгустком пересылают в лабораторию. Здесь сгусток измельчают стерильной стеклянной палочкой и засевают на питательную среду. Кроме того можно пересылать и цитратную кровь в пробирке с предварительно налитым в нее стерильным 5% раствором лимоннокислого натрия (2 мл на 10 мл крови).

Флаконы с посевами крови помещают в термостат при температуре 37°C. Через 18-24 ч (2-й день исследования) изучают характер роста на среде Рапопорт. При брюшном тифе среда имеет красную окраску вследствие ферментации глюкозы, при паратифе А и В дополнительно выявляют газообразование. Из среды готовят мазок, окрашивают по Граму и микроскопируют. Убедившись в однородности выросшей культуры, ставят ориентировочную реакцию агглютинации на стекле с сальмонеллезными групповыми или монорецепторными агглютинирующими сыворотками, затем делают высев на чашку с дифференциальной средой Эндо. При отсутствии роста на среде Рапопорт через 24 ч посеvy крови снова помещают в термостат и последующие высевы на плотные питательные среды делают через 48 ч, 72 ч, на 5-е и на 10-е сутки.

На 3-й день изучают характер роста на среде Эндо, выявляют подозрительные колонии (полупрозрачные, бесцветные или бледно-розовые), готовят из них мазки, красят по Граму и микроскопируют. При наличии чистой культуры делают посевы на среду Реселя и среды "пестрого" ряда. Посевы помещают в термостат при температуре 37°C до следующего дня.

На 4-й день отмечают результаты посева, учитывают биохимические свойства выделенной культуры. Затем ставят развернутую реакцию агглютинации.

Палочка брюшного тифа отличается от паратифозных разложением углеводов без образования газа. Бактерии паратифа В отличаются от возбудителей паратифа А способностью щелочить молоко за счет расщепления белка (табл. 18).

На 5-й день учитывают результаты развернутой реакции агглюти-

Биохимические свойства возбудителей тифо-паратифозных заболеваний

Вид бактерий	Колонии на среде Эндо	Лакмусное молоко	Лактоза	Глицерин	Мальтаза	Маннит	Сахароза	Индол	H ₂ S
Бактерии брюшного тифа	Бесцветные	Слабое окисление (К)	К	К	К	К	-	-	+
Бактерии паратифа А	Бесцветные	Резкое окисление (К)	-	КГ	КГ	КГ	-	-	-
Бактерии паратифа В	Бесцветные	Высшее окисление, затем посинение	-	КГ	КГ	КГ	-	-	+

Обозначения: К - образование кислоты; - отсутствие кислоты и газа; + - наличие реакции; КГ - образование кислоты и газа

пацци. Если штамм агглютинируется не меньше чем до 1/2 титра, то на основании совокупности всех предшествующих данных делают окончательное заключение о видовой принадлежности выделенной культуры. Следует отметить, что из крови часто высеивается брюшнотифозная культура, содержащая Vi-антиген (V-форма) которая не агглютинируется O-сывороткой, т.к. Vi-антиген препятствует такой агглютинации. Поэтому, если выделенный штамм не агглютинируется или агглютинируется не до диагностического титра, то следует поставить реакцию агглютинации на стекле с Vi-сывороткой.

Все выделенные штаммы возбудителя брюшного тифа должны подвергаться типированию при помощи типовых Vi-бактериофагов. Определение фаготипа (фаговара) имеет большое эпидемиологическое значение, помогает выявить источник заболевания.

Определение фаговара тифозных бактерий. Необходимо иметь набор Vi-брюшнотифозных фагов второго типа. Их обозначают заглавными буквами латинского алфавита - А, В, С, D, Е и т.д. Кроме того, надо иметь фаг Vi первого типа, которым пользуются для контроля состояния культуры. Бактериофаг первого типа лизирует тифозные культуры всех типов, если они находятся в V-форме. Для определения фаговара тифозные палочки должны быть в V-форме, т.е. содержать Vi-антиген и агглютинироваться Vi-сывороткой и не агглютинироваться O-сывороткой.

Для опыта применяют молодые 3-4-часовые бульонные культуры, которые высевают на чашки с агаром. Используют 1% прозрачный агар pH 7,2-7,4. Чашки с агаром хорошо подеушивают и на поверхность их наносят петлей капли культуры, все одного диаметра, после чего чашку снова ставят в термостат на 20-30 мин для подеушивания. На высохшие капли испытуемой культуры наносят в одинаковых объемах типовые фаги в критическом тест-разведении, которое обозначено на этикетках ампул с фагом (тест-разведение типового фага определяется титрованием каждого фага с соответствующей культурой и является последним разведением, вызывающим полный лизис культуры на плотной среде).

Засеянные чашки помещают в термостат на 2-3 ч, а затем на ночь в холодильник при 2-6°C. На следующий день чашки вновь помещают на 4-6 ч в термостат, после этого учитывают результаты опыта. Тип культуры определяют по фагу, который полностью лизирует культуру.

Исследование дуоденального содержимого. Зондирование тонким зондом выполняют в лечебном учреждении. В лабораторию доставляют пробирки с двумя или тремя порциями (А и В или А, В, С) дуоденального содержимого и желчи. Каждую порцию следует посеять отдельно, но при крайней необходимости можно предварительно смешать их и посеять смесь. Дуоденальное содержимое (5-10 мл) засевают во флакон с 10% желчным бульоном в соотношении 1:10. Посевы помещают в термостат при температуре 37°C на 18-24 ч. На следующий день просматривают посевы и дальнейшую идентификацию выросшей культуры проводят по схеме, указанной в разделе бактериологического исследования крови.

Исследование испражнений (выделение копрокультур). Исследование проводят как с диагностической целью, так и при обследовании реконвалесцентов, а также здоровых лиц, поступающих на работу или уже работающих на предприятиях питания и водоснабжения. Важное значение имеют своевременное и правильное взятие и доставка материала в лабораторию. Оптимальным вариантом является посев испражнений "у постели больного". Однако это не всегда удается осуществить, поэтому рекомендуют собирать фекалии в тщательно вымытое кипятком судно. Следует избегать обработки посуды, предназначенной для сбора и пересылки последующего материала, дезинфицирующими веществами. Материал у больных и реконвалесцентов собирают без предварительной дачи слабительного.

Пробы испражнений набирают деревянным шпателем в специальные патроны или стерильные стеклянные широкогорлые баночки емкостью в 25-30 мл с притертыми или корковыми пробками в количестве 3-5 г. Затем пробку и горлышко банки покрывают вощеной бумагой, тщательно завязывают и приклеивают этикетку, на которой указывают дату взятия, фамилию, имя и отчество больного, и цель исследования. При невозможности быстро доставить материал в лабораторию его помещают в консервант в соотношении 1:3. В качестве консерванта используют 30% стерильный раствор глицерина в физиологическом растворе.

В лаборатории фекалии засевают на среду обогащения (селенитовая, Мюллера, Кауфмана) и на плотную дифференциальную среду (Плоскирева, висмут-сульфит-агар, Эндо), после чего посева помещают в термостат при температуре 37°C.

Через 18 ч со среды обогащения делают высев на среду Эндо. Затем просматривают чашки с дифференциальными средами, непосредственно засеянными материалом, отбирают изолированные колонии (на среде Эндо или Плоскирева бесцветные, прозрачные, нежные), делают мазки, окрашивают их по Граму и микроскопируют. Убедившись в однородности выросшей культуры, из колонии делают высев на среду Ресселя или Олькеницкого.

На 3-й день учитывают рост на среде Ресселя или Олькеницкого, при росте бактерий брюшного тифа нижняя часть агара (столбик) будет окрашена в соответствующий цвет индикатора, измененного кислотными продуктами ферментации глюкозы, верхняя часть агара останется не измененной в цвете. Бактерии паратифа дадут в столбике агара пузырьки газа.

Затем изучают посева на среде Эндо, сделанные со среды обогащения, отбирают подозрительные колонии и также пересевают на среду Ресселя или Олькеницкого. Дальнейшее исследование проводят, как указано в разделе бактериологического исследования крови.

Исследование мочи. Выделение уринокультуры у больных наблюдается на 2-3-й неделе, продолжается в период реконвалесценции.

Мочу для посева берут в стерильную посуду после обмывания наружного отверстия мочеиспускательного канала стерильным физиологическим раствором, лучше мочу брать с помощью катетера.

В лаборатории мочу (30-50 мл) центрифугируют при 3 тысячах оборотов ротора в течение часа и осадок засевают на среду обога-

щения (селенитовая, Мюллера, Кауфмана) и на 1-2 чашки с плотной дифференциальной средой (Плоскирева, Эндо, висмут-сульфит-агар). Дальнейший ход исследования, как и при посеве испражнений.

Исследование трупного материала. Для исследования при вскрытии трупа берут кусочки паренхиматозных органов (печень, селезенка), отрезки тонкого кишечника, кровь из сердца. В лаборатории кусочки органов растирают в ступке со стерильным песком, переводят в жидкую фазу и в дальнейшем исследуют как испражнения.

Иммунологическая диагностика брюшного тифа и паратифов

Реакция агглютинации (реакция Видаля). Начиная с конца первой и начала второй недели заболевания в сыворотке крови больных появляются антитела к возбудителю болезни - агглютинины, количество которых, как правило, нарастает в последующие дни и снижается после выздоровления. Помимо диагностики острого заболевания с помощью реакции Видаля можно распознать и ранее болевших брюшным тифом или паратифами, что имеет важное эпидемиологическое значение. На время появления агглютининов, высоту их титров и длительность сохранения влияет состояние реактивности организма. Так, в ослабленном организме со сниженной реактивностью слабо и медленно вырабатываются антитела. Таким образом, отрицательный результат реакции агглютинации не позволяет исключить заболевание. Положительным результатом у непривитых людей считают в настоящее время титр агглютинации в разведении не ниже 1:100 при наличии клинической картины и не ниже 1:200 при отсутствии таковой.

Реакция Видаля может быть положительной при любом лихорадочном заболевании, если больной прежде перенес брюшной тиф (анамнестическая реакция). Она может быть положительной также в течение некоторого времени после прививок (прививочная реакция). В связи с наличием общих антигенов у сальмонелл в ряде случаев положительная реакция носит парадоксальный характер, т.е. групповая реакция бывает выше, чем специфическая.

Специфичность реакции Видаля может быть выявлена при постановке ее в динамике (исследование парных сывороток). Ни групповые, ни анамнестические, ни прививочные агглютинины не обнаруживают нарастания титра во второй сыворотке, взятой через 10-12 дней.

Для постановки реакции Видаля нужны следующие ингредиенты.

1. Сыворотки крови больного или переболевшего.

2. О- и Н-диагностикумы бактерий брюшного тифа, паратифа А и В. Диагностикумы представляют собой густые взвеси указанных бактерий, убитых нагреванием или формалином. О-диагностикумы готовят путем кипячения или обработки культуры спиртом, Н-диагностикумы - обработкой культуры формалином.

3. Физиологический раствор - 0,85% раствор хлористого натрия.

Реакцию Видяля ставят в шести рядах пробирок (по 6 пробирок в каждом). Еще одна пробирка предназначена для контроля сыворотки. На первых пробирках каждого ряда надписывают название того диагностикума, который будет внесен в данный ряд. На последних пробирках каждого ряда ставят буквы КД (контроль диагностикума). Во все пробирки, кроме первых, наливают по 1 мл физиологического раствора. Затем из основного разведения сыворотки (1:100) вносят по 1 мл в первые и вторые пробирки каждого ряда и 1 мл в пробирку с обозначением КС (контроль сыворотки). Из второй пробирки, смешав ее содержимое, извлекают 1 мл жидкости и переносят в третью пробирку; 1 мл смеси из третьей пробирки переносят в следующую пробирку и т.д. После смешивания содержимого предпоследней пробирки 1 мл смеси выливают в банку с дезинфицирующим раствором. Аналогично разводят сыворотку во всех остальных рядах. Следовательно, в 5 пробирках каждого ряда будет по 1 мл сыворотки, разведенной начиная с 1:100 и до 1:1600. Далее во все 6 пробирок каждого ряда, за исключением контроля сыворотки, вносят по 1-2 капли соответствующих диагностикумов. Штатив с пробирками встряхивают и помещают в термостат на 2 ч, после чего предварительно учитывают реакцию, а окончательно - через 18-20 ч нахождения пробирок при комнатной температуре.

Положительная реакция агглютинации характеризуется осадком в виде "зонтика" и большей или меньшей прозрачностью надосадочной жидкости. Агглютинацию считают специфической только в том случае, если в контрольной пробирке (контроль диагностикума) не образовалось хлопьев. При учете результатов реакции обращают внимание на характер агглютинина: Н-агглютинация - крупнохлопчатая, О-агглютинация - мелкозернистая. В процессе развития брюшнотифозной инфекции накопление агглютининов идет своеобразным путем: раньше (конец первой недели) появляются О-агглютинины как результат ответа организма на более сильный раздражитель - О-антиген. С выздоровлением О-агглютинины постепенно исчезают, уступая место Н-агглютинином.

Реакция Vi-смагглютинации. Vi-антитела в инфекционном процессе при брюшном тифе не имеют диагностического или прогностического значения. Однако Vi-антитела у бактерионосителей представляют интерес. Большая резистентность бактерий, содержащих Vi-антиген, к защитным механизмам организма обуславливает, очевидно, и более длительное носительство этих форм (V-форм) тифозных палочек, вследствие чего в крови носителей обнаруживаются Vi-антитела. Поэтому реакция Vi-агглютинации является методом предварительного отбора лиц, подозрительных на носительство.

В последнее время реакция Виссала используется гораздо реже. Сейчас, в основном, применяют реакцию непрямой геммагглютинации (РНГА), которая ставится вначале с комплексным эритроцитарным диагностикумом группы ABCDE, затем с брюшнотифозным эритроцитарным 09 диагностикумом, затем с эритроцитарным Hd диагностикумом, а в последующем - с Vi-эритроцитарным диагностикумом.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ДИЗЕНТЕРИИ

Термином бактериальная дизентерия (шигеллез) обозначают инфекционное заболевание с поражением, главным образом, толстого кишечника, вызываемое микроорганизмами рода *Shigella*. К настоящему времени известно 4 вида шигелл: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei*. Вследствие того, что различные позологические формы имеют сходные клинические проявления, наиболее достоверным в их этиологической диагностике является бактериологический метод исследования. При этом особое внимание уделяют дифференциальной диагностике с заболеваниями, вызываемыми, помимо энтероинвазивных штаммов *E. coli*, микроорганизмами видов *Vibrio parahaemolyticus*, *Campylobacter jejuni* и др.

Основным материалом для исследования служат испражнения. Материал для исследования у больного следует брать до приема антибиотиков; химиотерапевтических препаратов и бактериофага. Сбор испражнений производят с помощью стерильных деревянных шпателей, вмонтированных в ватную пробку пробирки.

При массовых исследованиях материал можно забирать путем введения в прямую кишку алюминиевой проволоочной петли, ватного тампона или стеклянной оплавленной трубки. Конец петли (тампона, трубки) непосредственно перед употреблением смачивают в (фи-

биологическом растворе или консерванте. Посев на питательные среды делают сразу же после взятия материала. Если немедленный посев произвести невозможно, фекалии или ректальные тампоны (пелли, трубки) помещают в стерильные пробирки с консервирующим раствором (глицериновая смесь). При транспортировке и хранении испражнений при комнатной температуре время от забора материала до первичного посева не должно превышать 2 ч, при помещении материала на холод (4°C) это время может достигать 12-24 ч.

Бактериологическое исследование включает следующие основные этапы: посев исходного материала на дифференциально-диагностические и селективные среды, отбор подозрительных колоний, накопление чистых культур и их идентификацию.

Микроорганизмы рода *Shigella* неприхотливы к питательным веществам. Большинство штаммов шигелл растет на средах, содержащих лишь глюкозу и никотиновую кислоту с добавлением незначительного количества аминокислот. Кроме того, шигеллы относительно резистентны к бактериостатическому действию анилиновых красителей и желчных солей. Поэтому первичный посев суспензии испражнений в разведении 1:10 объемом 1-2 капли делают на среды Плоскирева или Эндо, максимально удовлетворяющие перечисленные выше питательные потребности возбудителей бактериальной дизентерии. Предварительно каждая серия используемых питательных сред должна быть проверена с музейными штаммами шигелл.

Просматривают посева через 18-20 ч после первичного высева. На средах Плоскирева и Эндо шигеллы формируют бесцветные, прозрачные или полупрозрачные, круглые, выпуклые, с ровным краем (S-форма) колонии диаметром 1-4 мм.

Иногда образуются плоские колонии с зазубренным краем (R-формы). Для *S. sonnei* наличие колоний в R-форме является характерным признаком. При бактериоскопии материала из таких колоний выявляют наличие грамтрицательных коротких палочек, в свежих клинических материалах иногда напоминающих коккобациллы. Колонии, подозрительные на принадлежность к шигеллам, пересевают в пробирки со средами Ресселя или Олькеницкого. С каждой чашки снимают не менее трех колоний.

При проведении массовых обследований можно лактозонегативные бесцветные колонии, выросшие на любой из используемых сред, исследовать в ориентировочной реакции агглютинации со смесью видовых дизентерийных сывороток.

На 3-й день исследования регистрируют изменения в комбинированных средах, проводят серологическую идентификацию и дальнейшее изучение подозрительных культур. Анализируют культуры, не ферментирующие лактозу и мочевины, но ферментирующие глюкозу. Исследуют морфологию микроба в мазке, окрашенном по Граму, пересевают культуру на "пестрый" ряд, состоящий из полужидких сред Гисса с маннитом, мальтозой, лактозой, сахарозой, на 1% пептонную воду с индикаторными бумажками на индол и сероводород, а также в пробирку с 0,2% питательным агаром для определения подвижности. Кроме того, испытывают чувствительность к поливалентному дизентерийному бактериофагу. Антигенную идентификацию исследуемых штаммов проводят в ориентировочной реакции агглютинации с адсорбированными дизентерийными сыворотками.

При необходимости дополнительно в этот день определяют чувствительность выделенных бактерий к антибиотикам.

На 4-й день исследования анализируют результаты посевов предыдущего дня. Микроорганизмы, относящиеся к роду *Shigella*, как правило ферментируют глюкозу до кислоты (за исключением *S. flexneri* серовара 6, устаревшее название - *S. newcastle*). Ферментация лактозы наблюдается на 2-3-и сутки только у штаммов *S. sonnei*. Шигеллы гидролизуют мочевины, растут на среде с KCN, утилизируют ацетат натрия, разжижают желатин, не ферментируют сахарозу, дают положительную реакцию метилрот и отрицательную реакцию Фогеса - Проскауэра, не растут на цитратной среде Симмонса и не изменяют pH цитратной среды Кристенсена, не образуют лизиндекарбоксилазу. На 1% пептонной воде не образуют сероводород, а образование индола варьирует у различных видов шигелл и сероваров в пределах одного вида.

Культуральные и биохимические свойства шигелл свидетельствуют, что степень сходства этого рода имеет высокую степень сходства со штаммами *E. coli*. Геномы данных микроорганизмов родственны в 85-90% и имеют общий состав Г+Ц оснований, равный 50-52%. Высокая степень подобия геномов обуславливает и высокое сходство антигенных свойств штаммов *Shigella* и *E. coli*, находящее выражение в наличии перекрестных реакций с диагностическими агглютинирующими сыворотками (табл. 19).

В практике дифференциации штаммов *Shigella* и *E. coli* обычно основана на биохимических тестах декарбоксилирования лизина, ферментации цитрата на среде Симмонса, утилизации ацетата Na (табл. 20).

Таким образом, к роду *Shigella* относят бактерии, обладающие

Антигенное родство штаммов *Shigella* и *E. coli*

Виды <i>Shigella</i> и их серотипы	Подобие с O-антигенами <i>E. coli</i>	
	Идентичность	Перекрестные реакции
<i>S. dysenteriae</i> 1		1
2	112 ac	
3	124	
4	<i>E. coli</i> 3588-51	159
5	58	
6		130
7		121
8		38, 23
9		
10		144
11		29
12	152	3
<i>S. flexneri</i> Ia		
1b		13
2b	147 ab	13
3		
3b		
4a	135	
4b		
5	129	
6		
Variant X		
Variant Y		
<i>S. boydii</i> 1	149	2
2	87 ab	96
3		85
4	53	
5	79	76
6		
7	<i>Coliform</i> 4838-	
8	69	
9	143	102
10		105 ac
11		
12	105 ab	7
13		28 ac, 98
14		
15	32	
16	112 ab	41
17		124
18		3, 25, 115, 152
<i>S. sonnei</i>		

Дифференциация штаммов *Shigella* и *E.coli*

Тесты	Выводимые реакции	
	<i>Shigella</i>	<i>E.coli</i>
Подвижность	-	В
Газы ферментации глюкозы	-*	+*
Кислота при ферментации лактозы	-**	+*
Индол	В	+
Аминокислотоксидаза		
Рост на цитратной среде Слейфера	-	В
Утилизация азота Na	-***	+*

Обозначения: В - некоторые штаммы имеют положительную реакцию, другие отрицательную; * - наблюдаются некоторые исключения; ** - *S.sonnei* обычно слабо ферментирует лактозу; *** - большинство культур *S.flexneri* 4a слабо утилизируют азот Na.

четкой серологической характеристикой и типичными ферментативными свойствами.

Для ускоренной бактериологической диагностики могут быть использованы МФА и РИГА, позволяющие выявить антигены шигелл в испражнениях или в колониях, выросших на дифференциально-диагностических средах. Положительные результаты этих методов являются ориентировочными и не освобождают от проведения исследования по полной классической схеме.

В объектах внешней среды и пищевых продуктах можно обнаружить антиген шигелл Зонне при помощи иммуноферментного анализа (диагностическая тест-система "Шигеллапаст").

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЭШЕРИХИОЗОВ

Термином эшерихиозы обозначают группу инфекционных заболеваний, вызываемых микроорганизмами рода *Escherichia*. Более чем в 99% случаев возбудителем эшерихиозов является *Escherichia coli*, впервые описанная Т. Эшерихом в 1885 г. (около 1% инфекций этой группы вызывают *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*). Первоначально кишечную палочку относили к непатогенным комменсалам, однако впоследствии у многих штаммов этого вида были обнаружены вирулентные свойства и установлено, что вызываемые ими заболевания протекают главным образом в форме инфекций желудочно-кишечного тракта, мочевыводящих путей, бактериемии и менингита новорожденных.

Кишечные инфекции, занимающие ведущее положение в структуре эшерихиозов, связаны с четырьмя различными группами *E. coli* - энтеротоксигенными (ЭТКП), энтероинвазивными (ЭИКП), энтеропатогенными (ЭПКП) и энтерогеморрагическими (ЭГКП) кишечными палочками. Штаммы этих групп различаются прежде всего по факторам патогенности, а также по клиническим проявлениям заболеваний, возбудителями которых они являются.

Энтеротоксигенные штаммы *E. coli* вызывают диарею с выраженным болевым синдромом за счет воздействия на ганглиозидные рецепторы энтероцитов продуцируемых ими термолabileного и термостабильного энтеротоксинов, что приводит к активизации аденилатциклазной системы, внутриклеточному накоплению цАМФ и, как следствие, к секреции жидкости и электролитов в просвет кишечника.

Энтероинвазивные *E. coli*, имеющие значительное сходство с микроорганизмами рода *Shigella* по биохимическим и антигенным свойствам, проявлению вирулентности, способствуют развитию заболеваний, протекающих по типу острой дисентерии.

Энтеропатогенные эшерихии, группируемые в 2 класса на основе характера взаимодействия с клеточными культурами Her 2 и HeLa, колонизируют эпителий слизистой оболочки тонкой кишки, вызывая возникновение эрозий на его поверхности. Наличие у микроорганизмов плазмидокодируемого O-полисахарида с молекулярной массой 54 мДа способствует антифагоцитарной устойчивости возбудителей и развитию бактериемии.

Патогенез диарей, вызванной энтерогеморрагическими *E. coli*,

связан с синтезом изолятами этой группы двух типов веротоксина, один из которых (SLT-1) имеет структурное и антигенное сходство с токсином *S. dysenteriae* серовара 1.

В настоящее время в самостоятельную группу выделяют так называемые энтероадгезивные или аутоагглютинирующие штаммы *E. coli*, однако их роль в развитии инфекций ЖКТ выяснена не до конца.

Штаммы патогенных энтерий различаются также по антигенной структуре.

Схема типирования *E. coli* основана на варибельности соматических O-антигенов, жгутиковых H-антигенов и капсульных (поверхностных) K-антигенов. К настоящему времени известно свыше 170 O- и 55 H-антигенных групп. Выделяют также три типа K-антигена (L, A, B), препятствующих взаимодействию микроорганизмов с O-антисыворотками и удаляемых с поверхности бактериальных клеток воздействием высоких (100-121°C) температур в течение 1-2 ч.

Бактериологическая диагностика энтеритов и энтероколитов основана на выделении штаммов *E. coli* из стерильных биосубстратов (кровь, спинномозговая жидкость) или изоляции кишечных палочек с определением их серологической принадлежности, например, при исследовании мочи. Лабораторная диагностика кишечных инфекций, вызванных *E. coli*, заключается в выделении чистых культур возбудителя, определении вирулентных свойств и установлении серологической принадлежности изолятов.

В качестве образцов для исследования, используют фекалии, рвотные массы, мочу, гной, кровь, спинномозговую жидкость, секционный материал - кровь из сердца, кусочки легкого, печени, селезенки, почек, отрезки толстой и тонкой кишок. При необходимости исследованию подвергают промывные воды, остатки пищи, смывы с рук персонала, воздух палат. Забор материала у обследуемых желательно производить до начала антибиотикотерапии.

Образцы фекалий (предпочтительно последние порции кала) отбирают при помощи тампона и помещают в пробирки с транспортной средой (30% раствор глицерина с 0,6% раствором хлорида натрия) или, при возможности, производят первичный посев на чашки Петри с соответствующими питательными средами: Эндо, Левина, Асселя - Либермана. При этом небольшое количество фекалий эмульгируют в физиологическом растворе (1:10) и оставляют на несколько минут. После оседания крупных частиц с поверхности жидкости берут 1-2 капли приготовленной взвеси, вносят ее в чашку Петри и на неболь-

шом участке питательной среды растирают досуха стерильным стек­ лян­ ным шпатель. Затем шпатель отрывают от поверхности агара и без дополнительного фламбирования распределяют остаток материала по поверхности среды. При необходимости посева во вторую и третью чашки материал берут znovu. Сделанные посе­ вы инкубируют при 37°C и просматривают через 18-24 ч. Первичный посев других мате­ риалов (за исключением крови) делают аналогично.

Колонии патогенных и непатогенных эшерихий не различаются и имеют на среде Эндо круглую форму, ровный край, матовую по­ верхность и малиново-красный цвет без металлического блеска, за­ висящий от способности культур расщеплять лактозу. На среде Ле­ вина колонии *E.coli* имеют темно-синий цвет, а на среде Асселя - Либермана розовую окраску при неизменности других признаков.

Из 10 инкубированных колоний с культурально-морфологически­ ми свойствами, характерными для *E.coli*, берут часть материала для пробной агглютинации так, чтобы оставшаяся часть колонии могла быть использована для дальнейшего исследования. Если на чашке вырастает несколько видов колоний, в пробной агглютинации ис­ пытывают до 10 колоний каждого вида. Делается это для выявления нескольких групп *E.coli*, которые могут одновременно присутство­ вать у одного больного.

С материалом каждой колонии отдельно ставят реакцию агглю­ тинации на стекле с неразведенной агглютинирующей комплексной ОВ-ко­ ли-сывороткой, представляющей собой смесь типовых ОВ-сывороток к наиболее распространенным сероварам патогенных штаммов *E.coli* (табл. 21).

При выборе диагностических и агглютинирующих сывороток следует учитывать, что большинство штаммов *E.coli*, выделенных из фекалий, не способны вызывать заболевания мочеподводящих путей, т.к. не содержат фимбрий 1-го типа, обеспечивающих специфическое связывание эшерихий с ганглиотриеном мукозной оболочки уретры, в связи с чем она способна выполнять барьерные функции. По­ тому целесообразно использовать максимально возможное коли­ чество агглютинирующих сывороток. В ходе исследования сыворотку капают по 5 отдельных капель на 2 предметных стекла. В каждой капле сыворотки эмульгируют небольшое количество микробной массы, взятой из отдельной колонии.

В случаях, когда все 10 колоний, взятых в исследование, не аг­ глутинируются смесью сывороток, дается отрицательный ответ, од-

**Серовары E.coli, связанные с кишечными
и внекишечными заболеваниями**

Кишечные серовары				Иерархия мочевого тракта	Бактери- емия	Менин- гит
ETEC	ЕPEC	EPEC	EHEC			
06	018	028	0157	01	01	01
08	026	029		02	02	06
015	044	0112		04	04	07
020	051	0124		06	04	07
025	086	0136		07	06	016
027	0111	0143		08	07	018
063	0114	0144		09	08	083
078	0119	0152		011	011	
080	0125	0164		018	018	
085	0126	0167		022	022	
0114	0127			025	025	
0115	0128			062	075	
0125 <i>ac</i>	<i>ab</i>			075		
0148	0142					
0131	0133					
0159						
0167						

нако в клинически подозрительных случаях производят дополнительное изучение еще 10 колоний. При положительной реакции агглютинации колонии пересеивают на скошенный агар или среду Олькеницкого для дальнейшего изучения чистой культуры и помещают в термостат на 24 ч при 37°C.

Выделенные таким образом бактерии проверяют повторно в реакции агглютинации на стекле с комплексом сывороток для исключения из дальнейшей работы штаммов, ошибочно отсеянных из нетипируемых колоний.

Затем культура засеивается в среды "пестрого" ряда для изучения ее сахаролитических, протеолитических свойств и подвижности.

Через сутки просматривают посеvy, сделанные на среды Гисса, регистрируя в протоколе исследования ферментацию углеводов, отмечают образование индола, сероводорода и подвижность бактерий

по характеру роста в полужидком агаре. Штаммы *E. coli* ферментируют глюкозу до кислоты и газа, дают положительную реакцию при взаимодействии с лактозой, мальтозой, сахарозой, маннитом, арабинозой, ксилозой, трегалозой, *O*-нитрофенилом- β -галактопиранозидом (ONPG), образуют индол и не образуют сероводород в мясо-пептонном бульоне, не ферментируют инозит и мочевину, не дезаминируют фенилаланин, дают отрицательную реакцию Фогеса - Проскауэра и не синтезируют ДНКазу.

Обнаружение агглютининов в сыворотке крови больных колиэнтеритами в качестве метода лабораторной диагностики заболеваний не нашло широкого применения, так как лишь некоторые авторы выявили агглютинины к выделенным патогенным штаммам *E. coli*. При этом положительные реакции регистрируются нерегулярно и в титрах, не превышающих 1:100. На этом основании постановку реакции агглютинации с энтеропатогенными энтерихиями начинают с разведения сыворотки 1:20. Антигеном для выявления *O*-агглютининов служит кипяченая 2 ч культура *E. coli*.

Наиболее широко для серологической диагностики колиэнтеритов используется реакция непрямой геммагглютинации (РНГА). При этом в качестве антигена для сенсибилизации эритроцитов применяют смыв 48-часовой агаровой культуры, кипяченной в течение 2 ч. Таким образом в РНГА выявляются также только *O*-антитела. Эта реакция позволяет отличить больных от лиц, выделяющих энтеропатогенные серовары *E. coli* без проявления заболевания, по наличию агглютининов только в первой группе.

Таким образом лабораторная диагностика колиэнтеритов основывается на первичной изоляции возбудителя заболеваний и дальнейшем дифференцировании вирулентных и непатогенных штаммов *E. coli* при помощи определения серологической принадлежности и маркеров вирулентности выделенных культур.

Определение токсигенности штаммов *E. coli*, зависящей от продукции микроорганизмами термолabileного токсина, проводят на линии Y-1 клеток почек мышей. Культуру клеток, поддерживаемую стандартными процедурами, суспендируют в ростовой среде до концентрации $2,5 \times 10^5$ клеток/мл, которая определяется денситометрически. Аликвоты суспензии объемом 0,2 мл разливают в лунки пластины для тканевых культур, которую после этого инкубируют в течение 3 дней при 37°C. Через 72 ч клеточную культуру промывают свежим раствором ростовой среды и в лунки пластины добавляют по 0,025 мл

нативного и обработанного кипячением бактериального фильтрата и пластины вновь помещают в термостат на 24 ч при 37°C. После этого клетки фиксируют метиленом, окрашивают по Романовскому - Гимзе, промывают, сушат и исследуют методом световой микроскопии.

На воздействие термолабильного энтеротоксина указывает округление свыше 90% клеток в лунках с нативным фильтратом микроорганизмов и отсутствие изменений клеточной культуры в лунках с бактериальным фильтратом, обработанным кипячением.

Исследование инвазивности штаммов *E. coli* на культурах клеток Нер-2. Бактерии выращивают в течение 36 ч на мясо-пептонном агаре, а затем суспендируют в 3 мл сердечно-мозгового бульона и подращивают в течение 2 ч при непрерывном помешивании в шоттель-аппарате для получения микробных клеток в фазе логарифмического роста. Приготовленные таким образом микробные клетки ресуспендируют в ростовой среде до концентрации 3×10^7 м.к./мл, определяемой денситометрически, и по 1 мл этой суспензии разносят в лунки панели для тканевых культур, достигая соотношения приблизительно 100 микробных клеток на клетку тканевой культуры. Инфицированный монослой инкубируют в течение 2 часов при 37°C в присутствии 5% CO₂, отмывают три раза фосфатно-буферным раствором (рН 7,4), покрывают свежей ростовой средой, содержащей 100 мкг/мл гентамицина, и инкубируют 1 ч при 37°C. Так как гентамицин не может пенетрировать мембрану эукариотических клеток, бактерии, которые не прошли внутрь этих клеток, погибают. Монослой отмывают 6-кратно фосфатно-буферным раствором и обрабатывают путем внесения в каждую лунку 200 мкг 1% раствора Triton X-100 на 5 мин с целью лизиса клеток и освобождения внутриклеточных микроорганизмов. К полученному клеточному лизату добавляют 800 мкл мясо-пептонного бульона и смесь инкубируют в течение 30 мин при 37°C. Разведения этой суспензии высевают на мясо-пептонный агар и после инкубации в течение 24 ч подсчитывают выросшие колонии. Тест выполняют используя в качестве контроля неинвазивные и заведомо инвазивные штаммы. Эффективность инвазии определяют по числу бактерий, проникших в тканевую культуру. Тест может быть выполнен и на культуре клеток Hela.

Исследование адгезивных свойств *E. coli* на культурах клеток Нер-2 и Hela. Культуру клеток суспендируют и разводят в ростовой среде до концентрации 2×10^8 м.к./мл и по 1,5 мл суспензии разносят в лунки панели для тканевых культур. Панель инкубируют при 37°C в

присутствии 5% CO₂ до тех пор, пока клетки не покроют около 50% дна лунок, после чего в лунки панели добавляют свежую ростовую среду, содержащую 0,5% D-маннозы, необходимой для инкубирования пептидофоринового связывания E.coli, обусловленного наличием у бактерий фимбрий 1-го типа. В каждую лунку добавляют по 0,1 мл точной бульонной культуры исследуемых штаммов, после чего панель инкубируют в течение 3 ч при 37°C. По истечении этого срока инфицированный монослой отмывают 6 раз фосфатно-буферным раствором (рН 7,4), фиксируют метанолом в течение 5 мин, окрашивают по Романовскому - Гимзе, промывают дистиллированной водой и исследуют методом световой микроскопии для определения характерных паттернов прикрепления бактерий.

Определение продукции термолabileного энтеротоксина методом иммуопреципитации. Тестируемые бактериальные штаммы инокулируют на поверхность плотной питательной среды в форме четырех секторных посевов так, чтобы внутренний край секторов отсутствовал на 4-5 мм от центра чашки. Посевы инкубируют 48 ч при 37°C. По истечении этого срока в центр чашки помещают диск, смоченный 20 мл очищенной хроматографически антитоксической сывороткой. Посевы исследуют через 24 ч на наличие зоны преципитата.

Обнаружение патогенных E.coli методом ДНК-ДНК гибридизации. Идентификация патогенных энтерихий с помощью ДНК-зондов основана на том, что одноцепочная молекула ДНК может гибридизоваться (реассоциировать) с комплементарной ей другой цепью ДНК. У большинства групп патогенных энтерихий гены вирулентности локализованы на плазмидах, поэтому в качестве зондов для обнаружения ЕТЕС (ЭТКП), ЭИКП, ЭПКП используют радиоактивно- и перидоактивно меченные последовательности, клонированные из таких плазмид вирулентности. Как правило, для гибридизации с гомологичными ДНК-последовательностями колоний E.coli, выращенных на помещенной на плотную питательную среду микроцеллюлозной мембране, применяют рестрикционные фрагменты ДНК, кодирующие термолabileный и термостабильный энтеротоксины энтерихий; 2,5 kb и 17 kb фрагменты ДНК, клонированные из плазмиды, кодирующей факторы инвазивности; 1kb фрагмент ДНК гена, кодирующего факторы адгезии.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ИЕРСИНИОЗОВ

К иерсиниозам относят псевдотуберкулез и кишечный иерсиниоз - заболевания, вызываемые *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica*. Вместе с возбудителем чумы *Yersinia pestis* эти бактерии составляют род *Yersinia* из семейства кишечных бактерий *Enterobacteriaceae*.

Псевдотуберкулезные бактерии и кишечные иерсинии в мазках имеют вид бесспорных грамотрицательных палочек. Бактерии неподвижны при 37°C и подвижны при 28°C и более низких температурах. К питательным средам исключительно неприхотливы, хорошо растут на обычных питательных средах и могут размножаться даже в голодных субстратах (беспиттовый агар, физиологический раствор, стерильная вода).

Биохимически иерсинии весьма активны, они расщепляют мочевины и многие углеводы (кроме лактозы). Между собой возбудители иерсиниозов различаются по отношению к сахарозе и рамнозе: псевдотуберкулезные микробы ферментируют только рамнозу, кишечные иерсинии - только сахарозу.

Антигенные свойства наиболее изучены у возбудителя псевдотуберкулеза: по O-антигенам различают 6 серологических вариантов. Антигенную классификацию кишечных иерсиний продолжают уточнять. Из 30 серовариантов только два (03 и 09) определенно патогенны для человека.

Возбудители иерсиниозов погибают при нагревании и высушивании. Однако благодаря непритязательности питательных запросов и психрофильности (способность к размножению при низкой температуре) они отлично выживают в почве, воде и других объектах внешней среды, а также в овощах.

Из-за множественности и неспецифичности симптомов иерсиниозы, как правило, проходят под другими диагнозами: скарлатина, энтероколит, гепатит, пищевая токсикоинфекция, аппендицит, ревматизм и др. Только микробиологическое исследование позволяет выявить эти часто встречающиеся заболевания и провести целенаправленные лечебные и противоэпидемические мероприятия.

Микробиологическая диагностика иерсиниозов основана на бактериологическом, иммунологическом и аллергическом исследованиях. Зараженность продуктов, органов животных, смывов с оборудования кухни и столовых определяют бактериологически.

Бактериологическая диагностика перенитозов заключается в выделении возбудителей обычно из фекалий больных людей. Исследуемый материал вначале засевают в жидкую среду накопления (фосфатно-буферный раствор, 1% пептонная вода) и выдерживают в холодильнике при 5°C. Методика основана на использовании способности персиний накапливаться при низкой температуре и недостатке питания быстрее, чем другие энтеробактерии. Каждые 3-5 сут делают высевы на плотные питательные среды Эндо, Плоскирева, Серова, CIN, DYS, с которых после суточной инкубации чашек при 37°C отбирают подозрительные колонии.

Обработка материала перед посевом слабыми растворами щелочи существенно повышает чувствительность бактериологического метода.

Дальнейшая идентификация персиний основана на детальном изучении биохимических и антигенных свойств выделенных культур. Для предварительного отбора используют стабильные биохимические признаки персиний: наличие уреазы (по расщеплению мочевины), отсутствие ферментации лактозы и триптофана. Первые два теста определяют на среде Ресселя с мочевиной, триптофандезаминазу — за 4 ч в экспрессном тесте Сиволодского. Положительный уреазный и отрицательный лактозный тесты позволяют отличить персиний от других видов патогенных кишечных бактерий — шигелл, сальмонелл, эшерихий и др. Мочевину, как и персиний, гидролизуют бактерии рода *Proteus*, но они, в отличие от персиний, всегда расщепляют триптофан. Псевдотуберкулезные микробы от кишечных персиний отличают по отношению к сахарозе и рамнозе, лизальности псевдотуберкулезным бактериофагом и агглютинабельности соответствующими видовыми сыворотками.

В связи с тем, что результат бактериологического исследования может быть получен слишком поздно, необходимо всегда проводить иммунологическое исследование для обнаружения специфических антител в крови больных. С этой целью используют РНГА или РА. На кафедре микробиологии Военно-медицинской академии разработан и в настоящее время серийно внедрен в практику сухой эритроцитарный псевдотуберкулезный диагностикум. Разработан аналогичный кишечноперсиниозный диагностикум для выявления антител к *Y. enterocolitica* 03 и 09. Диагностическим титром у взрослых считают показатели 1:160-1:200 и выше. Наиболее достоверным в диагностическом отношении считают, как и при других инфекциях, прирост титров антител в 4 и более раз.

В практике также используются РКА, ИФА как для выявления антител, так и для обнаружения антигенов нерсний в биосубстратах. Апробирована полимеразная цепная реакция с целью генотипизации возбудителя псевдотуберкулеза.

КВ настоящее время разработаны аллергодиагностические препараты "псевдотуберкулин" и "энтеронерсин", которые предназначены для постановки внутрикожной аллергической пробы или пробирочного теста ППН (показатель повреждения нейтрофилов). Аллергическая сенсibilизация развивается уже в начале заболевания и длительное время сохраняется. Образование через 24-28 ч в месте введения 0,1 мл аллергена папулы и покраснения диаметром 10 мм и более является положительным результатом кожной аллергической пробы.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ

Характеристика возбудителей

Возбудителями холеры являются бактерии вида *Vibrio cholerae* серогруппы 01 (биоваров *cholerae* и *eltor*, каждый из которых имеет по три серовари: Инаба, Огава, Гикошима), а также серогруппы 0139. Токсигенные (содержащие ген холерного токсина *vc1*) варианты холерных вибрионов 01 и 0139 серогруппы вызывают заболевание холерой, склонные к широкому эпидемическому распространению. Нетоксигенные (не содержащие гена холерного токсина *vc1*) варианты холерных вибрионов 01 и других серогрупп могут вызывать спорадические (единичные) или групповые заболевания (при общем неточичнике инфицирования), не склонные к широкому эпидемическому распространению.

Бактериологический анализ

Бактериологический метод является основным лабораторным исследованием в системе противохолерных мероприятий.

Материалом для бактериологического исследования могут служить испражнения, рвотные массы, желчь, трупный материал, предметы, загрязненные испражнениями, вода, ил, гидробионты, сточные воды, смывы с объектов внешней среды, мухи и др.

Материал для исследования должен быть доставлен не позже, чем через 2 ч после его взятия. В случае удлинения сроков доставки ис-

пользуют транспортные среды. Наиболее удобной и достаточно эффективной является 1% пептонная вода (рН 8,40,2). В пептонную воду в качестве ингибитора сопутствующей микрофлоры может быть добавлен теллурит калия из расчета 1:100000-1:200000 или моющее средство "Прогресс" 0,1%-0,2%.

При наличии у больного диарей материал забирают в количестве 10-20 мл, у больных легкими формами энтерита - 1-2 г испражнений.

Рвотные массы в объеме 10-20 г берут стерильными ложками или стеклянными трубками с резиновой грушей и переносят из лотка в стерильную стеклянную банку или пробирку. Испражнения из судна берут так же, как рвотные массы. У больных с обильным водянистым стулом можно использовать резиновый катетер, один конец которого вводит в прямую кишку, а другой опускают в банку или пробирку.

Взятие испражнений стерильным ректальным тампоном из гипроскопической ваты на деревянном стержне проводят путем введения тампона в прямую кишку на глубину 5-6 см. Стерильную петлю из алюминиевой проволоки смачивают стерильным 0,85% раствором хлорида натрия и вводят в прямую кишку на 8-10 см. Взятый материал переносят во флакон или пробирку с 1% пептонной водой.

Банки, пробирки с материалом закрывают непромокаемыми пробками, пергаментной бумагой, тщательно обрабатывают снаружи салфеткой, смоченной дезинфицирующим раствором, избегая затекания его внутрь. Все пробы этикетировывают, укладывают в специальную металлическую тару, заполняют направление и перевозят на служебном транспорте с сопровождающим.

Воду (питьевую, из поверхностных водоемов и др.) для исследования берут в количестве 1 л на одну пробу в двух объемах по 500 мл в предварительно простерилизованную посуду с непромокаемой пробкой. Из водопроводных кранов отбор проб воды производят после предварительного обжигания их спиртовым факелом и спуска воды в течение 10 мин. Гидробионтов (рыб, лягушек и др.) в закрытых банках, ведрах и других сосудах доставляют в лабораторию. Их можно исследовать групповым методом, объединяя в один посев содержимое кишечника от 10-15 экземпляров, отловленных на одном участке водоема. В этом случае они могут быть доставлены в одном сосуде. Смывы с различных объектов окружающей среды берут ватным или марлевым тампоном, смоченным 1% пептонной водой с поверхности площадью 0,5x0,5 м². Тампон опускают во флакон или пробирку с 1% пептонной водой. Для сбора мух расставляют мухо-

ловки, в которые наливают 1% пептонную воду с 1% сахара. Остатки пищи в очаге и по показаниям пищевые продукты отбирают по 200 г плотных и 0,5 л жидких, помещают в стеклянную посуду и закрывают. Пробы из внешней среды этикетировуют, заполняют направление и отправляют в лабораторию с нарочным.

Порядок исследования

Все посевы инкубируют при $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Посевы материала выращивают в 1% пептонной воде 6-8 ч, в пептонной воде с теллуридом калия 12-18 ч, на щелочном агаре - не менее 14-16 ч, на плотных элективных средах - 18-24 ч. Теллурид калия следует добавлять в 1% пептонную воду с рН не ниже 8,30,1 до внесения в него исследуемого материала.

Исследование материала от больных, трупов и подозреваемых на вибрионосительство проводится поэтапно.

I этап. Испражнения, рвотные массы, а также содержимое кишечника, желчного пузыря и суспензия из кусочков слизистой кишечника трупа засевают в 50-100 мл накопительной среды (1% пептонной воды и др.) и петлей - на щелочной агар и одну из элективных сред (TCBS, СЭДХ, Монсура и др.); при исследовании материала от больных, подозрительных на заболевание холерой, не допускается использование 1% пептонной воды с теллуридом калия в качестве накопительной среды. У больных с подозрением на холеру применяют ускоренные методы исследования нативного материала - МФА, иммобилизации, РНГА (бактериоскопия мазков и препаратов "висячей капли" из нативного материала проводить нецелесообразно). При исследовании материала от подозреваемых на вибрионосительство испражнения засевают в 50 мл среды накопления при индивидуальных анализах, в 100 мл - при групповых; материал, доставленный в 5 мл 1% пептонной воды, полностью используют для посева в 50 мл среды накопления.

II этап (через 6-8 ч от начала исследования). С первой среды накопления производят высев на щелочной агар и в 5-8 мл второй среды накопления; пересевы в жидкие и на плотные среды делают с поверхности жидкой среды; если на первом этапе при исследовании нативного материала от больного ускоренными методами получены положительные результаты, то исключается вторая накопительная среда; при отрицательных результатах ускоренных методов исследования нативного материала их повторяют в случае необходимости после 6 ч инкубации с первой среды накопления.

III этап (через 12-14 ч от начала исследования). Высев со второй

среды накопления на щелочной агар.

IV этап (через 18-24 ч от начала исследования). Проводится отбор подозрительных на холерный вибрион колоний в посевах на плотные среды нативного материала и высевах с первой и второй сред накопления. При исследовании материала от больного, подозрительного на заболевание холерой, отбор колоний можно начинать уже на III этапе, в остальных случаях - по истечении 18-24 ч инкубирования посевов. 1. Чашки с посевами просматривают в проходящем свете невооруженным глазом или с помощью лупы, а также (особенно в вечернее и ночное время) под стереоскопическим микроскопом в косопроходящем свете и отбирают колонии для выделения и идентификации культуры. Колонии холерных вибрионов в типичной S-форме круглые, гладкие, плоские, голубоватые, однородные, с ровными краями, прозрачные - в проходящем свете и серо-голубые - под стереоскопическим микроскопом. Колонии на элективных средах TCBS и СЭДХ имеют ярко-желтую окраску на зеленом фоне среды. На среде Монсюр колонии бесцветные, полупрозрачные с темным центром. Размеры колоний через 10-12 ч инкубации 1 мм, через 18-24 ч достигают 2-3 мм в диаметре. В отдельных случаях в посевах могут встречаться атипичные колонии: мутные с плотным центром, пигментированные (коричневые или светло-желтые), мельчайшие коккоподобные, шероховатые. 2. При отборе колоний можно использовать пробу на индофенолоксидазу с использованием однокомпонентного реактива (без альфа-нафтола) или индикаторных бумажек СИВ-1 (набор для индикации вибрионов). Колонии отсеивают сразу после появления положительной реакции. С колониями на элективных средах не рекомендуется ставить пробу на оксидазу. Подозрительные колонии проверяют в реакции агглютинации на стекле (далее "слайд-агглютинация") с сывороткой холерной 01 в разведении 1:50-1:100. При положительной реакции и достаточном количестве подозрительных колоний ставят слайд-агглютинацию с вариантспецифическими сыворотками Инаба и Огава, и готовят мазки для окраски по Граму и обработки люминесцирующей сывороткой. При отрицательных результатах колонии, обнаруженные в посевах материала от больных, проверяют с холерными сыворотками 0139 и RO в слайд-агглютинации. Положительная ориентировочная реакция агглютинации с холерной 01 сывороткой в разведении 1:100 и вариантспецифической в разведении 1:50 или положительная реакция с люминесцирующими агглютинами в сочетании с морфологическими, культуральными признаками и специфичес-

кой иммобилизационной позволяют выдать предварительный ответ об обнаружении в исследуемом материале холерного вибриона 01 или 0139 серогруппы. Подозрительные на вибрионы колонии, агглютинирующиеся и не агглютинирующиеся холерными 01, 0139 сыворотками, отсеивают на одну из полуглюкозных сред (лактозо-сахарозная, Ресселя, Клингера или др.) и на сектор чашки щелочного агара для выделения чистой культуры и ее идентификации.

V этап (через 24-36 ч от начала исследования). Отбор культур для идентификации. На полуглюкозных средах отбирают культуры с типичными для вибрионов признаками: на двууглеводных средах наблюдается характерное для кислой реакции изменение цвета столбика при сохранении цвета скошенной части без газа, трехуглеводная среда Клингера полностью желтеет без образования газа и сероводорода. Культуры, дающие характерные изменения на полуглюкозных средах и положительные в пробе на оксидазу, проверяют в ориентировочной реакции агглютинации с холерными сыворотками 01, 0139, Инаба, Огава. При отрицательных результатах с этими сыворотками ставят слайд-агглютинацию с холерной сывороткой 0139. На основании положительных результатов агглютинации с сыворотками 01, Инаба, Огава или 0139 выдают предварительный положительный ответ. Далее с оксидазопозитивными культурами, агглютинирующимися и не агглютинирующимися сыворотками 01 и 0139 серогрупп, ставят тесты для окончательной идентификации по сокращенной или полной схеме. Сокращенная схема идентификации предусматривает постановку развернутой реакции агглютинации с сыворотками 01 Огава, Инаба; пробу с диагностическими фагами С и зльтор; определение группы Хейберга.

Полная схема идентификации включает дополнительно тесты на определение бноваров: геммагглютинации, чувствительности к полимиксину, темодины по Грейгу, реакции Фогеса - Проскауэра. Для подтверждения принадлежности холерных вибрионов к серогруппе 0139 достаточно положительного результата в слайд-агглютинации.

Культуры, имеющие признаки вибрионов по морфологии, тесту на гидрофенолоксидазу и ферментативной активности на полуглюкозной среде, не агглютинирующиеся на стекле холерными сыворотками 01 и 0139 серогрупп, выделенные от больных острыми кишечными инфекциями, изучают по тестам, определяющим принадлежность к роду *Vibrio* и виду *V. cholerae* и в пробе с диагностическими фагами (табл. 22).

VI этап (через 36–48 ч от начала исследования). Учитывают результаты идентификации и выдают окончательный ответ о выделении культуры холерного вибриона соответствующей серогруппы. На культуры, имеющие характерные для вибрионов морфологические и культуральные признаки, относящиеся к первой группе по Хейбергу (маниноза +, сахароза +, арабиноза -), агглютинирующиеся сывороткой серогруппы O1 и вариантспецифическими сыворотками (Итаба, Огала) не менее чем до 1/2 титра, лизирующимися и не лизирующимися холерным и эльтор-фагами, а также на культуры, агглютинирующиеся сывороткой O139, выдают окончательный ответ. Для холерных вибрионов O1 серогруппы указывают биовар на основании чувствительности к одному из диагностических фагов (эльтор или холеры) и (или) по дополнительным признакам для фагорезистентных культур (табл. 23). Культуры холерных вибрионов O1 и O139 изучают по гемолитической активности в пробе Грейга и чувствительности к антибиотикам, ис-

Таблица 23

Дифференциации биоваров *V.cholerae* O1

Признаки	Биовары <i>V.cholerae</i> O1	
	elto	chol
Лизисность инкубации elto cholerae	+	-
Чувствительность к 30 F ₂ /мл эльторфага	-(+)	+
Образование прототипаколоний	++	-

Обозначения см. табл. 22.

пользуемым в клинической практике для лечения холеры. Токсигенные штаммы холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, как правило, не лизируют эритроциты барана, в отличие от гемолизирующих нетоксигенных штаммов. Определение вирулентности культур холерных вибрионов серогруппы O1 проводят комплексным методом в соответствии с наставлением к препаратам фагов ХДФ. В специализированных лабораториях изучают культуры холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп на токсигенность методом молекулярного зондирования или в полимеразной цепной реакции (ПЦР) на наличие гена холерного токсина (*vct*-гена) и определяют продукцию токсина холергена на экспериментальных животных.

Во всех случаях выделения атипичных культур (по культуральным, антигенным, биохимическим признакам и флорорезистентности) обязательно изучение их по ряду дополнительных признаков, определяющих принадлежность к роду *Vibrio* и виду холерных вибрионов (определение декарбоксилазы лизина, орнитина, дигидролазы аргинина, оксидазы, ферментации и окисления глюкозы на среде Хью - Лейфсона и др.). Для культур холерных вибрионов, агглютинирующихся только RO сывороткой, обязательно дополнительное подтверждение специфичности их взаимодействия в реакции иммобилизации вибрионов или преципитации в теле. К виду *V. cholerae* относят грамтрицательные, аспорогенные полиморфные палочки, слегка изогнутые или прямые, активно подвижные, с одним полярно расположенным жгутиком, образующие индофенолоксидазу, ферментирующие глюкозу в анаэробных условиях и окисляющие ее в аэробных условиях до кислоты (без газа), декарбоксилирующие лизин и орнитин, но не обладающие дигидролазой аргинина, относящиеся к 1-й (реже ко 2-й) ферментативной группе по Хейбергу (см. табл. 24). При выделении от больного или вибриононосителя культуры холерного вибриона, не агглютинирующегося холерными сыворотками (01 и 0139), выдают ответ о выделении холерных вибрионов "не 01" и "не 0139" серогрупп (так называемых НАГ-вибрионов). При наличии вибрионных агглютинирующих сывороток определяют принадлежность их к другим серогруппам.

Для ускоренной идентификации культур отдельную колонию или чистую культуру отсеивают в 3 мл питательного бульона и после 3-часовой инкубации изучают по тестам: агглютинабельности O-холерными диагностическими сыворотками в 1% пептонной воде, чувствительности к холерным диагностическим бактериофагам, принадлежности к ферментативной группе по Хейбергу (используя среды Гисса в объеме 1 мл с учетом результатов через 3-6 ч инкубации при 37°C).

Схема анализа объектов окружающей среды отличается от схемы исследования материала от больных только на I этапе по методике посева материала на среды накопления.

Методы ускоренной диагностики

Метод флуоресцирующих антител. Для выявления холерных вибрионов серогруппы 01 применяют прямой метод в соответствии с "Наставлением по применению сыворотки холерной люминесцирующей". Для выявления холерных вибрионов серогруппы 0139 исполь-

зуют непрямой МФА, который описан в "Наставлении по применению сыворотки диагностической антицидовой против иммуноглобулинов человека (или различных животных) люминесцирующей".

Реакция непрямой геммглоитинизации (РНГА). Используется для выявления холерных вибрионов по методике, изложенной в "Наставлении по применению диагностикума холерного эритроцитарного антигенового".

Реакция объемной агглютинации (РОА). Для обнаружения холерных вибрионов реакция ставится по типу РНГА в соответствии с наставлением по применению холерного иммуноглобулинового диагностикума на основе полимерных микросфер.

Метод иммобилизации вибрионов специфической холерной O-сывороткой. На предметное стекло вносят по одной капле испражнений, рвотных масс или верхнего слоя пептонной воды. Первую каплю накрывают покровным стеклом (контроль), ко второй добавляют каплю 01 сыворотки в разведении 1:100, перемешивают и также накрывают стеклом. Раздавленную каплю смотрят под микроскопом при увеличении 400-600х, используя фазово-контрастное устройство или конденсор темного поля. При наличии в исследуемом образце холерных вибрионов в первой капле наблюдают характерную подвижность, во второй - иммобилизацию отдельных микробных клеток и образование микроагглютинатов немедленно или в течение 1-2 мин. В случае неспецифического взаимодействия наблюдается образование мелких подвижных конгломератов при активной подвижности отдельных клеток. Реакция иммобилизации специфическая и позволяет дать первый сигнальный ответ через 15-20 мин от начала исследования. При отрицательном результате необходимо провести такое же исследование с холерной сывороткой, которую разводят 1:5, 0139 серогруппы.

Иммунологические исследования

Данные методы исследований имеют дополнительное значение, и лишь в отдельных случаях результаты их могут быть решающими в ретроспективной диагностике заболеваний. Для этиологической диагностики используют иммунологические реакции, выявляющие в сыворотке больных, переболевших, вибрионосителей, вакцинированных специфические антитела: агглютинины, вибриоцидины, антитоксины. У больных холерой на 5-7-й день заболевания появляются агглютинины и вибриоцидные антитела в высоких титрах. Титры антитоксинов нарастают медленнее. Исследуют парные сыворотки.

Определение агглютининов методом размерной реакции агглюти-

ници. Исследуемую сыворотку разводят 1% пептонной водой (рН 7,5) в объеме 1 мл от 1:10 до 1:640, в качестве антигена используют 3-часовую бульонную культуру. В пробирки с растертванной сывороткой вносят по 1 капле культуры-антигена и ставят на час в термостат, затем до утра в холодильник при 40,5°C, после чего отмечают результаты. Реакция сопровождается контролями антигена и сыворотки. Результат в разведении 1:40 и выше считается ориентировочно положительным. Диагностическое значение имеет 4-кратное нарастание титра антиген.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) с антигениым холерным эритроцитарным диагностикумом. Ставится по методике, изложенной в наставлении к препарату.

Реакция нейтрализации антигена (РНАг) для выявления антител с использованием холерного иммуноглобулинового эритроцитарного диагностикума. Методика ее постановки изложена в наставлении к диагностикуму. Диагностическое значение имеет не менее чем 4-кратное нарастание титров антиген при исследовании парных сывороток в РНГА и РНАг.

Определение вибрицидных антител в сыворотке крови (РВА). Принцип метода во всех его вариантах заключается в том, что в присутствии вибрицидных антител не происходит развожения холерных вибрионов.

РНГА с эритроцитарным холерным токсигенотоксическим диагностикумом. Предназначена для определения в сыворотке больных холерой, вибрионосителей и привитых холерогенанатоксином антител, нейтрализующих холерный токсин. Токсинейтрализующие антитела появляются на 5-6-й день болезни, достигают максимума на 14-21-й день. Диагностическим титром следует считать 1:160. Этой реакцией можно также выявлять токсинейтрализующие антитела в сыворотке крови больных и вибрионосителей, у которых инфицирование обусловлено холерными вибрионами серогруппы 0139.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЧУМЫ

Чума - острое инфекционное заболевание, вызываемое микроорганизмом *Yersinia pestis*. Заболевание относится к особо опасным и карантинным инфекциям, является трансмиссивным зоонозом. При заражении человека в природных очагах развивается бубонная или септическая форма чумы, которая может осложняться вторичной легочной чумой. При заражении от больных вторичной легочной формой возникает первичная легочная чума.

Целью микробиологического исследования является: 1) установление диагноза заболевания у человека и проверка эффективности лечения; 2) выявление инфицированности животных и переносчиков возбудителя в природных очагах; 3) установление зараженности объектов внешней среды. Первый случай заболевания человека чумой должен быть обязательно подтвержден бактериологически.

Материал для исследования: 1) от больного кровь, мокрота, содержимое bubona; 2) от трупа содержимое bubona, кровь, регионарный лимфатический узел, кусочки печени, селезенки, легкого; 3) грызуны, отловленные живыми, или трупы новых грызунов; 4) эктопаразиты, собранные из нор или при очесывании грызунов; 5) объекты внешней среды (вода, воздух, пищевые продукты, смывы с поверхности).

Взятый материал помещают в стеклянную банку с притертой пробкой, обвязывают вощаной бумагой. Банку снаружи обтирают 5% раствором лизола, наклеивают этикетку, где указывают дату, место взятия и характер материала, фамилию больного, диагноз. Банки плотно укладывают в герметическую тару, на крышке указывают "верх". Персонал, проводивший забор материала и его упаковку, проходит полную санитарную обработку.

Материал доставляют в лабораторию с ярлычком, которому дают опись материалов, направляемых на исследование.

При работе с материалом, содержащим возбудителей чумы или подозрительным на наличие чумного микроба, а также при уходе за больными чумой, их лечении и проведении других мероприятий нужно особенно тщательно соблюдать меры безопасности.

Взятие и доставка материалов в лабораторию должны проводиться в противочумном костюме.

В микробиологической диагностике чумы используют экспрессные, ускоренные и классические методы исследования. Экспрессные методы: метод флуоресцирующих антител (МФА), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), реакция нейтрализации антител (РНГАт). Ускоренными методами являются: 1) использование чумного бактериофага в момент посева исследуемого материала; 2) поэтапное исследование биопробных животных; 3) постановка биопробы на животных с ослабленной резистентностью.

Классический метод включает бактериоскопию, бактериологическое исследование, биологическую пробу и иммунологические (сериологические) исследования.

Бактериоскопический метод. Из поступившего в лабораторию ма-

териала готовят 5-6 мазков на стерильных предметных стеклах, фиксируют в смеси Никифорова или в этиловом спирте - 20 мин. Один мазок окрашивают по Граму, второй - метиленовым синим и третий - люмолиспирующими чумными иммуноглобулинами, 2-3 мазка являются резервными. Обнаружение в мазках характерных биполярно окрашенных грамтрицательных бактерий, с учетом эпидемиологических и клинических данных, позволяет поставить предварительный диагноз.

Бактериологический метод. Для посева используют агар Хоттингера (рН 7,1-7,2), к которому добавляют стимуляторы роста чумного микроба: сульфит натрия, цельную кровь - 0,1-0,2% или гемолизированную - 1-2%, стимулятор Карпузиды (экстракт культуры сарцины). Для подавления роста других микроорганизмов в среду добавляют ингибитор генцианвиолет в концентрации 1:50000 - 1:100000.

Посевы выращивают в термостате при температуре 28°C и 37°C.

Через 18-20 ч, просматривая посевы при малом увеличении микроскопа, на поверхности питательной среды можно обнаружить микроколонии, представляющие собой блестящие полиморфные образования, похожие на осколки мелко истолченного стекла (фаза "битого стекла"). В дальнейшем, по мере их роста (через 48 ч), начинают формироваться выпуклый центр колонии, окруженный тонкой полупрозрачной зоной с неровным зубчатым краем, похожим на кружево (фаза "кружевных платочков").

Из колонии готовят мазки, окрашивают метиленовым синим и по Граму. Убедившись в однородности колонии и обнаружив микробы типичной овоидной формы с биполярной окрашенностью, производят посев на скошенный агар и в мясо-пептонный бульон для выделения возбудителя чумы в чистой культуре.

После накопления культуры в достаточном количестве выделенный микроорганизм идентифицируют от *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* (табл. 24).

Биологический метод. Для заражения используют морских свинок, реже - белых мышей. Из материала, если он достаточно свежий, готовят эмульсию, которую вводят подкожно или внутрибрюшинно. В тех случаях, когда материал загрязнен посторонними микроорганизмами, заражение производят путем втирания в скарифицированную кожу живота морской свинки. При наличии в исследуемом материале возбудителей чумы у животных развивается острый инфекционный процесс, при внутрибрюшинном заражении морские свинки гибнут через 2-3 дня, а при подкожном - через 5-7 дней. Пав-

Дифференциация *Y. pestis* от *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*

Признаки	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
Подвижность при 25°C и при 38-37°C	+	+	+
Формовые и обрешеченные включения в ядре в цитоплазме в вакуолях	-	+	+
Окрашивание: уксусная сернистая, диоксида железа	-	-	+
Наличие цитраты I	+	-	-
Наличие индолного запаха	+	-	-
Наличие восточной I	+	-	-
Наличие индолсульфата	+	-	-
Флюоресценция	+	-	-
Чувствительность к триптофан-гидролизатору	+	-	-
Вариабельность	в H-форме	в S-форме	в S-форме

ших животных вскрывают, изучают патологоанатомические изменения органов и тканей, а из лимфатических узлов, селезенки, печени, легкого и крови готовят мазки-отпечатки и мазки и делают высев на ингаляционные среды.

У животных, павших от чумы, на месте введения материала образуется геморрагический отек, а нередко и некроз, регионарные лимфатические узлы увеличены и гиперемизированы, селезенка и печень поликровные, увеличены. В полости плевры и перикарда кровянистая жидкость. В мазках-отпечатках обнаруживается большое количество биполярно окрашенных грамотрицательных овальных палочек.

Трупы лабораторных животных и полевых грызунов погружают в 5% раствор лизола, а затем сжигают.

Иммунологические методы. Для этой цели используют РНГА, реакцию нейтрализации антигена (РНАг) непрямой вариант МФА. Разработан и метод иммуноферментного анализа.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

Сибирская язва - острое инфекционное заболевание, поражающее домашних и диких животных. От больных животных заражаются люди; заражение происходит путем прямого контакта человека с больным животным или с сырьем.

Возбудитель сибирской язвы - *B. anthracis* - крупная неподвижная палочка, по Граму красится положительно, в мазках располагается попарно или цепочкой. Палочка способна образовывать споры овальной формы с центральным расположением. В живом организме палочка образует капсулу; на обычных питательных средах капсулообразования не происходит, для этого необходимы специальные среды.

Микроб сибирской язвы хорошо растет на обычных питательных средах. На МПБ рост придонный в виде комочка ваты, среда остается прозрачной. При посеве уколом в столбик желатинны растет в виде нежных нитей, общая картина роста отдаленно напоминает елочку, опрокинутую верхушкой вниз. Температурный оптимум 37°C, но может расти при температурах от 5 до 41°C. Ферментативная активность микроба значительная. Разлагает до кислых продуктов без газообразования лактозу, глюкозу и мальтозу, вызывает покраснение лакмусового молока, на 2-5-е сутки разжижает желатину. На кровяных средах эритроциты не гемолизирует.

В зависимости от пути инфицирования заболевание у человека может протекать в виде кожной, реже легочной и еще реже кишечной формы сибирской язвы.

Для точного подтверждения диагноза сибирской язвы у человека необходимо бактериологическое исследование.

Материалом для исследования при кожной форме служит содержимое везикул, пустул, карбункула или отделяемое язвы. Перед взятием материала кожу очищают спиртом вокруг пораженного места и берут содержимое стерильной пастеровской пипеткой, тонкий конец которой затем запаивают. Если под рукой нет пипетки, рекомендуется прокипятить кусочек нитки, опустить ее в открытую пустулу и пропитать содержимым; нитку помещают в пробирку, которую закрывают пробкой.

При кишечной форме берут испражнения больного. При легочной форме материалом для исследования служит мокрота.

Во всех случаях при подозрении на сибирскую язву от больного следует взять кровь.

Трупы людей и сельскохозяйственных животных, погибших от

сибирской язвы, вскрывать запрещено, т.к. при этом всегда происходит рассеивание возбудителя. От таких трупов рекомендуется брать на исследование кровь из поверхностных кровеносных сосудов. От трупов павших животных рекомендуется брать ухо, помещая его в банку, а место разреза на туше прижигать пламенем паяльной лампы или крепким раствором карболовой кислоты.

Пробы из объектов внешней среды (пищевые продукты, вода, почва) направляют в стерильных стеклянных банках. Пробы воздуха берут на фильтры и направляют в лабораторию. Исследованию также подлежат образцы кож, шерсти, щетины и другие материалы, изготовленные из подозрительного сырья.

Все банки и пробирки закрывают пробками, которые заливают парафином и обвязывают двойной парафиновой, восковой или пергаментной бумагой. Все объекты исследования должны иметь этикетки, на которых указывают, какой материал, место и время взятия, от кого взят материал. Материалы, направляемые в лабораторию, плотно укладывают в металлический или деревянный ящик. Ящик перевязывают шпагатом и пломбируют. На крышке ящика делают надпись: "Верх, не кантовать" и с нарочным отправляют в лабораторию.

Бактериологическая диагностика сибирской язвы включает следующие этапы: 1) бактериоскопия нативного материала; 2) выделение чистой культуры возбудителя и его идентификация; 3) заражение восприимчивого животного (биопроба); 4) реакция термопреципитации по Асколи.

Бактериоскопический метод

Из доставленного в лабораторию материала (мокрота, кровь и др.) готовят мазки - по 4 препарата из каждой пробы. Фиксированные мазки окрашивают по Граму, по Романовскому - Гимзе, раствором Ребигера и сибиреязвенной люминесцирующей сывороткой.

Для приготовления раствора Ребигера 15-20 г генианвиолета растворяют в 100 мл 40% формалина, выдерживают несколько часов при комнатной температуре, фильтруют. Раствор одновременно фиксирует и красит препарат. Мазок окрашивают этим раствором 15-20 с, промывают водой, высушивают. Бациллы окрашиваются в фиолетовый, а капсулы - в красно-фиолетовый цвет.

Для обнаружения спор один из мазков можно окрасить по методу Ожешко. Если при бактериоскопии мазков обнаруживаются крупные (длиной 10 мкм) грамположительные палочки, расположенные

попарно или короткими цепочками, окруженные капсулами, ставят предварительный бактериоскопический диагноз сибирской язвы.

При исследовании объектов внешней среды (воздух, вода, смывы с поверхностей, зараженных микробами, и пр.) в целях ускоренной индикации из взятых проб готовят мазки, фиксируют и обрабатывают люминесцирующей сибирезверной сывороткой. После 15-20-минутной экспозиции препарата при температуре 37°C мазок тщательно промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют в люминесцентном микроскопе. Обнаружение специфического свечения микробов является основанием для предварительного диагноза сибирской язвы. Окончательное бактериологическое заключение выдают только после выделения возбудителя сибирской язвы в чистой культуре и его идентификации. Всегда следует помнить, что в природе широко распространены так называемые антраксы, имеющие сходные с *B. anthracis* морфологические, тинкториальные и культуральные свойства.

Бактериологический метод

Исследуемый материал засевают на чашки с МПА и кровяным агаром. Чашки помещают в термостат при температуре 37°C на 18-20 ч. Если в исследуемом материале есть возбудитель сибирской язвы, на поверхности агара вырастают характерные кружные, шероховатые матовые колонии с неровным локообразным краем ("голова медузы"). Такие колонии необходимо изучать через микроскоп при малом увеличении, в этом случае более отчетливо обнаруживаются особенности структуры края колонии.

Возбудитель сибирской язвы хорошо растет на кровяном агаре, но эритроциты не гемолизует, в то время как антраксы гемолизуют кровь и образуют вокруг колонии большую зону просветления среды.

При посевах образца, загрязненного посторонними микроорганизмами, рекомендуется исследуемый материал прогреть на водяной бане при 70°C в течение 20 мин, чтобы инактивировать вегетативные формы микробов. Затем прогретый материал, в котором, возможно, сохранились споры, высевают на питательные среды.

Биологический метод

Исследуемый материал, а также выделенную чистую культуру эмульгируют в физиологическом растворе и вводят подкожно в сле-

дующих дозах: мышам у корня хвоста - 0,1 мл; морским свинкам под кожу спины - 0,2 мл; кроликам - 0,5-3 мл.

Животные погибают через 24-36 ч от острой септицемии. Трупы их вскрывают, кровь из сердца, кусочки селезенки высевают на питательные среды, кроме того, из крови и селезенки готовят мазки, окрашивают по Романовскому - Гимзе (микробы красятся в темно-синий цвет, а капсулы - в розовый) и сибирезвешенной люминесцирующей сывороткой.

Микробную культуру идентифицируют на основании суммы признаков (табл. 25). Крупные грамположительные неподвижные палочки способны в соответствующих условиях образовывать капсулы и споры, не гемолизуют эритроциты, имеют характерные признаки роста на МПБ и МПА, дают положительную пробу с бактериофагом, ярко светятся при обработке сибирезвешенной люминесцирующей сывороткой, идентифицируются как *B. anthracis*.

Таблица 25

Признаки *B. anthracis*, ложносибирезвешенных микробов и антраксов

Название микроба	Подвижность	Капсула	Рост в бульоне	Гемолиз	Люминесценция сыворотки	Патогенность для животных
<i>B. anthracis</i>	-	+	В виде тонкой пленки на дне, буillon прозрачен	-	Краснеет	Патогенна
<i>B. pseudanthracis</i>	Слабая	-	Буillon мутнеет, на дне кристаллический осадок, пленка на поверхности	+	Светлеет	В больших дозах иногда патогенна для кроликов
<i>B. anthracoides</i>	Слабая	-	Буillon мутнеет, на дне кристаллический осадок, пленка на поверхности	+	Светлеет	В больших дозах иногда патогенна для мышей
<i>B. subtilis</i>	+	-	Палочки во взвешенности, среда мутная	-	Светлеет	Непатогенна

Метод определения сибирезвешенного антигена

В шерсти, коже и органах животных, погибших от сибирской язвы, содержится сибирезвешенный антиген, характеризующийся высокой термостабильностью. В тех случаях, когда выделить возбудитель из исходного материала трудно или невозможно (загрязненность материала,

гнилостное разложение, термическая обработка и т.д.), а также для целей санитарного контроля за поступающим на ряд производств животным сырьем широко применяют реакцию преципитации по Асколи.

Сибирезвеньный термостабильный антиген из исследуемого материала экстрагируют физиологическим раствором. Для экстрагирования используют "холодный" или "теплый" методы. "Холодным" методом обычно экстрагируют антиген при массовом исследовании кожи и сырья. Такие образцы (размер 5-6 см) стерилизуют в автоклаве, измельчают, взвешивают и разводят десятикратным весом количеством физиологического раствора. Материал оставляют при температуре 6-16°C на 20-24 ч, а затем фильтруют через асбестовую вату.

В некоторых случаях исследуемый материал заливают тройным объемом 0,5% раствора уксусной кислоты и кипятят 15 мин. При такой обработке происходит более полное извлечение антигена.

Из тканей павшего животного или погибшего от сибирской язвы человека антиген извлекают кипячением исследуемого субстрата в физиологическом растворе с последующим фильтрованием.

Во всех случаях антиген представляет собой коллоидный прозрачный раствор.

Сибирезвеньную преципитирующую сыворотку получают путем гипериммунизации лошадей сибирезвеньной вакцинной СТИ или убитой культурой сибирезвеньного микроба.

Экстракт исследуемого материала и преципитирующая сыворотка должны быть обязательно прозрачными.

В пробирки малого диаметра (можно приготовить из пастеровских ampulek) вносят по 0,2 мл преципитирующей сыворотки, а затем осторожно по стенке пробирки насаивают на сыворотку 0,3 мл прозрачного экстракта исследуемого материала. Если в исследуемой жидкости имеется сибирезвеньный антиген, на границе соприкосновения исследуемого экстракта и иммунной сыворотки в течение 2-5 мин образуется тонкое кольцо преципитата (помутнение жидкости).

Для того, чтобы избежать ошибочной оценки результатов исследования, реакцию преципитации сопровождают многочисленными контролями:

- 1) преципитирующая сыворотка + экстракт из заведомо сибирезвеньного материала;
- 2) преципитирующая сыворотка + экстракт из заведомо несибирезвеньного материала;
- 3) преципитирующая сыворотка + физиологический раствор;

- 4) нормальная лошадиная сыворотка + исследуемый экстракт;
- 5) нормальная лошадиная сыворотка + экстракт из заведомо сибиреязвенного материала;

б) нормальная лошадиная сыворотка + физиологический раствор.

Первый контроль должен быть всегда положительным, все остальные - отрицательными. Только при правильной работе контролей можно оценивать результаты преципитации по Асколи.

Аллергический метод

Организм больного и переболевшего сибирской язвой человека, а также привитого вакциной СТИ реагирует местной аллергической реакцией на внутрикожное введение антракенина.

Антраксин - белково-полисахаридно-нуклеиновый комплекс, полученный гидролизом вегетативных форм сибиреязвенных бактерий.

Препарат вводят внутрикожно в ладонную поверхность предплечья в объеме 0,1 мл. Через 24 ч при положительной пробе обнаруживается воспалительная реакция на месте введения антракенина. Зона воспаления более 15 мм.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ТУЛЯРЕМИИ

Туляремия - острое инфекционное заболевание зоонозной природы, возбудителем которого является бактерия *Francisella tularensis*.

Материал для исследования: 1) от больного человека в зависимости от клинической формы заболевания берут пунктат из бубона, кровь, гнойное отделяемое конъюнктивы, содержимое пустулы или кожной язвы, мазок из зева; 2) органы павших или больных грызунов; 3) переносчики возбудителя - комары, слепни, клещи; 4) объекты внешней среды - воздух, вода, пищевые продукты.

Взятие материалов и их доставку в лабораторию осуществляют, строго соблюдая правила работы с возбудителями особо опасных инфекций.

Для практической диагностики туляремии у людей применяют следующие методы.

1. Иммуномикробиологический (серологический) метод:

- реакция агглютинации;
- кровинно-капельная реакция.

2. Аллергический метод - внутрикожная или накожная проба с тулярином.

3. Бактериологический и биологический методы - только в специализированных лабораториях.

Иммунологический метод

Реакция агглютинации. Обнаружение специфических антител в сыворотке крови больного возможно с 10-12-го дня болезни.

Антигеном для диагностики в реакции агглютинации служит туляремиальный диагностикум, в 1 мл которого содержится 10 млрд. КОЕ, убитых формалином.

Перед употреблением антиген разводят в 10 раз физиологическим раствором для получения суспензии, содержащей в 1 мл 1 млрд. КОЕ.

Реакцию ставят с сывороткой крови больного, которая должна быть совершенно прозрачной. Сыворотку разводят изотоническим раствором хлористого натрия в объеме 0,5 мл, начиная с 1:12,5 и до 1:400. Во все пробирки добавляют по 0,5 мл диагностикума. Таким образом получают разведения сыворотки 1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400; 1:800. Контролями в реакции служат 0,5 мл антигена с 0,5 мл изотонического раствора хлористого натрия и исходное разведение сыворотки. Штатив с пробирками после встряхивания помещают в термостат при комнатной температуре до следующего дня.

Оценку результатов реакции производят невооруженным глазом на основании степени прозрачности жидкости в пробирках и количества осевшей на дне микробной массы (агглютината).

Диагностическое значение имеет положительный результат реакции агглютинации при разведении сыворотки 1:100 и выше, однако обязательно должно быть прослежено нарастание титра агглютининов в парных сыворотках.

Кровяно-капельная реакция. Применяют для ускоренной диагностики туляремии. На тщательно обезжиренное предметное стекло берут каплю крови из пальца больного. Рядом выносят каплю туляремиального диагностикума. Кровь смешивают с диагностикумом. Эритроциты гемолизируются в дистиллированной воде. При наличии в крови агглютининов в достаточно высоком титре (не менее 1:100) немедленно наступает агглютинация - результат положительный.

Сомнительный результат - агглютинация наступает в течение 2-3 мин (при наличии в сыворотке крови агглютининов в титре 1:50). Отрицательный результат - агглютинация после смешивания крови с антигеном не наступает.

Аллергический метод

Этот метод основан на специфических особенностях организма человека, больного или переболевшего туляремией, отвечать местной аллергической реакцией в виде гиперемии и инфильтрата на введение тулярина.

Аллергическая реактивность организма развивается на 4-6-й день болезни и сохраняется многие годы, благодаря чему аллергический метод служит как для ранней, так и для ретроспективной диагностики туляремии.

Аллергическая проба ставится как накожно, так и внутрикожно.

Для внутрикожной пробы применяют тулярин, в 1 мл которого содержится 100 млн. КОЕ, убитых нагреванием.

Тулярин вводят шприцем с тонкой иглой в количестве 0,1 мл строго внутри кожи ладонной поверхности предплечья, кожу предварительно обрабатывают спиртом. Реакцию учитывают через 24-48 ч путем осмотра и пальпации участка кожи, куда был введен тулярин. Положительная реакция проявляется в виде выраженного отека (инфильтрата) и гиперемии кожи. Интенсивность реакции оценивают по трехбалльной шкале: диаметр отека и гиперемии менее 1 см - (+), до 2 см - (++) , более 2 см - (+++). Размеры инфильтрата и гиперемии измеряют по двум взаимно перпендикулярным направлениям.

Для накожной пробы используют тулярин, в 1 мл которого содержится 2 млрд. КОЕ термоинaktivированных бактерий. Одну каплю тулярина глазной пипеткой наносят на тщательно обработанную спиртом кожу наружной поверхности левого плеча. Через нанесенную каплю тулярина стерильным оспопрививательным пером делают две параллельные насечки длиной 8-10 мм и плоской стороной оспопрививательного пера втирают каплю тулярина в насечки.

Учет реакции производят через 24-48 ч путем осмотра и измерения инфильтрата и гиперемии. Реакцию считают положительной при величине реагирующего участка кожи в 0,5 см и более.

Культуральный метод

Путем прямого посева исследуемого материала на питательные среды выделить возбудителя туляремии не удается, поэтому исследуемый материал подкожно вводят морским свинкам или белым мышам.

Сроки гибели биопробных животных зависят от инфицирующей дозы. При массовом заражении мыши погибают на 3-4-е сутки, а

морские свинки - на 8-10-е. Если исследуемый материал загрязнен посторонними микроорганизмами, лабораторных животных заражают путем втирания материала в скарифицированную кожу.

У павших животных обнаруживаются гиперемизированные плотные увеличенные лимфатические узлы, уплотнение и увеличение селезенки, увеличение и гиперемия печени. В мазках-отпечатках из лимфатического узла, селезенки, печени, легких и крови, окрашенных по методу Гимзы, обнаруживается большое количество туляремиальных бактерий.

Из внутренних органов павших животных производят высевы в пробирки на полужидкую желточную среду и среду Мак-Коя. Рост туляремиальных бактерий на свернутой желточной среде появляется через 18-24 ч и достигает максимума через 2-3 сут инкубирования в термостате при температуре 37°C. Засеянные питательные среды выдерживают в термостате до 10 сут.

Туляремиальные бактерии растут в виде налета с неровной поверхностью или мелких колоний, похожих на капельки росы. В мазках обнаруживают очень мелкие полиморфные грамотрицательные бактерии.

Идентификацию выделенной культуры проводят в реакции агглютинации с туляремиальной агглютинирующей сывороткой, методом иммунофлуоресценции и в реакции непрямой гематоглютинации.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЕЗА

Туберкулез - общее инфекционное заболевание с преимущественной локализацией процесса в легких. При туберкулезе также поражаются лимфатические узлы, серозные оболочки, пищеварительный тракт, уро-генитальная система, кожа, кости и суставы (туберкулез внелегочной локализации).

Материал для исследования: мокрота, слизь с задней стенки глотки, промывные воды бронхов и желудка, моча, спинномозговая жидкость, плевральный экссудат, гной из абсцессов и др.

Больной собирает мокроту в чистую баночку или карманную плевательницу. Лучшие результаты дают исследования мокроты, выделенной больным в течение полусуток.

На баночку наклеивают бумажку с фамилией и инициалами больного, заполняют специальный сопроводительный бланк (фамилия и инициалы больного, диагноз, группа диспансерного учета, цель исследования) и направляют в лабораторию.

В микробиологической диагностике туберкулеза используют бактериоскопический, бактериологический и биологический методы, а также комплекс иммунологических исследований.

Бактериоскопический метод

Исследуемую мокроту переносят в чашку Петри, с помощью препаровальных игл или пинцета выбирают гнойные комочки и переносят их на середину предметного стекла, накрывают комочек другим предметным стеклом и растирают материал между стеклами. Спинально-мозговую жидкость отстаивают в холодильнике и готовят мазки из нежной пленки фибрина. Мочу центрифугируют и делают мазки из осадка. Препараты обесцвечивают не только кислотой, но и спиртом для дифференциации от *M. zingivatis*, которые могут находиться в моче здоровых лиц. Высушенные мазки фиксируют на пламени, окрашивают по Цилю - Нельсену и растворами флюорохромов. Рекомендуем следующую прописку: аурамин 0,05 г, родамин С - 0,05 г, дистиллированной воды 1000 мл; окрашивать в течение 15 мин при подогревании, мазок промыть водой и погрузить на 30 с в 3% солянокислый спирт, тщательно промыть водой. Если фон мазка сильно флюоресцирует, следует применить в качестве гасителя 0,25% водный раствор метиленового синего, промыть мазок водой, подсушить и микроскопировать в люминесцентном микроскопе. Микобактерии светятся золотисто-желтым светом на темно-зеленом фоне.

В препаратах, окрашенных по Цилю - Нельсену, микобактерии туберкулеза имеют рубиново-красный цвет.

Положительное заключение выдают при обнаружении микобактерий туберкулеза в препарате после просмотра не менее 100 полей зрения; обязательно указывают число микробов в поле зрения. Отрицательный результат микроскопии обязательно должен свидетельствовать об отсутствии микобактерий в исследуемом материале.

В практику микробиологического исследования прочно вошли методы извлечения из мокроты и концентрации возбудителей туберкулеза в малом объеме, что значительно увеличивает возможность обнаружения микобактерий при туберкулезе легких. Наиболее употребительными методами обогащения являются следующие.

Гомогенизация. Собрать в банку суточное количество мокроты и добавить равный объем 1% NaOH, закрыть стерильной резиновой пробкой и встряхивать в вентиль-аппарате до полного разжижения мокроты. Обычно для этого требуется 10-15 мин. Гомогенировал-

ную мокроту переносят в центрифужные пробирки и центрифугируют при 3000 оборотов в минуту в течение 10-15 мин. Жидкость сливают в раствор хлорамин, осадок нейтрализуют 1-2 каплями 10% раствора HCl, из осадка готовят мазки, окрашивают по Цилю-Нельсену и микроскопируют.

Флотация. Мокроту переливают в колбу, прибавляют равный объем 1% раствора NaOH, закрывают резиновой пробкой и встряхивают в шоттель-аппарате до полного разжижения. Колбу помещают в водяную баню 55°C и нагревают в течение 30 мин, а затем добавляют 1-2 капли ксилола или бензина, встряхивают 10 мин, доливают дистиллированную воду до горлышка колбы и оставляют при комнатной температуре на 25-30 мин.

Углекислый газ всплывает на поверхность и увлекает адсорбированные микобактерии. Образуется тонкий слой углекислого газа и возбудителей туберкулеза в горлышке колбы в виде сливкообразного кольца.

На хорошо нагретую водяную баню кладут обычное стекло 20x20 см и на нем раскладывают предметные стекла для мазков. Проволочной петлей в форме улитки берут материал флотационного кольца и наносят на предметные стекла, по мере подсыхания материала добавляют новую порцию извести. Наслоение материала по принципу толстой капли на одно и то же место делают 3-4 раза, каждую каплю подсушивают, прежде чем наносят следующую.

Готовые, хорошо высушенные препараты промывают жиром (огнеопасно!), подсушивают, фиксируют, окрашивают и бактериоскопируют.

Исследование промывных вод бронхов или желудка выполняют после нейтрализации материала 1-2 мл 0,5% раствора NaOH.

Флотация повышает на 10% обнаружение микобактерий туберкулеза в патологическом материале.

Бактериоскопическим методом удается обнаружить возбудителя туберкулеза при содержании в 1 мл патологического материала более тысячи микобактерий.

Бактериологический метод

Все материалы для исследования бактериологическим методом, как правило, содержат постоянную микрофлору, что практически делает невозможным выделить микобактерии в чистой культуре без предварительной обработки материалов. Исключением из этого правила является стерильно взятая спинномозговая жидкость.

С целью уничтожения сопутствующей микрофлоры и гомогенизации мокроты, гноя и других материалов применяют 10% раствор серной кислоты или 10% раствор трехзамещенного фосфорнокислого натрия 1:1.

Жидкие материалы центрифугируют 30-40 мин, осадок обрабатывают серной кислотой в течение 20-30 мин, устанавливают рН среды в пределах 7,2-7,6 и высевают на среду Левенштейна - Йенсена и среду Финн-2.

Засеянные среды инкубируют в термостате при температуре 37°C 3-4 недели. Пробирки со средами, в которые исследуемый материал вносил петлей и втирали в поверхность среды, размещают вертикально; в тех случаях, когда посевы делают пастеровской пипеткой, пробирки помещают в термостат в полугоризонтальном положении на 2-3 сут, и затем вертикально. Все пробки заливают расплавленным парафином или закрывают целлофановым колпачком и уплотняют резиновым кольцом.

Посевы просматривают раз в неделю. Все пробирки, в которых обнаружен рост посторонней микробной флоры, удаляют. Рост микобактерий туберкулеза обычно обнаруживается на 3-й неделе, но иногда через 2,5-3 мес.

Микобактерии туберкулеза формируют колонии на плотных питательных средах с характерными признаками. Они, как правило, сухие, морщинистые, грубые (напоминают бородавки), обычно в R-форме.

S-форма колоний с пигментацией желтого или оранжевого цвета при влажном росте свойственна другим микобактериям.

При учете результатов следует фиксировать обильность и сроки появления роста микобактерий. Эти показатели, определяемые в динамике, имеют эпидемиологическое и прогностическое значение.

Культуры микобактерий туберкулеза, выращенные на питательных средах, микроскопируют. В мазках, окрашенных по Цилю - Нельсену, образуются скопления кислотоустойчивых типичных микобактерий.

В молодых культурах, выделенных из организма больных, леченных антибактериальными препаратами, обнаруживают микроорганизмы с измененной формой (короткие палочки, неправильной формы шары).

В некоторых случаях исследуемый материал высевают на 3-4 пробирки жидкой питательной среды с плазмой крови донора или сывороткой крупного рогатого скота.

Результаты посева учитывают через 10 дней. Берут одну пробирку

и стерилизуют, из осадка готовят мазки, фиксируют, окрашивают и микроскопируют. Отрицательный результат выдают только после инкубирования посевов в термостате в течение месяца. Посторонние микроорганизмы в таких питательных средах растут, размножаются в первые дни культивирования и вызывают помутнение жидкости.

Микобактерии, выращенные на жидкой питательной среде, пересеивают в пробирки с плотной средой. В таких случаях положительные результаты возрастают, но продолжительность исследования увеличивается.

Микобактерии могут размножаться и образовывать микроколонию на стекле. Для этой цели готовят полоски обычного стекла 10 см длиной и 0,9-1 см шириной, моют, обезжиривают, сушат и стерилизуют.

Мокроту больного выливают в чашку Петри, выбирают гнойные комочки, наносят их на полоску стекла и растирают другой такой же полоской так, чтобы получились два мазка, занимающие 2/3 длины стекла. Стекла кладут на стерильную бумагу и подсушивают. Сухие мазки погружают на 15-20 мин в пробирки с 2% раствором серной кислоты, а затем 2-3 раза промывают дистиллированной водой и помещают в жидкую синтетическую или кровяную среду, в которую добавляют 10 ЕД/мл пенициллина. Мазок должен быть полностью покрыт питательной средой. Инкубируют в термостате при 37-38°C. Результаты учитываются на 1-й, 15-й и 30-й день. Каждый раз один такой мазок вынимают из пробирки, высушивают, фиксируют, окрашивают по Цилю - Нельсену или аураминном и микроскопируют. Положительными будут посевы, в которых на стекле выявляются микроскопические колонии в виде "жгутиков", "кос" и "пауков".

Определение лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза

Лекарственную устойчивость микобактерий туберкулеза определяют с помощью бактериологических методов перед началом лечения, затем спустя 3 мес и далее при продолжающемся выделении бактерий туберкулеза через каждые 6 мес. Это делают путем выращивания микобактерий на питательных средах с различным содержанием препарата, к которому определяют устойчивость, и на тех же средах без добавления его (контроль).

Определение лекарственной устойчивости может быть: а) прямое - посев соответственно обработанного патологического материала (мокрота, гной и т.д.) на среды, содержащие лекарственные препараты; б) не-

прямое - пересев предварительно выделенных чистых культур микобактерий туберкулеза на среды, содержащие лекарственные препараты.

Прямой способ более эффективен, но им можно пользоваться, если микобактерии обнаруживаются в материале бактериоскопически и содержатся в значительном количестве (1-5 палочек в поле зрения). Наиболее распространенными методами определения лекарственной устойчивости являются:

- 1) культивирование на плотных жидких средах;
- 2) микрокультивирование на стеклах;
- 3) глубинные посева на полусинтетические среды.

Результаты исследования учитывают по истечении определенного срока выращивания, достаточного для получения обильного роста в контрольных пробирках.

В остальных пробирках в зависимости от концентрации препарата и степени устойчивости к нему данного штамма микобактерий туберкулеза рост может быть различной интенсивности или к этому времени отсутствовать.

Лекарственно чувствительные штаммы дают рост в пределах определенных концентраций, различных для каждого препарата.

Штаммы, которые дают рост при соответственно более высоком содержании препаратов, относят к лекарственно устойчивым. Устойчивость определяют по микроросту на плотных и по микроросту на жидких средах. Устойчивость данного штамма в целом выражается той максимальной концентрацией антибактериального препарата (количество микрограммов в 1 мл питательной среды), при которой еще наблюдается рост, приближающийся к росту в контроле.

В части случаев выявляется обильный типичный рост микобактерий в присутствии той или другой концентрации антибактериального препарата, а на среде, содержащей более высокие концентрации этого же препарата, рост может быть скудным в виде единичных макро- или микроколоний, что указывает на размножение только некоторых, более резистентных, особей данного штамма. В таких случаях отмечают как максимальную концентрацию препарата, при которой еще размножается основная устойчивая масса микробных особей, так и предельную - при скудном росте ("относительная устойчивость", табл. 26).

Биологический метод

Наиболее надежным методом выявления микобактерий туберкулеза в настоящее время является заражение морских свинок исследуемыми материалами. Содержащие постороннюю микрофлору исследу-

Оценка устойчивости микобактерий туберкулеза
к лекарственным препаратам

Препарат	Устойчивые при росте на среде, содержащие препарат, мкг/мл	
	платины	индран
Стрептомицин	5	5
Тубоцид	1	1
ПАС	5	10
Цикloserан	50	50
Канамидин	25	10
Этионамид	30	5
Биноцидин	30	10

дуремые материалы обрабатывают 2% раствором серной кислоты в течение 20 мин (включая время центрифугирования), трехкратно отмывают осадок физиологическим раствором. Мокроту, ткани предварительно гомогенизируют; мочу, промывные воды центрифугируют и для исследования берут осадок. Обработанный серной кислотой и отмытый материал эмульгируют в 1-2 мл физиологического раствора и вводят подкожно в область паха 2 морским свинок массой 250-300 г. При малом количестве исследуемого материала животных заражают интрабрюшинно или интратестискулярно. Такой путь заражения повышает чувствительность метода, особенно в тех случаях, когда в материале содержатся слабовирулентные изоляцидоустойчивые микобактерии туберкулеза.

Зараженных животных извлекают каждые 5 дней; если заражение было подкожное, следует регулярно пальпировать лимфатические узлы в месте заражения. В положительных случаях у свинок уменьшается масса тела, к концу месяца пальпируются увеличенные лимфатические узлы, могут появиться свищи или язвы.

Активный процесс у подопытных животных выявляется аллергической пробой. Для постановки пробы необходимо удалить шерсть

с наружной поверхности бедра и внутрикожно ввести туберкулин 1:10 в объеме 0,1 мл. Результаты реакции определяют через 24 и 48 ч. На месте введения туберкулина появляются гиперемия, папула и некроз - положительная реакция; умеренная гиперемия с небольшой папулой или без нее - слабоположительная; гиперемия меньше 5 мм в диаметре - отрицательная.

Местные патологические изменения, положительная аллергическая реакция и истощение дают основание для вскрытия и исследования внутренних органов морских свинок.

В случаях, если патологических признаков нет, подопытных животных вскрывают через 3 мес.

В отдельных случаях применяют метод "слепых" пассажей: органами зараженного животного, у которого процесс не был обнаружен, заражают интактную морскую свинку; на 4-5-м пассаже удается обнаружить микобактерии туберкулеза. Идентификацию микобактерий туберкулеза из очагов в органах и тканях подопытных животных проводят бактериоскопическим и бактериологическим методами.

В последние годы все шире практикуют метод интрацеребрального заражения белых мышей.

Иммунологические методы

Используют РНГА, ИФА и реакцию потребления комплемента. Аллергический метод применяют с целью определения инфицированности населения туберкулезом, отбора лиц, которым необходима вакцинация против туберкулеза, эффективности иммунизации БЦЖ, оценки форм и динамики инфекционного процесса при туберкулезе, а также в научно-исследовательской работе.

Для выявления степени аллергизации организма используют туберкулин. Его специфическая активность связана с белковыми фракциями-протеинами, для которых липиды являются защитными субстанциями.

Внутрикожная проба Манту в настоящее время имеет преимущественное значение. В этой пробе используют туберкулин в стандартном разведении. Для постановки пробы берут "туберкулиновый" шприц объемом 1 мл и иглы с коротким срезом (№ 0415). Шприцы, пропускающие раствор между поршнем и цилиндром или через канюлю иглы, не пригодны к употреблению. Предварительно следует точно определить цену одного деления шприца на шкале цилиндра. Для каждого пациента необходимы стерильные шприц и иглы.

Туберкулин вводят только внутрикожно в объеме 0,1 мл в область

средней трети внутренней поверхности предплечья. Перед инъекцией кожу обрабатывают 75% этиловым спиртом, при уколе сре� иглы должен быть направлен вверх.

Реакция характеризуется гиперемией, возникающей через 2-3 ч, затем формируется папула, она достигает максимального развития к исходу 48-72 ч после введения туберкулина. Папула исчезает через 4-7 дней, нередко оставляя небольшой участок пигментации.

Рекомендуется, чтобы результаты реакции определяли независимо и не одновременно два специалиста.

Диаметр папулы измеряют после пальпаторного определения ее края. В журнал учета и медицинскую книжку заносят среднюю величину ее.

В не инфицированном микобактериями организме реакция отрицательная - диаметр инфильтрата менее 1 мм. Если обнаруживается папула диаметром 2-4 мм - реакция сомнительная; инфильтрат более 5 мм - положительная.

В отдельных случаях возможны запоздалые реакции (96-120 ч).

Установлено, что риск заболевания туберкулезом лиц с туберкулиновой папулой диаметром 21 мм в несколько раз выше, чем с инфильтратом 1-14 мм.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БРУЦЕЛЛЕЗА

Бруцеллез - общее инфекционное заболевание, системный ретикулоэндотелиоз с преимущественным поражением опорно-двигательной, нервной и половой систем. Относится к группе зоонозов. Для людей патогенны следующие виды бруцелл: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*. Патогенность *B. neotomae*, *B. ovis*, *B. canis* сомнительна.

Материалы для исследования: 1) кровь больного; 2) костный мозг; 3) моча; 4) фекалии; 5) абортировавшие плоды животных; 6) околоплодные воды; 7) некротизированные участки плаценты; 8) молоко; 9) воздух; 10) вода и др.

Возбудители бруцеллеза обладают значительной устойчивостью во внешней среде, высоковирулентны и контагиозны, поэтому необходимо брать материал у больных животных осторожно с соблюдением правил техники безопасности.

Работать с культурами бруцелл разрешается только специалистам, имеющим подготовку к исследованиям возбудителей особо опасных инфекций.

Для микробиологической диагностики бруцеллеза применяют бактериоскопический, бактериологический, биологический, иммунологический и аллергический методы.

Бактериоскопический метод

Из материалов готовят мазки, высушивают их, фиксируют и окрашивают.

Карболовый фуксин разводят водой 1:5 и наносят на фиксированный мазок на 3 мин. Препарат промывают водой и дополнительно окрашивают 2% водным раствором метиленовой синьки в течение 5 мин. Мазок промывают водой, просушивают и микроскопируют.

Бруцеллы хорошо окрашиваются в ярко-красный цвет, все другие микроорганизмы - в сине-голубой.

Бактериологический метод

Выделение возбудителей бруцеллеза у больных людей осуществляется путем посева крови. У больного берут из локтевой вены кровь в объеме 10 мл и засевают в 2-3 флакона с жидкой питательной средой на один объем крови 9 объемов питательной среды.

В одном из флаконов следует создать повышенную концентрацию CO₂ (около 10%), что обычно стимулирует размножение *B. abortus*.

Флаконы инкубируют в термостате при 37°C в течение 4-5 дней, а затем из них через 3-4 дня производят высевы на плотные среды. Бруцеллы медленно размножаются на питательных средах, посевы следует выдерживать в термостате до 30 дней.

На жидких питательных средах размножение бруцелл вызывает легкое их помутнение с образованием небольшого осадка, на плотных колонии появляются не ранее 42 ч.

Колонии на плотных питательных средах имеют круглую форму, размеры от 1 до 5 мм в диаметре, серовато-белые в отраженном свете, блестящие и прозрачные - в проходящем, имеют янтарный оттенок.

В мазках из типичных колоний обнаруживаются мелкие бактерии шаровидной, овальной или палочковидной формы, грамотрепидные.

Оптимальными питательными средами являются среда АДБ, эритроцит-агар, среды Хоттингера, МПБ с 1% глюкозы и 1% глицерина.

Биологический метод

Для исследования нередко приходится применять заражение лабораторных животных в связи с тем, что выделить бруцеллы в чистой культуре из загрязненных посторонними микроорганизмами материалов трудно.

Биологический метод необходим при изучении вирулентности бруцелл, испытании вакцин, антибиотиков и других экспериментальных работ.

В лабораториях используют морских свинок и белых мышей, которых заражают подкожно или интритрибуцинно.

Возбудители бруцеллеза - мелкие микробы шаровидной, овоидной и палочкообразной формы. Размеры - от 0,5 до 2 мкм в поперечнике; описаны фильтрующиеся формы бруцелл.

Бруцеллы хорошо агглютинируются антибруцеллезной сывороткой и лизируются специфическим поливалентным бактериофагом (табл. 27).

В культурах бруцелл наблюдается диссоциация от S- к R-формам (табл. 28).

Фагочувствительность бруцелл определяют на печеночном агаре или другой плотной среде. Микробную культуру рассеваяют шпателью на две чашки, среду подсушивают и на поверхность агара одной чашки у края наносят каплю бруцеллезного бактериофага, чашку наклоняют и капля фага образует "дорожку" на агаре, на которой бруцеллы лизируются. Вторая чашка является контролем. Результаты учитывают спустя сутки после инкубации чашек в термостате при температуре 37°C.

Серологическую идентификацию бруцелл проводят в реакции агглютинации чистой культуры с противобруцеллезной агглютинирующей сывороткой. Для ориентировочной реакции на стекле сыворотку разводят физиологическим раствором 1:25.

Развернутую реакцию агглютинации ставят по принятой методике. Идентифицированная культура должна агглютинироваться специфической сывороткой не менее 2/3 титра сыворотки.

Иммунологический метод

Целью исследования является определение титра антигенов в сыворотке к бруцеллезному антигену. В качестве такового используют бруцеллезный единый диагностикум - гомогенную взвесь бруцелл, инактивированную нагреванием и фенолом и окрашенную в синий цвет. Такой диагностикум применяют в реакциях агглютинации Райта и Хеддльсона.

Основные свойства видов и биоваров бруцелл

Вид	Биовар	Потребности в CO ₂	Продукция H ₂ S	Рост в средах с краской*						Агглютинация моностафилококками		Чувствительность к фазу "Тб" (в работе [разделены])	Особенности штамма
				тканевые			основной фазы			А	М		
				а	б	в	а	б	в				
Внешторм	1	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	Слабая реакция	
	2	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-		
	3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-		
Волокно	1	+(.)	+	-	-	-	+	+	+	-	+	Крайне резкая реакция	
	2	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+		
	3	+(.)	+	+	+	+	+	+	+	-	+		
	4	+(.)	+	-	-	-	+	+	+	+	+		
	5	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+		
	6	-	+(.)	-	+	+	+	+	+	-	+		
	7	-	+(+)	-	+	+	+	+	+	+	+		
	8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+		
	9	-(+)	+	-	+	+	+	+	-	+	+		
Воск	1	-	++	+	+	+	-	-	+	-	-	Сильная реакция, слабо чувствительна	
	2	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-		
	3	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-		
	4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-		

* Концентрация красок: а) 1:25 000; б) 1:50 000; в) 1:100 000. Новую серию красок необходимо предварительно проверить на бактериостатичность в данной питательной среде. Учет ведут под контролем референтных штаммов каждого вида.

Реакцию агглютинации Райта ставят методом "равных объемов" (табл.29). Сыворотку больного и диагностикум разводят физиологическим раствором, в который предварительно добавляют 0,5% фенола (карбонизированный физиологический раствор).

При титре 1:50 результат "сомнительный", 1:100-1:200 оценивают как "положительный", 1:800 и выше - "резко положительный".

Реакция агглютинации Хеддльсона является качественной для обнаружения антител в сыворотке крови больного. Реакцию ставят на обычном сухом стекле, хорошо обезжиренном и расчерченном на 6 квадратов (4x4 см каждый). На первом квадрате записывают номер сыворотки, на следующие микропипеткой наносят исследуемую сы-

Характеристика S- и R-форм бруцелл

Признаки	S-форма	R-форма
Результат окраски	Колонии желтые, края ровные, отстоящие от среды-основания, крупные	Колонии более грабые, края неровный, центр колонии толстый
Результат биохимии	Резко выраженные изменения среды	Среды прозрачные с концентрированными желтыми осадками на дне
Внешний вид колоний в жидкой среде	Гомогенная, вязкая	Зернистая, вязкая на ощупь
Агглютинация при нагревании	Образуются хлопья	Полноценная
Агглютинация при охлаждении	Хорошо	Слабая и неустойчивая
Абсолютная подвижность	Высокая	Низкая
Отношение к различным средам	Тяжелая	Медиа легкая
Образование аутолизата	Тяжелая	Нечеткая
Патогенность для животных и человека	Образуются или не образуются	Хорошо выражены
Устойчивость для лабораторных животных	Высокая	Слабая или отсутствует

Реакция агглютинации Райта

Исходный материал	Качественное разведение сыворотки больного после добавления диагностической сыворотки					
	1:10	1:100	1:200	1:400	1:800	контроль 1:25
Карболовый жидкий фенол-агглютинирующий раствор, мл	-	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Сыворотка больного 1:25 и 1-ю и 2-ю порции по 0,5 мл	0,5	0,5+	+	+	+	1,0
Бруцеллезный стандартный диагностический и доведение 1:10, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-

воротку в объемах 0,04; 0,02; 0,01 мл и контроль 0,02 мл. К первым трем объемам добавляют 0,03 мл неразведенного бруцеллезного единичного диагностикума. В контроль сыворотки добавляют 0,03 физиологического раствора. Исследуемую сыворотку осторожно смешивают с антигеном, используя для этой цели стеклянную палочку, как в серологических реакциях. Последовательность смешивания - от минимальной дозы сыворотки к максимальной.

Контроль антигена - один для всех сывороток данного опыта (0,03 антигена + 0,03 физиологического раствора). В течение 2 мин стекло с ингредиентами подогревают до 37°C.

В положительных случаях агглютинация антигена происходит немедленно. Образуются ясно видимые хлопья агглютината. Максимальный срок наблюдения 8 мин.

Отсутствие агглютинации во всех дозах сыворотки - реакция "отрицательная"; агглютинация только в дозе 0,04 мл - "сомнительная"; агглютинация в дозах 0,02-0,01 мл - "положительная"; агглютинация во всех дозах сыворотки - "резко положительная".

Для диагностики бруцеллеза имеет значение только положительный результат в сочетании с положительной аллергической пробой.

Реакцию применяют при массовом обследовании людей.

Аллергическая проба (реакция Бюрне)

Организм человека, зараженного бруцеллами или вакцинированного против бруцеллеза, специфически реагирует на внутрикожное введение бруцеллина. Эта реакция специфична, она проявляется через 1-2 нед после начала заболевания и сохраняется годами.

Больному вводят внутрикожно в ладонную поверхность предплечья 0,1 мл бруцеллина. Положительная реакция появится через 6-8-24 ч. Она характеризуется образованием болезненного инфильтрата размером 4x6 см и гиперемии. Реакцию оценивают через 24 ч по размерам (длина и ширина в сантиметрах) отека, степени болезненности и гиперемии кожи.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ДИФТЕРИИ

Род - *Corynebacterium*. Вид - *C. diphtheriae*.

Дифтерия - инфекционное заболевание, характеризующееся синдромом общей интоксикации с преимущественным поражением сердечно-сосудистой, кортико-адреналовой систем и периферических нервов, а также развитием фибринозного воспаления во входных воротах инфекции.

В зависимости от локализации возбудителя различают дифтерию зева, носа, гортани, глаза, кожи, раны, уха и наружных половых органов (дифтерия кожи и раны встречается главным образом в тропиках, при этом адсорбция токсина незначительна, системные проявления слабые). Соответственно материалом для исследования являются пленки из очагов дифтерического воспаления и слюнь. Материал берет врач или опытная медсестра сухим стерильным тампоном, а при необходимости пересылки образцов в условиях жаркого климата тампоны смачивают 5% раствором глицерина в физиологическом растворе с pH 7,6. В таких случаях рекомендуется использовать среды обогащения: Пергола или полужидкую. Инфицированный тампон погружают в одну из указанных сред и пересылают в лабораторию.

Из зева материал следует брать до еды, язык фиксировать шпательом, затем тампоном, не касаясь языка, зубов и слизистой щек, извлечь пленку (слизь) со слизистой миндалин, небных дужек на границе здоровой и воспаленной ткани.

Микробиологическое исследование материала от больных или носителя целесообразно только до применения антибиотиков или, по крайней мере, трех суток спустя после прекращения антибиотикотерапии.

Материал из зева, носа и других мест локализации возбудителя собирают отдельными тампонами: нужно помнить, что пленка снимается только шпательом и при ее удалении на слизистой появляются мелкие капельки крови ("кровоизлияние"). Пленка тонет при погружении в воду.

Тампоны в пробирках этикетировать следующим образом. На каждый анализ заполнить бланк-направление, в котором указывают фамилию, имя и отчество больного (обследуемого), какой материал, цель направления на анализ, кто и когда взял материал, сообщают, куда направить заключение микробиологического исследования.

В лаборатории материал исследуют бактериоскопическим, бактериологическим и иммунологическим методами (схема 2).

Микробиологическая диагностика дифтерии



Бактериоскопический метод

Бактериоскопический метод малоинформативен, поэтому мазки с тампонов делают только по требованию врача, направляющего материал на анализ. В этом случае каждый материал должен быть взят двумя тампонами: один - для мазка, другой - для посева.

Фиксированные мазки окрашивают щелочной метиленовой синькой Леффлера или уксуснокислой толуидиновой синей. Целесообразно один мазок окрасить по Граму. В поле зрения микроскопа обнаруживаются тонкие, расположенные под углом в виде буквы V палочки длиной до 8 мкм, неподвижные, склонные к полиморфизму (булавовидные овальные палочки). Они содержат метакроматические гранулы (зерна волютина), которые окрашиваются в темно-бордовый цвет метиленовым синим, при этом тело клетки окрашивается в синий цвет. Зерна волютина (полифосфаты) характерны в ос-

повном для *C. diphtheriae*, придают клетке биполярность при окраске, хотя некоторые дифтеронды тоже могут окрашиваться биполярно, но не содержат гранул.

Бактериологический метод

Инфицированным тампоном производят посев на поверхность одной из рекомендуемых в настоящее время плотных дифференциально-диагностических питательных сред: Клауберга II, хинозольная среда Бучина, модифицированная среда Тинсдаля (цистин-теллуриг-сывороточная среда), кровяной теллуригитовый агар.

Каждая новая серия среды должна быть проверена посевом лабораторного штамма коринтебактерий дифтерии. Среды перед применением подогревают в термостате.

Порядок исследования. Посевы со сред обогащения - Пергола и полужидкой (применяемые при пересылке материала на большие расстояния) - производят петлей на поверхность одной из плотных сред.

Предварительно среду Пергола инкубируют в термостате в течение 20 ч, а полужидкую - 5-6 ч.

Чашки с засеянными средами инкубируют в термостате и изучают через 24 и 48 ч. Форма, размер и цвет колоний на кровяном теллуригитовом агаре позволяют различить три биотипа *C. diphtheriae*: гравис, интермедтус и митис. Как правило, отмечается корреляция между биотипом и клинической тяжестью заболевания (тяжелая, средняя и легкая соответственно). Биотип гравис - крупные серые шероховатые с радиальной исчерченностью колонии; митис - мелкие черные блестящие выпуклые гемолитические колонии; интермедтус имеют промежуточные признаки. На хинозольной среде колонии возбудителя дифтерии окрашиваются в синий цвет, а среда на месте образования колоний приобретает фиолетовый оттенок, что является следствием восстановления индикатора. На цистин-теллуриг-сывороточной среде формируются круглые, выпуклые, блестящие черные или темно-коричневые колонии, окруженные темно-коричневым ореолом, являющимся специфическим признаком роста и размножения дифтерийного микроба.

Изучив колонии микроорганизмов по внешним признакам и особенностям роста, отбирают 2-3 типичных, из которых делают посев на сывороточный агар для выделения чистой культуры, готовят мазки, окрашивают по Нейссеру, метиленовой смесью Леффлера и по Граму. По результатам микроскопии при обнаружении в мазках тонких триположительных с зернами волютина на концах палочек, не-

редко полиморфных, расположенных под углом, можно выдать предварительное ориентировочное заключение. Оставшуюся часть колоний параллельно засевают на среду для определения токсигенности и среду для выведения фермента цистиназы (проба Пизу). Поскольку на чашке первичного посева могут одновременно вырасти колонии как токсигенных, так и нетоксигенных вариантов *C. diphtheriae*, рекомендуется в тесте на токсигенность испытывать максимальное число колоний (10-20), смешивая материал нескольких колоний в одну бланку на среде для определения токсигенности.

Через 24 ч инкубации при появлении специфических линий прерипигментации на среде для определения токсигенности изучаемую культуру идентифицируют как коринебактерии дифтерии токсигенные и выдают документированный ответ.

В случае отсутствия токсигенности чашки инкубируют еще 24 ч. Выделенную на сыровоточном агаре чистую культуру используют для определения ферментативной активности на средах Гисса с глюкозой, сахарозой, крахмалом и мочевиной.

Таким образом, на четвертый день исследования производят учет сахаролитических свойств и уреазной активности, а также повторно (через 48 ч) учитывают результат пробы на токсигенность.

При отсутствии специфических линий прерипигментации, но при положительном результате на цистиназу, глюкозу, отрицательном результате на уреазу и сахарозу культуру идентифицируют как коринебактерии дифтерии нетоксигенные. Положительный тест с крахмалом свидетельствует о выделенном биоваре гравис (табл. 30).

Таблица 30

Свойства возбудителей дифтерии
в ложнодифтерийной палочке Гоффмана

Коринебактерии	Токсигенность	Цветность	Уреазы	Ферментация углеводов			Агломинабельность по показателю сыровоточный
				сахарозы	глюкозы	цистина	
Дифтерийная палочка	+ или -	+	-	-	+	+ или -	+
Ложнодифтерийная палочка Гоффмана	-	-	+++	-	-	-	-

Обозначения: + - положительный тест; - отрицательный тест; (-) - редко отрицательный

Токсигенность возбудителей дифтерии определяют на плотной питательной среде методом пренипитации в геле агара. Оптимальной средой является агар для определения токсигенности или сывороточный мартеновский агар, который готовят по прописи: мартеновский агар - 0,5 л; мясная вода - 0,5 л; агар-агар - 1,5 г; уксуснокислый натрий - 5 г; мальтоза - 3 г. Непосредственно перед работой расплавляют 100 мл мартеновского агара, охлаждают до 50°C и добавляют 0,3 мл 1% раствора цистина, а также 20 мл лошадиной сыворотки или 30 мл сыворотки крупного рогатого скота.

В процессе выполнения методик по определению токсигенности используют полоски стерильной фильтровальной бумаги размером 1,5x8 см. Их следует смочить антитоксической противодифтерийной сывороткой "Диаферм-3" или противодифтерийным γ -глобулином. Препараты разводят физиологическим раствором до 500 МЕ в 1 мл. На смачивание одной бумажной полоски требуется 0,25 мл (100-120 МЕ) препарата.

Пропитанную антитоксической сывороткой бумажку накладывают на поверхность мартеновского агара в чашку Петри. Открытую чашку подсушивают в термостате в течение 15 мин.

Исследуемые культуры петлей наносят на питательную среду линией, перпендикулярной к полоске фильтровальной бумаги. Между двумя исследуемыми культурами засевают штамм заведомо токсигенных коринебактерий дифтерии.

Посев можно производить в форме бляшек диаметром 0,7-0,8 см, одну культуру от другой обычно размещают на расстоянии 0,5 и 0,3 см от края бумажки.

Чашки помещают в термостат при температуре 37°C и через 24-48 ч учитывают результаты, просматривая питательную среду с применением лупы и в проходящем свете.

Обнаружение линий пренипитации, идущих от заведомо токсигенных штаммов и от исследуемых культур, в виде четких арок ("усы") свидетельствует о токсигенности выделенных культур.

Токсигенность возбудителя дифтерии может быть определена и в опыте на морской свинке путем внутрикожного или подкожного заражения. Токсигенные культуры убивают животных в течение 3-5 сут, при вскрытии обнаруживаются гиперемизированные надпочечники, а при внутрикожном заражении - некроз кожи. Титр антитоксинов в крови определяют при помощи РИГА и ИФА.

Правила выдачи результатов исследования. По микроскопии исходного материала - предварительный ответ: "При бактериоскопии

мазков из зева (носа и др.) обнаружены палочки, подозрительные на дифтерийные: исследование продолжается". По требованию лечащего врача выдают предварительные ответы на этапах исследования. Окончательный ответ может быть выдан через 48-72 ч. Например: "Выделены токсигенные (или положительные) *C. diphtheriae*".

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БОРРЕЛИОЗОВ (ВОЗВРАТНЫЕ ТИФЫ, БОЛЕЗНЬ ЛАЙМА)

Возбудители болезни Лайма и клещевого возвратного тифа относятся к порядку *Spirochaetales* семейству *Spirochaetaceae*. Системы разделения видов, отвечающей современным требованиям до конца не разработано. В настоящее время известно более 20 видов боррелий, которые передаются иксодовыми и аргасовыми клещами, а также вшами, вызывающих заболевание у животных и человека. Боррелии, передающиеся аргасовыми клещами, классифицируются по виду переносчика. Так, например, переносчик - *Ornithodoros moubata*, возбудитель - *Borrelia duttoni*. Среди боррелий, вызывающих болезнь Лайма, на основе анализа их ДНК в настоящее время выделены три самостоятельных вида: *Borrelia burgdorferi*, *B. garinii* и *B. afzelii*.

Боррелия представляет собой извитую, лево- и правоизгибающуюся спираль длиной от 15 до 25 мкм и толщиной от 0,2 до 0,3 мкм. Электронная микроскопия выявляет пептидную эластичную оболочку и штоплазматическую мембрану, между которыми лежат 15-20 параллельных фибрилл, обвивающих тело клетки. Нет ни митохондрий, ни ундулирующей мембраны. Боррелии - строгие анаэробы. По Граму окрашиваются отрицательно. Хорошо прокрашиваются анилиновыми красителями.

Белки, находящиеся на внешней оболочке, определяют видовую принадлежность возбудителя, а белки жгутиковой фразисы являются ведущими элементами в механизме антигенности. Многие антигенные детерминанты внешней оболочки сходны с таковыми у боррелий других видов. Это, по-видимому, обусловлено тем, что до 59% ДНК у *Borrelia burgdorferi* гомологично другим видам боррелий. Отсюда возможность перекреста в иммунологических реакциях, например, с *B. recurrentis* (возбудитель эпидемического вшивого возвратного тифа) и *B. sodgiani* (возбудитель среднеазиатского эпидемического клещевого возвратного тифа).

Антигенная структура нестабильна, имеются данные, свидетель-

ствующие, что основные поверхностные антигенные белки OspA и OspB могут значительно варьировать, обуславливая длительную (в течение многих лет) персистенцию возбудителей болезни Лайма (БЛ) в организме человека.

Боррелии крайне требовательны к условиям культивирования. В результате многолетних эмпирических попыток удалось создать среду (получившую наименование BSK-11), пригодную для изоляции и культивирования возбудителей БЛ. Возбудители, выращенные на питательной среде, удовлетворительно сохраняются в шокотемпературном холодильнике (до -90°C) по нескольку лет, не теряя своих свойств, что позволяет создавать банки штаммов.

В клинической картине клещевого возвратного тифа ведущим симптомом является возвратная лихорадка, для БЛ характерны в начальном периоде развития заболевания клещевая мигрирующая эритема, в позднем - поражения сердца, опорно-двигательного аппарата, нервной системы и кожи.

Для диагностики клещевого и вшивого тифов используется главным образом метод микроскопии окрашенных азур-эозином препаратов крови (мазки и толстая капля), для диагностики БЛ, ввиду отсутствия возбудителей в периферической крови, - иммунологические реакции: метод флюоресцирующих антител, иммуноферментный анализ.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕПТОСПИРОЗА

Лептоспироз - петрансмиссивный зооноз с природной очаговостью, имеющий повсеместное распространение.

Возбудители лептоспироза входят в состав рода *Leptospira*, относящегося к семейству *Leptospiraceae*. Род *Leptospira* объединяет два вида: паразитический (патогенный) - *L. interrogans* и сапрофитический - *L. biflexa*. Морфологически патогенные и сапрофитические формы лептоспир неразличимы, их дифференцируют по антигенным, культуральным и биохимическим критериям.

На основании антигенных свойств лептоспиры разделяют на серовары, которые по антигенным связям объединяют в группы. В настоящее время известно свыше 200 видов сероваров патогенных лептоспир, объединенных в 23 серогруппы, а сапрофитических - более 60 сероваров.

От больных людей на территории нашей страны наиболее часто выделяют сероварианты: *romona*, *grippotyphosa*, *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *hebdomadis*.

Лептоспиры - тонкие спиралевидной формы микроорганизмы, обладающие прямолинейной, ротационной и стигмательной подвижностью. Концы у лептоспир изогнуты в виде крючков или латинской буквы S. Длина лептоспир - 20 мкм.

Лептоспиры - хемоорганотрофы, культивируются в средах, содержащих сыворотку крови, сывороточный альбумин или жирные кислоты. Эти вещества служат основными источниками углеводов и энергии, а также липидов, поскольку лептоспиры не обладают способностью синтезировать жирные кислоты. Лептоспиры являются микроаэрофильными микроорганизмами. При росте в жидких питательных средах лептоспиры не вызывают помутнения. Оптимальный рост лептоспир наблюдается при pH 7,2 - 7,6, температурный оптимум 28-30°C. Растут лептоспиры медленно, рост их обнаруживается на 5-7-й день и позднее от начала культивирования.

Для диагностики лептоспироза используют микроскопический, бактериологический, иммунологический и биологический методы исследования.

Материалом для исследования являются кровь, моча, спинномозговая жидкость (при наличии менингеальных явлений), секционный материал (кусочки внутренних органов), сыворотка крови больного для определения титра специфических иммуноглобулинов, пробы воды. Кровь исследуют в первые дни заболевания; на 5-15-й день - сыворотку крови больного; с 10-16-го дня болезни - мочу и спинномозговую жидкость.

Кровь забирают в количестве 6 мл, из них 2 мл, предназначенные для микроскопии, смешивают с 4 мл 1,5% раствора лимоннокислого натрия, а оставшие 4 мл используют для посева на питательные среды. Мочу собирают в стерильную посуду в количестве 30 - 50 мл, центрифугируют при 10 тыс. об/мин в течение 30 мин и для исследований используют осадок. Так же исследуют спинномозговую жидкость.

Из секционного материала готовят 10% взвесь, центрифугируют при 2 тыс. об/мин в течение 15-20 мин и для исследований используют надосадочную жидкость. Пробу воды отбирают в стерильную посуду (не более 3 л), в лаборатории центрифугируют или пропускают через мембранные фильтры.

Микроскопический метод

Лептоспиры плохо воспринимают окраску, поэтому микроскопию живых возбудителей проводят в темном поле.

Для микроскопии готовят препарат "раздавленная капля".

Для обнаружения лептоспир в исследуемом материале можно использовать окраску мазков, после их фиксации, по методам Гимзы, негативного контрастирования (с конго красным) и методом иммунофлюоресценции.

Бактериологический метод

Для культивирования лептоспир применяют жидкие питательные среды (Ферворта - Вольфа и ее модификации, Терских и др.). В качестве основного компонента этих сред используют инaktivированную кроличью сыворотку.

Исследуемую кровь рекомендуют засеивать следующим образом: в первую пробирку со средой - 2,0 мл; во вторую - 1,0 мл; в третью - 0,5 мл; в четвертую пробирку - 0,25 мл крови. При посеве мочи используют десятикратные разведения ее центрифугата (от 1:10 до 1:100 000). Спинальную жидкость засеивают в количестве 0,25-0,5 мл в несколько пробирок со средой. Надосадочную жидкость извести тканей органов засеивают по 5-10 капель в 3-4 пробирки со средой.

Лептоспиры размножаются в питательной среде, не изменяя ее внешнего вида. Поэтому для выявления роста лептоспир через 10 дней после посева из каждой пробирки готовят препарат "раздавленная капля" и микроскопируют в темном поле. Если рост лептоспир не выявлен, посева вновь инкубируют и микроскопируют через каждые 10 дней. При отсутствии роста в течение 3 мес. результаты считают отрицательными.

Биологический метод

Заражение лабораторных животных проводят в следующих случаях:

- для выделения культуры лептоспир контаминированного посторонней микрофлорой материала (моча больных, вода открытых водоемов, почва и др.);

- для очистки культур лептоспир от посторонней микрофлоры;

- для исследования воды открытых водоемов.

Лучшей моделью для *L. icterohaemorrhagiae* являются морские свинки, у которых заболевание протекает с повышением температуры тела

до 40-41 °С и резким падением массы тела. Заражают их внутрибрюшинно, вводя по 0,5-1,0 мл материала. На 5-10-й день после инфицирования у морских свинок появляется желтушная окраска склер, слизистых оболочек и кровоизлияния в органы и ткани. Через 12-48 ч после появления желтухи животные погибают. К другим серогруппам лептоспир морские свинки менее восприимчивы.

Для заражения другими сероварами лептоспир наиболее пригодны золотистые хомячки. Животных заражают введением материала внутрибрюшинно, подкожно, внутривенно, через скарифицированную кожу и слизистые оболочки.

Зараженных животных ежедневно термометрируют и взвешивают, а на 2-й неделе проводят микроскопию мочи. При обнаружении лептоспир в моче животных забивают и делают посев ткани почек на питательные среды. За животными, не погибшими в течение первых дней, наблюдают 1 мес. По истечении этого срока их забивают и делают посевы из коркового слоя почек, а из сердца берут кровь для исследования на наличие специфических иммуноглобулинов с помощью реакции микроагглютинации и лизиса лептоспир (РМАЛ).

Иммунологический метод

Чаще всего используют реакцию микроагглютинации и лизиса лептоспир, довольно перспективной является реакция иммуносуппчивой геммагглютинации, разработанная К.Д. Жоголевым (1985). Агглютинины в сыворотке крови при лептоспирозе обнаруживаются с 4-го дня и достигают максимального уровня чаще на 14-17-й день болезни. Для постановки РМАЛ используют живые культуры лептоспир 4-14-дневной инкубации с плотностью роста 50-100 и более лептоспир в поле зрения (при увеличении в 400 раз) с хорошей подвижностью, без спонтанной агглютинации. Используют культуры 13 серогрупп, включающие стандартные диагностические штаммы, предложенные ВОЗ, и штаммы отечественного происхождения.

Используемую сыворотку разводят (с 1:10 до 1:1600) и смешивают в равных объемах (по 0,2 мл) с живой культурой диагностического штамма в агглютинационных пробирках. В контрольную пробирку наливают 0,2 мл изотонического раствора хлорида натрия и 0,2 мл культуры лептоспир. Пробирки встряхивают и оставляют на 2 ч при комнатной температуре, после чего производят окончательный учет реакции в препаратах "раздавленная капля" под микроскопом в темном поле. Следует учитывать, что при добавлении к сыворотке рав-

ного объема культуры лептоспир разведение сыворотки удваивается.

Агглютинация проявляется в склеивании лептоспир с образованием "кос", "паучков". Диагностическим титром антител является 1:100 и выше.

Весьма показательным исследованием "парных" сывороток крови больного, если при этом устанавливают нарастающие титры специфических иммуноглобулинов.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СИФИЛИСА

Возбудитель сифилиса *Treponema pallidum* вызывает заболевание всего организма с циклическим течением. Заболевание передается половым путем. При этом поражаются кожа, слизистые, опорно-двигательный аппарат, внутренние органы и нервная система.

Выделение возбудителя в чистой культуре практически недоступно, поэтому основными методами лабораторной диагностики сифилиса являются бактериоскопический и иммунологический.

Материалом для исследования при бактериоскопии служит отделяемое с поверхности эрозий, язв, пунктат лимфатических узлов. Исследование проводят методом раздавленной (висячей) капли в темном поле. Бледная спирохета выглядит как нежная спираль серебристого цвета, имеет 8-12 завитков. Движения ее плавные, маятниковобразные, сгибательные. Эти признаки отличают ее от сапрофитных трепонем полости рта и половых органов.

Для практической диагностики используют комплекс иммунологических методов:

- комплекс серологических реакций (КСР);
- специфические серологические реакции.

В группу КСР прежде всего входит реакция Вассермана (RW), основанная на принципе связывания комплемента. Реакция ставится с двумя антигенами:

- трепонемным, приготовленным из разрушенного ультразвуком штамма Рейтера - апатогенного культурального штамма *T. pallidum*;
- кардиолипниновым (экстракт из сердца быка).

RW становится положительной через 2-3 недели после появления твердого шанкра, при вторичном сифилисе она положительная в 100%, в третичном периоде - 75%.

Довольно часто RW дает ложноположительные результаты при наличии у обследуемых людей аутоантител к структурным фосфолипидам тканей организма (первичный и вторичный антифосфолипидные синдромы).

Помимо этого из КСР используют в качестве скрининг-тестов микрореакцию преципитации с плазмой крови и с инактивированной сывороткой. За рубежом аналогом микрореакции с сывороткой является VDRL (Venereal disease research laboratory), а с плазмой - RPR (Rapid plasma reagin).

Однако окончательный серологический диагноз сифилиса устанавливается с помощью одной или нескольких специфических реакций.

К группе специфических реакций относятся следующие:

- реакция иммуофлюоресценции (РИФ);
- иммуноферментный анализ (ИФА);
- реакция иммобилизации бледных трепонем (РИТ);
- реакция иммунного прилипания (РИП);
- реакция непрямой гематтотинации (РНГА).

РИФ применяется в непрямом варианте, в качестве антигена используют штамм Николса - патогенный тканевой штамм бледной трепонемы, полученный при заражении кролика. Существует в двух модификациях - РИФ-200 и РИФ-Абс. В первом случае сыворотка больного разводится в 200 раз с целью снять влияние групповых противотрепонемных систем, а во втором антигена удаляются с помощью разрушенных ультразвуком культуральных трепонем.

ИФА находит все большее применение в диагностике сифилиса. В настоящее время выпускается довольно большое количество диагностических тест-систем. В НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург) разработаны довольно оригинальные тест-системы, позволяющие осуществлять этиологическую диагностику сифилиса на разных этапах болезни.

1. "АНТИ-СИФ-С" для выявления суммарных антител к бледным трепонемам (с использованием конъюгатов на основе моноклональных антител к легким цепям иммуноглобулинов человека. Однако эффективна для диагностики сифилиса в инкубационном периоде, при клинических проявлениях и скрытых формах инфекции. Наибольшее применение находит при скрининговых обследованиях населения, особенно в службе крови.

2. "АНТИ-СИФ-М" для выявления IgM - антител к бледным трепонемам (с использованием моноклонального конъюгата к тяжелым

цетям IgM человека). Незаменима для постановки диагноза сифилиса в инкубационном периоде (через 1-2 недели после инфицирования), верификации врожденного сифилиса, дифференциальной диагностики реинфекции и рецидива заболевания, выяснения причины некоторых случаев серорезистентности.

РИТ основана на феномене утраты подвижности бледных трепонем при смешивании с сывороткой крови больного в присутствии комплемента.

РИП основана на том, что патогенные тканевые трепонемы штамма Николса при смешивании с сывороткой больного в присутствии комплемента и эритроцитов человека прилипают к поверхности эритроцитов.

РНГА довольно широко используется в диагностической практике благодаря своей методической простоте. Реакция становится положительной через 3 недели после заражения и остается таковой спустя много лет после выздоровления. Аналогом этой реакции за рубежом является ТРНА (*Treponema pallidum haemoagglutination*).

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЛЕГИОНЕЛЛЕЗА

Легионеллезы - острые инфекции, вызываемые различными видами легионелл - бактериями рода *Legionella*, включающего 9 видов. Легионеллез протекает в двух основных клинических формах:

- а) тяжелая очаговая пневмония ("болезнь легионеров");
- б) острое респираторное заболевание без пневмонии ("лихорадка Понтиак").

Иногда инфекция проявляется в форме лихорадки, сопровождающейся кожными поражениями ("лихорадка форга Брэгг").

В 1977 г. был открыт вид *L. pneumophila*, который ответствен за подавляющее большинство случаев легионеллеза, протекающего чаще всего в форме пневмонии.

Легионеллы широко распространены в природе и являются естественными обитателями водоемов, вступая в симбиотические отношения с некоторыми синие-зелеными водорослями и простейшими. Иными словами, легионеллы способны размножаться вне организма во внешней среде, что дает основание рассматривать легионеллезы как сапронозные инфекции.

Легионеллы представляют собой мелкие грамотрицательные палочки длиной 2-3 мкм, диаметром 0,5-0,7 мкм. В биосубстрате и на адекватных питательных средах выявляются жгутики.

Каталазоположительный аэроб со своеобразными требованиями к условиям культивирования, в частности, требует узкого диапазона pH ($6,9 \pm 0,1$), температуры ($35 \pm 1^\circ$), влажной атмосферы (90%). Некоторые виды обладают оксидазой.

Требует максимально обогащенных питательных сред со специфическими добавками, такими, как L-цистеин, пирофосфат железа. Наилучшей средой для роста возбудителя и наиболее чувствительной при его выделении является угольно-дрожжевой агар (УДА). Источником аминокислот и других питательных веществ здесь является дрожжевой экстракт; присутствует также активированный уголь в концентрации 0,2%, который нейтрализует токсические продукты метаболизма (H_2O_2), служит коллектором CO_2 , смягчает поверхностное натяжение. Добавление буфера на основе ацетиламино-аминотетра сульфаниловой кислоты (ACES-буфер) позволяет поддерживать соответствующий pH α -кетоглутарата калия - стимулировать рост. Некоторые виды легионелл могут расти и на других известных средах при обязательном обогащении их специфическими добавками и инкубировании в атмосфере с 2,5% CO_2 (присутствие в среде NaCl ингибирует рост). В целом для всей группы легионелл наиболее надежным методом остается культивирование в куриных эмбрионах.

Ферментативная активность возбудителя сравнительно невысока. Легионеллы инертны в отношении сахаров, за исключением глюкозы и многоатомных спиртов. Утилизируют крахмал, разжижают желатину. Обладают специфическими эстеразами по отношению к жирным кислотам, фосфатазой и фосфоамидазой. Большинство видов выделяют β -лактамазу.

Антигенная структура легионелл сложна и представлена растворимыми видо- и группоспецифическими компонентами, на основании их различий все штаммы подразделяются на 7 серогрупп. Выделены группоспецифические липопротеидные антигены, обладающие протективными свойствами, а также фракция F1, типоспецифические детерминанты которой необходимы для опсонизации возбудителя и фагоцитоза.

Бактериальная клетка легионелл обладает целым набором компонентов - факторов патогенности. Выявлен термостабильный эндотоксин, шитотоксин, гемолизин, протеаза, действующая на белки

сыворотки крови. Культивирование на искусственных питательных средах приводит к селекции авирулентных штаммов, реверсия которых быстро происходит при пассировании на куриных эмбрионах или в организме морской свинки.

Легионеллы чувствительны к ряду антибиотиков. Наиболее эффективным *in vitro* препаратом является рифамицин, однако к нему может быстро развиваться резистентность. В клинике предпочтение отдается эритромицину. Эффективны также тетрациклины, цефалоспорины III поколения. Вид *L. micdadei*, не имеющий β -лактамазы, чувствителен к пенициллинам.

Диагноз легионеллеза устанавливается с учетом эпидемиологической обстановки на основе результатов микробиологического исследования, включающего следующие методы.

1. Иммунологический - выявление антител в непрямом варианте МФА, РНГА, ИФА для выявления 4-кратной и более сероконверсии, обнаружение антигенов возбудителя в клиническом материале.

2. Бактериологический метод - выделение культуры возбудителя и ее идентификация. Применение бактериологического и биологического методов в диагностике легионеллеза ограничено. Выявление легионелл в мазках, окрашенных по Граму, крайне затруднительно, особенно в нативном материале, вследствие слабого восприятия красителей бактериальной клеткой. Однако мазки, приготовленные из колоний, удается микроскопировать, если при окраске использовать карболовый фуксин.

Традиционно для лабораторной диагностики легионеллеза необходим материал, полученный из респираторного тракта (мокрота, транстрахеальный аспират, бронхоскопический, легочный биопсийный и аутопсийный материалы), а также моча и кровь (сыворотка для серодиагностики).

Бактериологический метод

Культуральный метод остается наиболее чувствительным, позволяющим выявлять небольшие количества (менее 10^3 КОЕ/мл) легионелл в клиническом материале.

Первичный посев производят на забуференный УДА со всеми добавками и pH 6,9. При исследовании контаминированного материала из респираторного тракта параллельно засевают еще чашку с селективным УДА, содержащим антибиотики (полимиксин В, анизо-

мицин и ванкомицин), и чашку с дифференциальным УДА, имеющим в своем составе индикаторы бромкрезоловый пурпурный и бромтимоловый синий.

При первичной изоляции легионеллы растут медленно, поэтому чашки инкубируют в течение 2-14 дней при 35°C во влажной атмосфере, периодически просматривая их. Выросшие колонии обычно менее 2 мм в диаметре, полупрозрачные, бесцветные либо с сероватым оттенком, гладкие, блестящие, с приподнятым краем.

Подозрительные колонии субкультивируют в течение 24-48 ч на чашках с УДА, УДА без L-цистеина, а также на чашке с кровяным агаром для выделения чистой культуры и ориентировочной дифференциации. Только *L. oakridgensis* может давать рост на агаре без L-цистеина. Если колонии вырастают на всех трех средах, данный изолят не относится к росту *Legionella*.

Культуру, выросшую только на УДА, подвергают дальнейшей идентификации с помощью прямого МФА с использованием люминесцирующих сывороток к основным серогруппам *L. pneumophila* и других видов легионелл. В большинстве случаев на этом этапе идентификацию заканчивают. Однако при проведении эпидемиологических исследований требуется дополнительная идентификация и дифференциация с использованием более сложных методов (анализ жирных кислот, ДНК-гомологии, иммунологическое тестирование с набором поли- и моновалентных сывороток).

Определение чувствительности к антибиотикам не рекомендуется, поскольку результаты тестов *in vitro* могут не совпасть с клинической эффективностью.

Иммунологические экспресс-методы выявления антигенов возбудителя

Выделение культур легионелл сопряжено со значительными трудностями и продолжительно по времени, поэтому в диагностической практике предпочтение отдается экспресс-методам обнаружения возбудителя, среди которых наибольшее распространение получил прямой МФА, который используется для ранней диагностики легионеллеза и при проведении мониторинга за различными водными системами и сооружениями на наличие легионелл. По чувствительности и специфичности не уступает культуральному методу и позволяет обнаружить возбудителей (бактериальные клетки) в пассивном материале, за исключением мочи, независимо от их жизнеспособности. Ме-

год используется также для идентификации выделенных культур. Время исследования - 1 ч.

На подготовленный из нативного материала и фиксированный в ацетоне мазок наносят каплю легионеллезной люминесцирующей сыворотки и инкубируют во влажной камере 15-20 мин при 37°C. После промывки в фосфатном буфере мазок просматривают в люминесцентном микроскопе. В положительных случаях обнаруживается специфическое изумрудно-зеленое свечение легионеллезных бактерий.

Иммуноферментный анализ. Метод позволяет определить легионеллезный антиген в клиническом материале, включая мочу. Представляет собой прямой ("сэндвич") вариант ИФА.

В лунки сенсбилизированных легионеллезными иммуноглобулинами планшетов вносят разведения исследуемого материала (антигена) и инкубируют в течение часа при 37°C. После отмывки вносят конъюгат (легионеллезные иммуноглобулины с ферментом). Инкубируют в течение часа, отмывают, вносят субстрат - индикаторный раствор и после 30-минутной инкубации фотометрически учитывают реакцию.

Реакция коагулирования. Является специфическим и чувствительным методом определения антигенов легионелл в материале различного происхождения.

При постановке реакции используется реагент (диагностикум) - взвесь стафилококков, меченных легионеллезными иммуноглобулинами, которые добавляются в полистироловые лунки с раститрованным испытуемым материалом. После двухчасового инкубирования учитывают результат. Появление выраженного агглютината свидетельствует о положительном результате.

Методы выявления антител

Наибольшее распространение в диагностике легионеллеза получил прежде всего непрямой вариант ИФА и РИГА. ИФА также используется для выявления специфических антител в сыворотке крови больных. Четырехкратное и более нарастание титров антител (сероконверсия) к легионеллезным антигенам свидетельствует о наличии активного инфекционного процесса и позволяет с высокой степенью надежности устанавливать или подтверждать диагноз. К недостаткам серологического метода относится ретроспективный характер диагностики, поскольку достаточно выраженную сероконверсию можно выявить лишь на 2-3-й неделе заболевания - при исследовании второй

сыворотки больного. В случаях, когда проанализировать динамику титров антител невозможно, диагноз ставится при условии, что выделенный уровень антител больше либо равен минимальному диагностическому титру, установленному для данной инфекции.

Непрямой метод флуоресцирующих антител (реакция непрямой иммуофлуоресценции). В качестве антигена используют убитую клярическим культурой *L. pneumophila*, которую после нанесения на предметное стекло и фиксации обрабатывают двукратными разведениями сыворотки больного начиная с 1:32. После 15-минутной инкубации наносят люминесцирующий иммуноглобулин против глобулинов человека, повторно инкубируют, промывают в фосфатном буфере и микроскопируют. Максимальное разведение сыворотки, в котором обнаруживается специфическое свечение, является титром специфических антител.

Минимальный диагностический титр при использовании этого метода равен 1:64.

Иммуоферментный анализ. Применяется непрямой вариант метода, в котором сенсибилизированные антигенами легионелл полистироловые лунки последовательно обрабатываются разведениями исследуемых сывороток и мечеными пероксидазой хрена иммуноглобулинами против сывороточных глобулинов человека (инкубация 1 ч после внесения очередного реагента). По окончании реакции с субстрат-индикаторным раствором (30 мин) учитывают результат спектрофотометрически.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА И ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА

Возбудители кампилобактериоза относятся к роду *Campylobacter*, состоящему из пяти видов. Наибольшее значение в патологии человека имеет *C. jejuni*, вызывающий энтериты и энтероколиты. Неклещенные формы кампилобактериоза (септицемия, эндокардиты, менингиты, внутриутробное поражение плода и др.), которые встречаются довольно редко и преимущественно у людей со сниженной резистентностью организма, вызывает *C. fetus*.

В зависимости от формы кампилобактериоза и локализации патологического процесса материалом для исследования служат кровь, спинномозговая жидкость, фекалии, рвотные массы и т.д. Для транспортировки взятых образцов в бактериологическую лабораторию используют транспортную питательную среду Cary-Blair, среду для

контроля стерильности с рН 8,5 или щелочную пептонную воду.

Бактериологическую диагностику кампилобактериозной инфекции осуществляют в три этапа.

На первом этапе исследования из доставленного материала готовят мазки на предметных стеклах и окрашивают их по Граму. При наличии в пробе кампилобактеров в мазке обнаруживают грамотрицательные тонкие, спирально изогнутые палочки S- и C-образной формы длиной 0,5-8,0 мкм, которые часто соединяются в короткие цепочки в виде "крыльев летящей чайки". Для ускоренной ориентировочной диагностики кишечного кампилобактериоза тонкий мазок фекалий фиксируют над пламенем, в течение 10-20 с окрашивают водным раствором основного фуксина и промывают водой. За такой короткий промежуток времени большая часть находящейся в мазке сопутствующей микрофлоры прокрасится не успеет, в то время как кампилобактеры можно легко определить по характерной морфологии.

Кампилобактеры относятся к микроаэрофилам и растут при концентрации кислорода в газовой среде от 5 до 17%. Посев исследуемого материала производят на плотную питательную среду, приготовленную на основе эритроцит-агара, в которую после охлаждения до 45-50°C добавляют 5% гемолитизированной крови барана и реагенты для повышения аэротолерантности микроорганизмов (пируват натрия, сульфат железа и метабисульфит натрия).

Для освобождения от сопутствующей микрофлоры используют два способа. Первый способ заключается в добавлении к питательной среде смеси антимикробных препаратов (полимиксин, рифампицин, амфотерицин В, ристомицин и фузидин), позволяющих выделять возбудитель из ассоциации микроорганизмов. Вторым способом основан на способности кампилобактеров проходить через фильтры с диаметром пор 0,5-0,6 мкм, в то время как большинство представителей сопутствующей флоры при фильтровании задерживается. Стерильные мембранные фильтры помещают на поверхность плотной питательной среды и наносят на них несколько капель 10% суспензии исследуемого материала. Через 30 мин фильтры убирают, чашки с посевами помещают в анаэробстат или экзекатор и культивируют при температуре 42°C.

Для создания микроаэрофильных условий культивирования используют газовую среду следующего состава: 5% кислорода, 10% двуокиси углерода и 85% азота. При отсутствии оптимальной газовой смеси используют "сосуд со свечой": на дно микроанаэробстата

или эксикатора помещают зажженную свечу и плотно закрывают сосуд крышкой. Через некоторое время концентрация кислорода в сосуде уменьшается и свеча гаснет. В ряде случаев можно использовать газогенерирующие пакеты, принцип действия которых основан на каталитическом поглощении кислорода в замкнутом пространстве (анаэробостате и др.) до концентрации 5-7% и генерации двуокиси углерода химическим способом.

На втором этапе исследования, спустя 2-4 сут инкубации, на плотных питательных средах вырастают колонии двух типов. На свежеприготовленных питательных средах вырастают колонии плоские, влажные, блестящие, с тенденцией к ползучему росту, напоминающие растекшиеся капли конденсата. При уменьшении влажности питательных сред в процессе хранения на плотных средах вырастают колонии второго типа: более плотные, выпуклые, полупрозрачные, негемолитические, диаметром 1-2 мм, трудно отличимые от колоний контаминирующей микрофлоры. При наличии достаточного количества чистой культуры возбудителя готовят мазки и окрашивают их по Граму, определяют подвижность микроорганизмов методом "раздавленной" капли, ставят тесты на каталазу, оксидазу, гидролиз гиппурата натрия и определяют чувствительность к налиндиксовой кислоте. При наличии небольшого количества колоний кампилобактеров изолированную колонию с характерными культуральными свойствами пересевают для накопления на плотную питательную среду и выращивают в микроаэрофильных условиях в течение 48 ч.

На третьем этапе исследования после получения чистой культуры возбудителя ставят указанные выше тесты и производят окончательную идентификацию выделенных микроорганизмов в соответствии с представленными в табл. 31 материалами.

Для постановки теста гидролиза гиппурата натрия готовят 1% водный раствор этого препарата, наливают в пробирку в объеме 0,4 мл и эмульгируют в нем полную петлю исследуемой культуры. После инкубации в термостате при 37°C в течение 2 ч в пробирку добавляют 0,2 мл 3,5% раствора ингидрина в смеси с ацетоном и бутанолом, взятыми в соотношении 1:1. Учет результатов производят после повторной инкубации посева при 37°C в течение 10 мин. Появление пурпурного окрашивания суспензии указывает на способность исследуемого штамма гидролизовать гиппурат натрия.

Чувствительность к налиндиксовой кислоте (30 мкг/мл) проверяют путем посева чистой культуры возбудителя на содержащую этот пре-

Основные биохимические свойства кампило- и хеликобактеров

Вид бактерии	Ката-лаза	Окси-даза	Рост при 42°C	Гидролиз глицерата натрия	Чувствительность к палидриниковой кислоте
<i>C. jejuni</i>	+	+	+	+	+
<i>C. fetus</i>	+	+	-	-	-
<i>C. coli</i>	+	+	+	-	+
<i>H. pylori</i>	+	+	-	-	-

парат плотную питательную среду. Результаты учитывают после инкубации посевов в микроаэрофильных условиях в течение 48 ч.

Для серологической диагностики кампилобактериоза используют реакцию связывания комплемента, метод флуоресцирующих антител и иммуноферментный анализ. В связи с высокой иммуногенностью кампилобактеров антитела появляются в крови в ранние сроки (на 5-е сут заболевания титр антител достигает 1:5000) и сохраняются в ней длительное время после заболевания.

Возбудителем хеликобактериозной инфекции у людей является Helicobacter pylori, который обнаруживают у больных с хроническими гастритами (60-95%), язвой желудка (40-70%) и двенадцатиперстной кишки (70-90%). При отсутствии клинических симптомов гастродуоденальной патологии H. pylori выявляют у 3-5% обследованных.

Излюбленными местами локализации возбудителя являются надэпителиальная слизь, эпителий, а в некоторых случаях - подэпителиальные структуры. В связи с гнездым расположением бактерий в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта тканевые биоптаты отбирают одновременно из нескольких точек, исключая края и дно эрозий или язв, так как в этих местах концентрация хеликобактеров невелика. Бактериологическое исследование желудочного сока малоинформативно. Для транспортировки патологического материала в лабораторию можно использовать среду Сагу-Blair или СКС (среду для контроля стерильности).

Из поступивших для исследования тканевых биоптатов готовят мазки, используя технику "двух стекол". Небольшой кусочек био-

штата помещают на предметное стекло, накрывают его вторым стеклом, равномерно распределяют исследуемый образец по всей поверхности и окрашивают по Граму. Хеликобактеры представляют собой грамотрицательные изогнутые палочки U-, C- или S-образной формы, которые часто располагаются короткими цепочками в виде "крыльев летящей чайки". В старых культурах клетки часто приобретают кокковидную форму, свидетельствующую о происходящих в них дегенеративных изменениях. Для изучения подвижности возбудителей используют метод "раздавленной капли".

Принципы бактериологического исследования подозрительного на наличие хеликобактеров патологического материала не отличаются от таковых при выделении кампилобактеров. Для выделения возбудителей требуется создание микроаэрофильных условий, для освобождения от сопутствующей микрофлоры используют метод мембранных фильтров или посев исследуемого материала на селективные питательные среды с антимикробными препаратами (полимиксин, рифампицин, бисептол и др.). Среда обогащения используют редко в связи с неудовлетворительным ростом хеликобактеров в жидкой питательной среде даже при создании адекватных микроаэрофильных условий. Разработана индикаторная среда для выделения *H. pylori*, которая готовится на основе эритроцит-агара с добавлением 10% крови барана, трифенилтетразолийхлорида (ТТХ) и антимикробных препаратов (ванкомицина, палиндроксиновой кислоты и амфотерицина В). Хеликобактеры образуют на этой среде характерные зелено-золотистые колонии.

Спустя 4-6 сут инкубации при температуре 37°C на плотной питательной среде вырастают мелкие полупрозрачные, блестящие, влажные колонии, обладающие тенденцией к ползучему росту. Из изолированных колоний готовят мазки, окрашивают их по Граму и определяют подвижность методом "раздавленной капли". Для идентификации *H. pylori* используют тесты, представленные в табл. 33. Высокая требовательность возбудителя к составу питательных сред и условиям культивирования, а также замедленный рост значительно затрудняют методику бактериологического исследования.

Иммунологическая диагностика хеликобактериоза основана на определении специфических антител в крови больного с использованием РСК, ИФА и реакции латекс-агглютинации.

Для экспресс-диагностики хеликобактериозной инфекции используют метод микроскопии окрашенных по Граму мазков из пативного материала, определение подвижности возбудителей методом "раздав-

ленной капли" и уреазный тест, основанный на способности *H. pylori* расщеплять мочевину с образованием аммиака, в связи с чем происходит сдвиг pH индикаторной среды в щелочную сторону и происходит изменение ее цвета. Для повышения чувствительности метода регистрируют изменение pH не только в жидкой, но и в газообразной фазе (над исследуемым материалом). С этой целью гомогенат биоптата или желудочный сок в объеме 0,3 мл помещают в стерильный пенциллиновый флакон, содержащий равное количество индикаторной среды (6% мочевины, 0,05% фенолового красного и 0,1% азидо натрия). С помощью резиновой пробки над жидкой фазой закрепляют индикаторную полоску "Рифан" с диапазоном pH 5,8-7,4, у которой предварительно отрезают не имеющую шкалы нижнюю часть для приближения рабочего участка полоски к исследуемому материалу. Учет результатов производят через 10 мин, 30 мин, 3 ч и 24 ч инкубации посевов при температуре 37°C. При наличии в пробе хеликобактеров цвет индикаторной среды меняется от розового до интенсивно красного, а выделяющийся в газообразную фазу аммиак вызывает изменение цвета рабочего участка индикаторной полоски.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИИ

Микоплазмы - особый класс бактерий, широко распространенных в природе. Они отличаются от других бактерий малыми размерами (проникают через бактериальные фильтры), отсутствием ригидной клеточной стенки и связанным с этим полиморфизмом. На поверхности микоплазм имеется только трехслойная цитоплазматическая мембрана.

Микоплазмы очень медленно растут на плотных питательных средах (с пассивной сывороткой и дрожжевым экстрактом) в виде мелких тесно спаянных с агаром колоний с уплотнением в центре. Колонии обнаруживают при помощи малого увеличения микроскопа обычно не ранее 3-4 нед культивирования. Микоплазмы можно выращивать в эпителии бронхов куриных эмбрионов и в культурах клеток.

Микоплазмы входят в состав класса Mollicutes, порядка Mycoplasmales семейства Mycoplasmataceae. Это семейство включает два рода: род *Mycoplasma*, в состав которого входит 69 видов. Патогенным для человека является вид *M. pneumoniae*, вызывающий острые респираторные заболевания, пневмонию, поражения почек, суставов; условно патогенными являются *M. hominis* и *M. fermentans*,

вызывающие урогенитальные заболевания, и род *Ureaplasma*; патогенным для человека является вид *U. urealyticum* - возбудитель урогенитальных инфекций.

Материалом для исследования являются мазки из зева, носоглоточные смывы, мокрота, отделяемое уретры и влагалища.

Наиболее распространенным методом микробиологической диагностики микоплазменных инфекций является прямой вариант МФА с контрастированием фона. Приготовленные из исследуемого материала мазки фиксируют в ацетоне 10 мин и окрашивают 15-20 мин при 37°C люминесцирующим иммуноглобулином *M. pneumoniae*, *M. hominis* или *U. urealyticum* во влажной камере. Затем стекла промывают дважды по 10 мин в фосфатно-буферном растворе (рН 7,2-7,4) и ополаскивают дистиллированной водой. Препараты высушивают и изучают в люминесцентном микроскопе. Микоплазмы выявляются в виде ярко-зеленого гранулярного свечения на мембранах эпителиальных клеток и в межклеточном пространстве. При ограниченном количестве эпителиальных клеток в исследуемом материале положительная оценка предполагает выявление в препарате не менее 10 ярко-зеленых гранул, четко выделяющихся на красноватом фоне препарата.

Хорошие результаты дает использование жидкой диагностической среды для индикации уреоплазм. В состав этой среды входит мочевины. При росте уреоплазм, содержащихся в исследуемом материале, который вносят в пробирку с 2 мл индикаторной среды, цвет среды меняется от лимонно-желтого до зеленого, а при большом содержании возбудителя - до синего во всей пробирке без помутнений и осадка за счет ферментации мочевины. Рост уреоплазм наблюдается в течение 24 ч, реже - 48 ч.

Для культивирования микоплазм используют плотные и жидкие питательные среды. Жидкая питательная среда (на 100 мл) содержит: 68 мл стерильного бульона из триптического перевара сердца крупного рогатого скота; 20 мл нормальной лошадиной сыворотки без консерванта; 10 мл 20% дрожжевого экстракта; 2 мл 2,5% раствора таллия уксуснокислого; пенициллина 1000 ЕД/мл; рН 7,7-7,8. Плотная питательная среда содержит дополнительно 1% агар-агара. Посевы инкубируют при 37°C в аэробных условиях и при повышенной влажности, для выделения *M. pneumoniae* до 30 сут., при исследовании на другие виды микоплазм - до 14 сут.

Колонии микоплазм очень мелкие - от 10 до 150 мкм, поэтому их изучают под микроскопом при увеличении в 100 раз. При микроскопии колонии *M. pneumoniae* имеют округлую форму с ровными кра-

ями, зернистую структуру и вросший в агар центр. Колонии других видов микоплазм имеют вид "ячницы-глазуньи" - плотный центр и широкий зернистый бахромчатый ободок.

Для выделения чистой культуры колонию пересевают с помощью агарового блока. Обожженным лезвием вырезают квадратный кусочек агара с намеченной колонией. Блок агара помещают на поверхность свежей питательной среды так, чтобы колония соприкасалась со средой, с легким нажимом перемещают блок штрихом 2-3 см и оставляют в конце штриха на весь период инкубации, т.к. под ним часто наблюдается рост микоплазм. Пересев колонии в жидкую питательную среду также выполняют путем переноса агарового блока.

Идентификацию чистых культур микоплазм осуществляют по культурально-ферментативным и антигенным признакам (табл. 32).

Для выявления антител к микоплазмам используют РСК, РНГА, а также реакцию ингибции метаболизма, ИФА. Наиболее широко при-

Таблица 32

Биологические свойства патогенных для человека микоплазм

Свойства микоплазм	Виды микоплазм			
	<i>M. genitalium</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. pneumoniae</i>	<i>M. carolinense</i>
Рост на агаре с 0,002% азелаколом глицероле	+	-	-	-
Устойчивость к окислительным веществам (32004)	+	+	+	-
Колонии в виде "ячницы-глазуньи"	-	+	+	-
Результат дифференцировки поварта и азелаколом у теста	+	-	-	-
Ферментация глюкозы безазела	+	-	+	-
Гидролиз мочевины	-	-	-	+
Гидролиз аргинина	-	+	+	-
Гемолитическая активность на эритроцитах человека O(1) группа	0	γ	α	α
Гемолитическая активность на эритроцитах человека O(1) группа	0	γ	α	0
Гемолитическая активность на эритроцитах человека O(1) группа	0	αγ	α	γ
Гемолитическая активность на эритроцитах человека O(1) группа	α	γ	α	α
Гемолитическая активность на эритроцитах человека O(1) группа	+	-	-	-

меняется РСК. Диагностическое значение имеет увеличение титра антител в 4 раза и более при исследовании парных сывороток. Титры антител во всех реакциях выявляются в диапазоне 1:20-1:320. Специфические антитела, выявляемые в РСК, появляются в конце первой или начале второй недели заболевания, достигают максимума на 3-5-й неделе и держатся до 3-6 мес., затем резко снижаются и к году исчезают. Антитела, выявляемые с помощью РНГА и ИФА, появляются в конце инкубационного периода, достигают максимума в конце первого месяца заболевания, затем титр их постепенно снижается, через 10-12 мес. антитела исчезают. Ингибирующие метаболизм микоплазм антитела достигают наивысшего уровня через 6 мес. после заболевания и сохраняются на высоком уровне до 1-2 лет.

Реакцию связывания комплемента, реакцию непрямой гематтопоници и иммуноферментный анализ ставят по стандартным методикам.

Реакция ингибиции метаболизма микоплазм основана на свойстве *M. pneumoniae* ферментировать глюкозу со сдвигом pH среды, что определяется по изменению цвета индикатора (фенолового красного). Добавлением в среду специфического иммуноглобулина или исследуемой сыворотки больного подавляют ферментативную активность микоплазм. Если метаболизм микоплазм подавляется иммунной сывороткой, среда остается бесцветной или бледно-желтой.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ХЛАМИДИОЗА

Хламидии - грамотрицательные кокковидные внутриклеточные паразиты размерами 0,2-1,5 мкм.

Они объединены в порядок *Chlamydiales*, семейство *Chlamydiaceae*, род *Chlamydia*, включающий четыре вида - *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* и *C. pecorum*.

C. trachomatis поражает слизистые оболочки органов зрения и мочеполовой системы. Известно 15 сероваров этого возбудителя, которые вызывают различные заболевания у человека: А, В, Ва и С являются возбудителями трахомы и конъюнктивита с включениями (паратрахомы), серовары от D до K вызывают уретриты, цервициты, сальпингиты, эпидидимиты и конъюнктивиты, являются причиной мужского и женского бесплодия. Серовары а₁, а₂, а₃ вызывают паховый лимфогранулематоз (болезнь Никола - Фавра).

C. psittaci (15 серовариантов) - возбудитель орнитоза, вызываю-

щий у человека пневмонии, полиартриты, энтериты, энцефалиты.

S. pneumoniae является возбудителем острых респираторных заболеваний и пневмонии.

Роль *S. pneumoniae* в патологии человека уточняется.

Хламидии не растут на искусственных питательных средах, их культивируют в желточном мешке куриных эмбрионов и культурах клеток.

Микробиологическая диагностика заболеваний, вызываемых *S. trachomatis*

Материалом для исследования на *S. trachomatis* служат соскобы эпителия слизистой уретры, цервикального канала, конъюнктивы век, пунктаты. Для взятия материала из уретры и цервикального канала используют цитологическую щетку или ложку Фолькмана, с помощью которой берут соскоб с передней и задней стенки уретры и из цервикального канала после удаления слизистой пробки. Для взятия соскобов с эпителия конъюнктивы век, глаза больного промывают два дня подряд (дважды в день) изотоническим раствором натрия хлорида, содержащим по 250 ЕД пенициллина и стрептомицина в 1 мл. На третий день проводят анестезию глаз 0,5% раствором дикаина, выворачивают верхние веки и тупым скальпелем соскабливают поверхностный слой конъюнктивального эпителия.

Мазки готовят на стерильных предметных стеклах, которые фиксируют 10-15 мин в ацетоне. Часть мазков окрашивают по методу Гимзы, хламидии окрашиваются в фиолетовый цвет, располагаются внутри- и внеклеточно и имеют вид округлых или овальных образований диаметром 0,2-0,4 мкм (элементарные тельца) и 0,8-1,5 мкм (ретикулярные тельца). Окончательную идентификацию проводят с помощью прямого или непрямого вариантов МФА.

Для выявления в сыворотке крови больных специфических антител к *S. trachomatis* в последние годы широко используют РИГА и ИФА.

Выделение *S. trachomatis* осуществляют путем заражения куриных эмбрионов или перевиваемых линий культур клеток Мак-Коя, L-929, Нер-2. Для этого материал гомогенизируют, добавляют 1 мл изотонического раствора натрия хлорида, содержащего 500 мкг стрептомицина и 1000 ЕД пенициллина. Суспензию выдерживают 2 ч при 4° С и вводят по 0,2 мл в желточный мешок куриных эмбрионов 7-дневного возраста и по 0,2 мл в пробирки с культурами клеток на стеклянных пластиках.

При наличии в исследуемом материале хламидий эмбрионы погибнут на 5-8-е сутки после заражения. Из желточных мешков по-

гибших эмбрионов готовят мазки-отпечатки, которые фиксируют и окрашивают по методу Гимзы и люминесцирующим хламидийным иммуноглобулином. Этими же методами выявляют хламидии и в инфицированных культурах клеток.

Микробиологическая диагностика ориктоза

При ориктозе в зависимости от клинических проявлений инфекции исследуемым материалом могут быть кровь, мокрота, мазки, биопсированные органы.

Выделение хламидий ориктоза осуществляют в культурах клеток, куриных эмбрионах и на белых мышах. Сроки инкубирования инфицированных исследуемым материалом культур клеток, куриных эмбрионов более продолжительные, чем при выделении *S. trachomatis*, они составляют 7-10 дней.

Ориктоз относится к группе высококонтагиозных инфекций, и выделение возбудителя из инфекционного материала можно проводить только в специально оборудованных лабораториях.

В практических лабораториях диагностику ориктоза осуществляют путем выявления специфических антител в сыворотке крови, используя РСК, РТГА, ИФА.

Применяют также внутрикожную аллергическую пробу для ранней и ретроспективной диагностики ориктоза. Используют стандартные специфический и контрольный ориктозный диагностикумы. Диагностикумы вводят строго внутрикожно в дозе 0,1 мл: специфический - на правом, контрольный - на левом предплечье (на внутренней поверхности). Учет реакции через 24 ч. Инфильтрат размером 0,5x1 см оценивают как ++, 1x3 см - +++, 2x4 см и более - ++++. Внутрикожная проба становится положительной со 2-3-го дня заболевания.

Микробиологическая диагностика заболеваний, вызванных *S. pneumoniae*

Материал для исследования: мазки из зева и носа, носоглоточные смывы, мокрота.

Из взятого материала готовят мазки, после фиксации ацетоном мазки окрашивают по методу Гимзы и люминесцирующим иммуноглобулином.

Выявление специфических антител в сыворотке крови осуществляют методом твердофазного ИФА.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	3
-------------------	---

ОСНОВЫ ТЕХНИКИ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Устройство и правила работы в микробиологической лаборатории. <i>М.Л. Медведев</i>	5
Микроскопические методы исследования. <i>С.А. Грамов</i>	8
Исследование микроорганизмов в окрашенном состоянии, <i>В.А. Гришанин</i>	21
Исследование микроорганизмов в живом состоянии. <i>Т.Н. Субарина, О.Л. Покровская</i>	26
Питательные среды. <i>Е.П. Сиволодский</i>	30
Методы стерилизации. <i>С.А. Грамов</i>	37
Культивирование микроорганизмов в лабораторных условиях. <i>В.А. Гришанин, В.Д. Бадиков</i>	43
Методы определения чувствительности, устойчивости и толерантности микроорганизмов к антибиотикам и химиотерапевтическим препаратам. <i>Е.П. Сиволодский</i>	58
Применение лабораторных животных для биологических исследования. <i>В.А. Гришанин</i>	68
Методы оценки иммунного статуса. <i>А.В. Москалев</i>	75
Иммунологические исследования. <i>В.Б. Сбойчиков, А.В. Москалев</i>	94
Аллергические пробы. <i>А.В. Москалев, О.А. Суховская</i>	107
Лечебно-профилактические иммунопрепараты. <i>М.Л. Медведев</i> ..	110
Бактериофаг. <i>Н.В. Михайлов</i>	114
Генодиагностика возбудителей инфекционных заболеваний. <i>Н.В. Михайлов</i>	118
Методы изучения генетики микроорганизмов. <i>Е.П. Сиволодский</i> ...	121

ЧАСТНАЯ БАКТЕРИОЛОГИЯ

Микробиологическая диагностика стафилококковой инфекции. <i>В.Д. Бадиков, И.Н. Волков, В.А. Андреев</i>	126
Микробиологическая диагностика стрептококковой инфекции. <i>В.Д. Бадиков</i>	129

Микробиологическая диагностика пневмококковой инфекции. <i>В. В. Акользин</i>	136
Микробиологическая диагностика менингококковой инфекции. <i>В. В. Акользин, Л. Г. Боротина</i>	142
Микробиологическая диагностика гонорей. <i>О. Л. Покровская, Т. Н. Суборова</i>	147
Микробиологическая диагностика газовой гангрены и столбняка. <i>В. Д. Бадиков, И. Д. Анищенко</i>	148
Микробиологическая диагностика инфекций, вызываемых неспорообразующими анаэробами. <i>В. Д. Бадиков</i>	154
Лабораторная диагностика микозов. <i>О. Л. Покровская, Т. Н. Суборова</i>	159
Микробиологическая диагностика гнойно-септических инфекций, вызванных условно-патогенными энтеробактериями. <i>Е. П. Сиволодский</i>	162
Микробиологическая диагностика энтерококковых инфекций. <i>В. Д. Бадиков</i>	172
Микробиологическая диагностика синегнойной инфекции. <i>Е. П. Сиволодский</i>	175
Микробиологическая диагностика брюшного тифа и паратифов. <i>В. Б. Сбойчиков, М. Л. Медведев, Л. Г. Великосельцева</i>	180
Микробиологическая диагностика дизентерии. <i>Н. В. Михайлов</i>	188
Микробиологическая диагностика эшерихиозов. <i>Н. В. Михайлов</i>	193
Микробиологическая диагностика иерсиниозов. <i>А. М. Карлюк, В. Б. Сбойчиков</i>	200
Микробиологическая диагностика холеры. <i>Е. П. Сиволодский</i>	202
Микробиологическая диагностика чумы. <i>М. Л. Медведев</i>	211
Микробиологическая диагностика сибирской язвы. <i>М. Л. Медведев</i>	215
Микробиологическая диагностика туляремии. <i>Е. И. Милевский, В. Б. Сбойчиков</i>	220
Микробиологическая диагностика туберкулеза. <i>В. Б. Сбойчиков, Е. И. Милевский, И. Д. Анищенко</i>	223
Микробиологическая диагностика бруцеллеза. <i>В. Б. Сбойчиков, Е. И. Милевский</i>	231

Микробиологическая диагностика дифтерии. <i>В. В. Акульин, Е. И. Милевский, Т. В. Толмазова</i>	237
Микробиологическая диагностика боррелиозов (возвратные тифы, болезнь Лайма). <i>В. Б. Сбойчиков, С. С. Козлов, И. Д. Антешкова</i>	242
Микробиологическая диагностика лептоспироза. <i>М. Л. Медведев</i>	243
Микробиологическая диагностика сифилиса. <i>В. Б. Сбойчиков, А. М. Иванов</i>	247
Микробиологическая диагностика легионеллеза. <i>В. В. Акульин</i>	249
Микробиологическая диагностика кампилобактериоза и хеликобактериоза. <i>В. Д. Бадиков</i>	254
Микробиологическая диагностика микоплазменной инфекции. <i>М. Л. Медведев</i>	259
Микробиологическая диагностика хламидиоза. <i>М. Л. Медведев</i>	262

УВАЖАЕМЫЕ ГОСПОДА!

ЗАО «ЭЛБИ»

готовит к выпуску в 1999 году следующие книги:

А. Ш. Зайчик, Л. П. Чурилов

ОСНОВЫ ПАТОХИМИИ

В учебном пособии подробно рассматриваются химические процессы, происходящие при патологических состояниях, как на уровне целостного организма, так и на уровне отдельного органа, отдельной клетки и даже клеточных органелл. Особенность книги заключается в том, что она освещает вопросы, достаточно мало изучаемые в курсах как нормальной биохимии, так и патофизиологии.

Нарушения химизма естественных процессов функционирования клеток при патологических состояниях может приводить к тяжелым, и даже терминальным, состояниям всего организма. Врач не всегда может разобраться в тонкостях протекания патохимических процессов, что зачастую приводит к назначению неадекватной терапии. Помочь будущему врачу разобраться в таких ситуациях – цель этой книги.

Для студентов медицинских ВУЗов, врачей всех специальностей.

*Ориентировочный срок выхода книги –
IV квартал 1999 года.*

Г. А. Савицкий

БИОМЕХАНИКА РАСКРЫТИЯ ШЕЙКИ МАТКИ В РОДАХ

Книга посвящена раскрытию механизма конвертирования энергии напряжения миометрия во внешнюю работу по деформации тканей шейки матки в родах. На основании анализа структурной и динамической информации и данных собственных исследований выявлено явление, заключающееся в том, что напряжение сокращающегося миометрия в первом периоде родов может конвертироваться во внешнюю работу в том случае, если во время родовой схватки будет увеличиваться объем матки за счет силового депонирования крови. Приведены новейшие сведения по механике сокращающегося миометрия, механизмам синхронизации сократительных единиц оболочки матки, особенностям гемодинамики и гидравлики матки в первом периоде физиологических и патологических родов.

Книга рассчитана на акушеров, физиологов, преподавателей и студентов медицинских институтов.

*Ориентировочный срок выхода книги –
IV квартал 1999 года.*

ОТОРИНОЛАРИНГОЛОГИЯ

*Рекомендовано в качестве учебника
для курсантов и слушателей факультетов подготовки врачей
Военно-медицинской Академии*

*Рекомендовано Министерством общего и профессионального образования
Российской Федерации в качестве дополнительной литературы
для студентов лечебных факультетов высших медицинских
учебных заведений*

Учебник состоит из 6 глав, содержащих исторические аспекты развития мировой и отечественной оториноларингологии, анатомо-физиологические особенности строения ЛОР-органов, клинику, диагностику и современные методы лечения заболеваний уха, горла и носа, влияние профессиональных вредностей на развитие ЛОР-заболеваний, вопросы экспертной оценки.

Материал учебника изложен хорошим языком, хорошо структурирован. Большое количество иллюстраций, несомненно, призвано помочь студенту в освоении учебного материала.

Учебник предназначен, в первую очередь, для студентов лечебных факультетов высших медицинских учебных заведений, но содержащиеся в нем описания новейших диагностических и лечебных методик при заболеваниях ЛОР-органов, позволяют рассматривать его в качестве руководства для практикующих врачей любого профиля.

*Ориентировочный срок выхода книги –
IV квартал 1999 года.*

МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

Учебное пособие

Под редакцией Лауреата Государственной премии СССР, доктора
медицинских наук, профессора А.М. Королюка
и доктора медицинских наук, доцента В.Б. Сбойчкова

Редактор Аракелова С.И.
Компьютерная верстка Д.Пуга

Издательство ЗАО «ЭЛБИ»
ЛР № 090130 от 30.10.95.
СПб., ул. Железноводская, 31.
Тел. (812) 245-52-32, 245-15-71.

Подписано в печать 26.07.99. Формат 60×84^{1/8}.
Печать офсетная. Печ. листов 17.
Тираж 4000 экз. Заказ № 1130.

Отпечатано с готовых диапозитивов в ГПП «Печатный Двор»
Министерства РФ по делам печати, телерадиовещания
и средств массовых коммуникаций.
197110, Санкт-Петербург, Чкаловский пр., 15.

МЕДИЦИНСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ

1999

ISSN 8756-6648



9 795773 300419

